



HAL
open science

Les cellules souches des sarcomes osseux dans la croissance tumorale et les métastases : le rôle de l'axe calpaïne-6/YAP

Joëlle Tchicaya-Bouanga

► **To cite this version:**

Joëlle Tchicaya-Bouanga. Les cellules souches des sarcomes osseux dans la croissance tumorale et les métastases : le rôle de l'axe calpaïne-6/YAP. Cancer. Université Paris Cité, 2021. Français. NNT : 2021UNIP7359 . tel-04152843

HAL Id: tel-04152843

<https://theses.hal.science/tel-04152843v1>

Submitted on 5 Jul 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse de doctorat
de l'Université de Paris

École doctorale n°561 Hématologie Oncogénèse et Biothérapies

UMR1132 BIOSCAR- Equipe Os, cartilage et environnement

**Les cellules souches des sarcomes osseux dans la
croissance tumorale et les métastases : Le rôle de
l'axe calpaine-6/YAP**

Par **Joëlle TCHICAYA BOUANGA**

Thèse de doctorat Oncogénèse

Dirigée par le Dr Dominique MODROWSKI

Présentée et soutenue publiquement à Paris, le 14 décembre 2021

Président du jury : M. Moyse Emmanuel /PU/ Université de Tours

Rapporteurs : Mme Entz-Werlé Natacha/PU-PH / Université de Strasbourg
M. Verrecchia Franck /DR/ Université de Nantes

Examineurs : Mme Fromigué Olivia /CR, HDR / Université Paris Sud
M. Moyse Emmanuel /PU/ Université de Tours

Directeur de thèse : MODROWSKI Dominique/CR, HDR/Université Paris Diderot



Titre : Les cellules souches des sarcomes osseux dans la croissance tumorale et les métastases : Le rôle de l'axe calpaïne-6/YAP

Résumé : Bien qu'on ait démontré l'existence des cellules souches dans les sarcomes, la manière dont elles contribuent aux récives locales et métastatiques est largement inconnue. Ici, nous montrons que la calpaïne-6, un biomarqueur des cellules souches des sarcomes, module l'expression des gènes cibles de la voie Hippo et le trafic vésiculaire du complexe de dégradation de la β -caténine stabilisant ainsi YAP. De plus, la calpaïne-6 contrôle les activités de YAP liées à G2M et régule de manière positive les gènes mitotiques dans les cellules souches et les tissus des sarcomes osseux. Dans les modèles murins de sarcomes osseux, la majorité des cellules tumorales expriment la calpaïne-6 au cours des étapes précoces du développement tumoral. L'inhibition de YAP empêche la néoformation de tumeurs et des métastases associées mais n'a aucun effet sur les tumeurs déjà développées. Cela peut même accélérer la croissance des métastases pulmonaires chez des souris avec de grosses tumeurs primaires en influençant l'inflammation autour de la tumeur. **Nos résultats mettent en évidence un nouveau mécanisme crucial au cours des premières étapes de la croissance tumorale et métastatique et qui pourrait être ciblé pour prévenir les rechutes de sarcomes.**

Mots Clefs : ostéosarcome, métastases, cellule souche cancéreuse, calpaïne-6, signalisation HIPPO, transcriptome

Title: A Calpain-6/YAP axis in sarcoma stem cells that drives the outgrowth of tumors and metastases

Abstract: Although it is accepted that sarcomas include stem cells, how these cells contribute to local and metastatic relapses is largely unknown. Here, we show that calpain-6, a biomarker of sarcoma stem cells, modulates the expression of Hippo pathway genes and the vesicular trafficking of β -catenin degradation complexe and thereby stabilizes YAP. Calpain-6 supports G2M-related YAP activities and up-regulates genes controlling mitosis in sarcoma stem cells and tissues. In mouse models of bone sarcoma, the majority of tumor cells express calpain-6 during early steps of tumor out-growth. YAP inhibition prevents neoformation of primary tumors and metastases but has no effect on already developed tumors. It can even accelerate growth of lung metastases associated with large bone tumors by influencing tumor-associated inflammation in the host tissues. **Our results highlight a new mechanism that is crucial during early steps of tumor and metastasis outgrowth and could be targeted to prevent relapses of sarcomas.**

Keywords: osteosarcoma, metastasis, cancer stem cell, calpain-6, HIPPO pathway, transcriptome

« Mieux vaut la fin d'une chose que son commencement »

Ecclésiaste 7:8

Toi qui connais les désirs de mon cœur, mes soupirs cachés, mes peurs inavouées, je te remercie d'avoir été là, à chacun de mes pas, de m'avoir soutenue quand j'étais à bout de force, d'avoir été mon refuge, mon abri le plus sûr et mon espérance.

Amen.

Remerciements

« M. papi Hilaire et maminou Eugénie » rien ne pourrait traduire la gratitude et l'amour que j'ai pour vous. Merci du fond de mon cœur pour les parents formidables que vous êtes. Merci pour les nombreux sacrifices que vous avez pu faire pour me donner la meilleure des éducations et pour que j'arrive à une indépendance financière.

Ya Yannick, merci de m'avoir soutenue autant sur le plan financier que moral durant toutes ces années. Je n'ai qu'un frère et j'ai le meilleur des frères.

Djeureudjeuf à mes sœurs, ya Fani et ya Grâce, mes conseillères, mes motivatrices. Entre filles ce n'est pas toujours facile mais je sais que je peux toujours compter sur vous.

Dominique Modrowski, merci de m'avoir donné ma chance et de m'avoir appris tout ce que je sais. Ça n'a pas toujours été facile mais ce que je retiens c'est que vous n'avez jamais lâché l'affaire ! Vous m'avez poussée à sortir le meilleur de moi et dans une certaine mesure, j'ai grandi sous vos yeux. J'espère sincèrement que vous garderez un bon souvenir de notre collaboration.

Aux membres de mon jury de thèse, mes examinateurs, mes rapporteurs, je vous remercie d'avoir accepté cette tâche. Merci pour le temps et l'attention que vous avez consacré à lire mon manuscrit et à le corriger. J'aimerais particulièrement remercier M. Moïse Emmanuel. Sans vous, je n'en serais pas là. Vous avez vu en moi, ce que je ne voyais pas. Votre bienveillance m'a donné le courage nécessaire pour entreprendre cette aventure. Merci au docteur Eric Hay, « the blacker the berry, the sweeter the juice ». Vos blagues et votre bonne humeur me manqueront.

Docteur Martine Cohen Solal, merci de m'avoir accueillie dans votre unité. Merci pour les conseils et les suggestions lors des labmeetings.

A toute l'unité U1132, je vous remercie du plus profond de mon cœur. Merci pour l'accueil, pour les sourires, pour les conversations et les astuces. A tous les chercheurs, les ingénieurs, les étudiants, les collaborateurs, les stagiaires... tout ceux qui de près ou de loin ont été là, merci pour l'encadrement. On dit « qu'il faut tout un village pour éduquer un enfant » ; moi je dirais **qu'il a fallu toute l'unité U1132 pour faire de moi ce que je suis**. Merci.

A l'équipe du 5^{ème}, particulièrement Morgane, Mylène, Caroline C., Malika, merci pour la cohabitation, les conseils, les encouragements. Avec vous mon travail m'a semblé plus facile. Je vous souhaite le meilleur.

A Nathalie, Jacqueline, Maïchata, mes mamans du labo. Merci car vous m'avez prise comme votre enfant. Je chéris chacun des moments passés avec vous. Merci car avec vous, je me suis toujours sentie moi.

Merci à mes amies et particulièrement Audrey, Livy, Rebecca. Merci d'être là.

MERCI, MATONDO, DJEUREUF, THANK YOU, DANKE SCHÖN.

Liste des abréviations

ABCB1 : *ATP Binding Cassette Subfamily B Member 1*
ADN : *Acide DésoxyriboNucléique*
ALT : *Alternative Lengthening of Telomeres*
AMF/PGI : *Autocrine motility factor /Phosphoglucose isomerase*
ARN : *Acide Ribonucléique*
BLM : *Bloom Syndrome Protein*
CAFs : *cancer-associated fibroblasts*
CCL5 : *C-C motif chemokine ligand 5*
CDK : *cyclin-dependent kinase*
CDKN2A : *Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*
Col1a1 : *Collagen Type I Alpha 1 Chain*
COSP3 : *COP9 signalosome subunit 3*
CSCs : *Cancer stem cells*
CSMs : *Mesenchymal stem cells*
CTCs : *Circulating tumor cells*
DDR : *DNA Damage Response*
DHFR : *dihydrofolate réductase*
DTCs : *Disseminated Tumor Cells*
EGFR1 : *Epidermal Growth Factor Receptor 1*
EMT : *epithelial-to-mesenchymal transition*
FGF2 : *Fibroblast growth factor 2*
FGFR1 : *Fibroblast Growth Factor Receptor Type 1*
FHIT : *Fragile histidine triad*
Fzs : *Frizzled Receptors*
GSEA : *Gene Set Enrichment Analysis*
GSK3 : *Glycogen synthase kinase-3β*
HLA2 : *HERV-H LTR-associating protein 2*
HIF : *Hypoxia-Inducible Factors*
IL-22 : *Interleukin 22*
LRP5 : *Low-density lipoprotein receptor-related proteins 5*
MAPK : *Mitogen-activated Protein Kinases*
MEC : *Matrice Extracellulaire*
MET : *Mesenchymal to Epithelial Transition*
MGP : *Matrix Gla protein*
MMP : *Matrix MetalloProteinase*
MOB1A : *MOB kinase activator 1A*
NF2 : *Neurofibromatosis type 2*
NFIB : *Nuclear Factor I/B*
NF-κB : *Nuclear Factor kappa light chain enhancer of activated B cells*

OPG : *Osteoprotegerin*
OS : *Osteosarcoma*
OSCs : *Osteosarcoma Stem Cells*
p53 : *Tumor Protein 53*
PAL : *Phosphatase Alcaline*
PD - 1 : *Programmed cell death 1*
PDL - 1 : *Programmed death-ligand 1*
PI3K/mTOR : *Phosphatidylinositol-3-Kinase/mammalian Target Of Rapamycin*
PTEN : *Phosphatase and TENsin homolog*
Rb : *Rétinoblastome*
RECQL4 : *RecQ helicase-like 4*
RUNX2 : *Runt-related transcription factor 2*
SATB2 : *Special AT-rich sequence-binding protein 2*
SLC19A1/RFC1 : *Solute Carrier Family 19/ Reduced folate carrier 1*
SMAD : *Mothers against decapentaplegic*
TAMs : *Tumor-associated Macrophages*
TAZ : *Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif*
TCF : *T-cell Factor*
TEAD : *Transcriptional enhancer factor TEF-1*
TGF- β : *transforming growth factor β*
TNF α : *Tumor Necrosis Factor α*
VEGF : *Vascular endothelial growth factor*
WEG : *Wild Evolutionary Genomics*
WGS : *Whole-Genome-Sequencing*
WIF-1 : *Wnt Inhibitory Factor-1*
WRN : *Werner syndrome ATP-dependent helicase*
YAP : *Yes-associated protein*

Table des matières

Remerciements	4
Liste des abréviations.....	5
Table des illustrations.....	9
1- Ostéosarcomes	14
1-1- Epidémiologie.....	14
1-2- Caractéristiques anatomorphologiques	16
1-2-1- Les ostéosarcomes conventionnels.....	16
1-2-2- Les ostéosarcomes non conventionnels.....	19
1-3- Etiologie des ostéosarcomes	20
1-3-1- Altérations géniques- Gènes conducteurs.....	21
1-3-1-1- La Recherche de gènes conducteurs	21
1-3-1-2- La régulation épigénétique de l'ostéosarcomagenèse.....	25
1-3-1-2-1- Méthylation/ Hypoacétylation des gènes conducteurs	25
1-3-1-2-2- Les ARNs non codants	25
1-3-2- La cellule d'origine	27
1-3-3-1- Les Cellules Souches Mésoenchymateuses (CSMs).....	27
1-3-3-2- Les ostéoblastes	28
1-3-3- L'Influence du microenvironnement	29
1-3-3-1- L'inflammation et l'initiation des tumeurs.....	29
1-4- Prise en charge et Traitement	30
1-4-1- Classification	30
1-4-1-1 Le système MSTS	30
1-4-1-2 La classification des tumeurs osseuses selon l'AJCC	31
1-4-2 Traitements.....	32
1-4-2-1 La Résection chirurgicale	32
1-4-2-2 La Radiothérapie	33
1-4-2-3 Les Chimiothérapies conventionnelles	33
1-4-2-4 Les Nouvelles approches thérapeutiques.....	33
1-4-2-4-1 Nouvelle formulation des agents chimiothérapeutiques.....	33
1-4-2-4-2 Inhibiteurs de la tyrosine kinase.....	34
1-4-2-4-3 Radiothérapie osseuse ciblée	34
1-4-2-4-4- Le ciblage de la réparation de l'ADN	35
1-4-2-4-5- Les immunothérapies.....	35

1-4-2-4-6- Les inhibiteurs de la kinase dépendants de la cycline.....	36
1-4-2-4-7- Le ciblage du disialoganglioside (GD2) et de la glycopotéine (gpNMB).....	36
1-4-2-4-8- Pharmacogénomique	37
2- Les Métastases	39
2-1- Le processus métastatique.....	39
2-1-1- La Régulation du caractère métastatique.....	41
2-1-1-1- Les Gènes de métastases.....	41
2-1-1-1-1- Les Altérations génétiques	41
2-1-1-1-2- La régulation épigénétique	44
2-1-1-1-3- La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT)	44
2-1-1-1-4- Le rôle du microenvironnement tumoral (MT)	47
2-1-1-1-4-1 La matrice extra-cellulaire (MEC).....	48
2-1-1-1-4-2- Les cellules associées à la tumeur.....	50
2-1-1-1-4-2-1- Les cellules souches mésenchymateuses (CSMs).....	50
2-1-1-1-4-2-2- Les macrophages associés aux tumeurs (TAMs)	52
2-1-1-1-4-3- L'hypoxie	54
2-1-1-1-4-4- Les voies de signalisation impliquées	55
2-1-1-1-4-4 -1- La signalisation Notch	55
2-1-1-1-4-4 -2- La signalisation WNT.....	56
2-1-2- La progression des cellules tumorales : de cellules tumorales circulantes à disséminantes (de CTCs à DTCs)	58
2-1-2-1- Influence des cellules endothéliales.....	59
2-1-2-2- Le rôle de la niche pré-métastatique	59
2-1-2- La croissance des métastases	62
2-1-2-1- La dormance	62
2-1-2-2- L'échappement au système immunitaire	63
2-1-2-2-1- Les lymphocytes infiltrant les tumeurs (TILs).....	63
2-1-2-2-2- Les cellules natural killer (NK)	66
2-1-2-3- Le Rôle des cellules de la tumeur primaire dans la croissance des métastases.....	66
2-1-3- L'hétérogénéité des métastases.....	67
2-1-3-1- Les Modèles de Dissémination	68
2-1-3-1-1- Le modèle linéaire	68
2-1-3-1-2- Les voies de progression parallèles.....	68
2-1-3-1-3- Le modèle organotropique.....	69

2-1-3-1-4- Le modèle anatomique/mécanique	69
2-1-3- 2- Les cellules d'origine : concept des cellules souches cancéreuses (CSCs).....	70
2-1-3- 2-1- Les cellules souches des ostéosarcomes (OSCs)	72
2-1-3- 2-1-1- La calpaïne-6	74
2-1-3- 2-1-1-1- Les fonctions cellulaires de la calpaïne-6.....	75
2-1-3- 2-1-2- La calpaïne-6 dans les cancers	75
3- La signalisation HIPPO	76
3-1 - YAP/TAZ dans la régulation du caractère souche des cellules.....	78
3-2 - YAP/TAZ et la voie de signalization WNT	80
3-3 - YAP/TAZ : des mécanosenseurs	81
3-4 - YAP/TAZ et cancers	82
3-4-1 YAP/TAZ dans les OS.....	83
Objectifs de l'étude	85
1- Le Rôle Des Cellules Souche Des Sarcomes Osseux dans la Croissance Tumorale et les Métastases via l'Axe Calpaïne-6/YAP	88
1-1- Introduction.....	89
1-2- Resultats	92
1-3- Discussion	93
2- Discussion Générale Et Résultats Complémentaires.....	96
2-1- Les OCS qui expriment la calpaïne-6 sont des cellules initiatrices de métastases.....	98
2-2- La calpaïne-6 module la voie hippo et stabilise YAP	109
2-3- La calpaïne-6 contrôle l'arrêt des cellules en phase G2M.....	110
2-4- Régulation réciproque de la calpaïne-6 et de l'activité TEAD/YAP	111
2-5- Les effets de la verteporfine in vivo	113
2-6- Le rôle de la Calpaïne-6 dans l'inflammation liée aux cancers.....	114
3- Conclusion Générale	120
4- Perspectives.....	121
Bibliographie.....	123
ANNEXES	155
Liste des présentations des travaux de recherche	155
Revue: Metastatic progression of osteosarcomas: environmental versus oncogenic drivers	156

Table des illustrations

Tableau 1 : Caractéristiques des trois principaux sarcomes osseux	14
---	----

Tableau 2 : Taux de survie après 5ans des patients ostéosarcomateux selon le stade de progression de la tumeur	16
Tableau 3 : Listes des mutations somatiques associées aux « gènes driver » des cancers.....	22
Tableau 4 : Les syndrômes génétiques héréditaires associés au développement d'OS.....	23
Tableau 5 : les circARNS impliqués dans l'initiation et la progression des OS.....	26
Tableau 6 : Classification selon le système Enneking's	31
Tableau 7 : Classification selon l'AJCC.....	32
Tableau 8 : Les gènes impliqués dans le développement métastatique des OS	43
Tableau 9 : Les MicroARNs impliqués dans la régulation épigénétique des métastases des OS.	44
Tableau 10 : Les microARNs associés à l'EMT et utilisés dans le diagnostic des OS.....	47
Tableau 11 : Les composés de la MEC utilisés comme biomarqueurs et cibles thérapeutique dans les OS	49
Tableau 12 : Les principaux marqueurs des OSCs.....	73
Figure 1: La distribution des OS sur le squelette	15
Figure 2: Les principaux sous- types histologiques d'ostéosarcomes	18
Figure 3: Représentation schématique des OS non conventionnels selon leur localisation sur l'os.	20
Figure 4 : Les cellules d'origine des OS	28
Figure 5 : Les essais cliniques en cours sur le ciblage des ostéosarcomes	38
Figure 6 : Les étapes du processus métastatique	41
Figure 7 : Exemple d'altérations génétiques conférant des capacités métastatiques différentes aux cellules d'OS.....	42
Figure 8 : Le rôle de l'EMT dans le processus métastatique.....	46
Figure 9 : Le dialogue entre les CSMs et microenvironnement tumoral	50
Figure 10 : Les TAMs dans les OS	53
Figure 11 : Le rôle de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine dans la progression des OS et l'établissement des métastases	57
Figure 12 : Le rôle des vésicules extracellulaires dans l'établissement des métastases des OS	61
Figure 13 : L'expression des TILs dans les tissus d'ostéosarcome	65

Figure 14 : Représentation schématique de l'évolution clonale de l'ostéosarcomagenèse ...	70
Figure 15 : Modèle d'évolution des tumeurs à partir des cellules souches cancéreuses (CSCs)	71
Figure 16 : Comparaison structurale entre la calpaïne-6 et les calpaïnes classiques	74
Figure 17 : Représentation schématique de la contribution de la calpaïne-6 au maintien des OSCs sous conditions hypoxiques.	76
Figure 18 : Régulation post-transcriptionnelle des facteurs YAP/TAZ	77
Figure 19: Le rôle de YAP sur le destin cellulaire	80
Figure 20 : Le rôle de la voie de signalisation non conventionnelle WNT5a/5b dans l'activation des effecteurs YAP/TAZ	81
Figure 21 : Schématisation du dispositif d'inserts	99
Figure 22 : les cellules Calp6-P-GFP+ ont des capacités migratoires accrues par rapport aux cellules GFP-	100
Figure 23: La calpaïne-6 stabilise le réseau de microtubules	101
Figure 24 : La calpaïne-6 contrôle l'organisation du réseau de vimentine	101
Figure 25 : La calpaïne-6 contrôle l'organisation du réseau d'actine	102
Figure 26 : Les cellules qui surexpriment la calpaïne-6 migrent plus vite et de manière ordonnée par rapport aux cellules sans calpaïne-6	103
Figure 27 : La co-culture des cellules avec ou sans la calpaïne-6 abolit le défaut de migration des cellules GFP-	104
Figure 28 : les populations cellulaires dépourvues de cellules qui expriment la calpaïne-6 ont des capacités migratoires réduites	105
Figure 29 : Les capacités migratoires des cellules sans calpaïne-6 sont améliorées par des facteurs produits par les cellules exprimant la calpaïne-6.	106
Figure 30 : La calpaïne-6 promeut la migration des cellules sans calpaïne-6 en régulant la communication cellulaire par l'intermédiaire de micro-vésicules.....	107
Figure 31 : Expression transcriptomique de la Calpaïne-6 dans des tumeurs osseuses et des tissus métastastiques de patients	108
Figure 32 : Représentation schématique du rôle de WEE1 dans contrôle de la transition G2/M	110
Figure 33 : La régulation réciproque de la calpaïne-6 et de YAP dans les OSCs	112

Figure 34 : Sites consensus capables de fixer YAP/TAZ dans la séquence régulatrice de la calpaïne-6	113
Figure 35 : Coupes de métastases pulmonaires provenant d'un modèle de tumeur osseuse et d'un modèle de tumeur disséminée	115
Figure 36: GSEA de différentes signatures de l'inflammation en fonction de l'expression de la calpaïne-6 dans les sarcomes moux et osseux.....	117
Figure 37: GSEA de la signature génique BIOCARTA en fonction de l'expression de la calpaïne-6 dans des sarcomes moux et osseux par rapport	118
Figure 38 : Les cellules exprimant la calpaïne-6 induisent la différenciation des macrophages vers un phénotype M2.	119
Figure 39 : Rôle de l'axe calpaïne-6/YAP dans le développement tumoral et métastatique des OS	120

INTRODUCTION



1- Ostéosarcomes

1-1- Epidémiologie

Les ostéosarcomes (OS) ou sarcomes ostéogéniques sont des tumeurs primaires osseuses de haut-grade d'origine mésenchymateuse et sont caractérisés par la production d'une matrice ostéoïde. Bien que rare (0,8-1,1/100000/an), ces cancers osseux sont les plus fréquents chez les moins de 20 ans. L'incidence est en hausse de 0,3% par an au cours de la dernière décennie. D'ailleurs, selon le programme SEER (Surveillance, Epidemiology and End Results) du National Cancer Institute, en 2021, plus de 3600 nouveaux cas seraient recensés dans le monde (<https://seer.cancer.gov/statfacts/html/bones.html>). **Les OS se différencient des autres sarcomes osseux tels que les sarcomes d'Ewing et des chondrosarcomes par leurs localisations, leurs caractéristiques biologiques et les populations de patients affectés** (Tableau 1).

Type de tumeur	Ratio homme/femme	Pic d'incidence (âge)	Localisations principales	Taux de survie
Ostéosarcomes	1,4	0,2-0,3/100 000/an (données générales) 0,8-1,1/100 000/an entre 15 et 19 ans	Métaphyses des os longs Extrémités distales du fémur Extrémités proximales du tibia/fabula (60%)	60-70% après 5 ans <30% après 5 ans (avec métastases pulmonaires)
Sarcomes d'Ewing	1,5	0,3/100 000/an	Os plats (60%) métaphyses des os longs (40%) et tissus mous	66% à 5ans et 20% à 5 ans chez les patients chimiorésistants
Chondrosarcomes	1	0,2/100 000/an	Pelvis, fémur, humérus proximal, scapula	50-60% à 10ans selon le grade histologique

Tableau 1 : Caractéristiques des trois principaux sarcomes osseux

Ce tableau reprend les principales caractéristiques permettant de différencier les trois principaux sarcomes osseux sur le plan clinique. D'après (« **Bone Sarcomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up** » 2012)

Ce sont des tumeurs intramédullaires qui surviennent principalement chez les jeunes hommes (ratio homme-femme de 1,4 :1), au niveau des métaphyses des os longs, de préférence à l'extrémité distale du fémur (figure 1). Cette zone correspond à l'emplacement de la plaque de croissance, le site le plus actif de l'os. Les atteintes du squelette axial et des os craniofaciaux sont moins fréquentes (Brown et al. 2018).

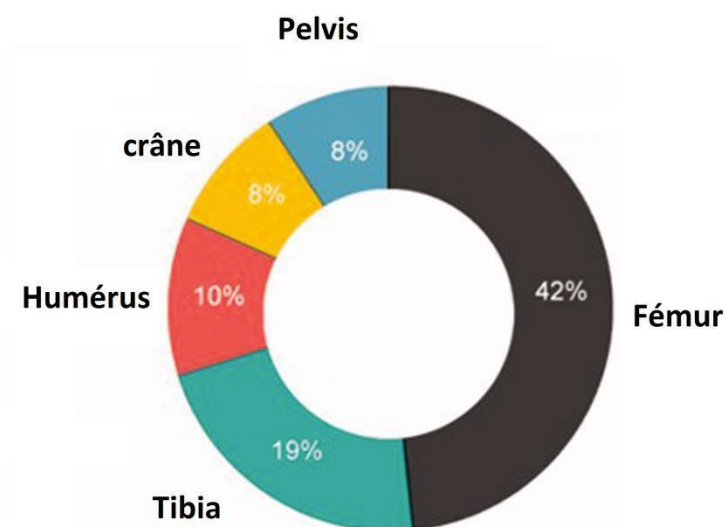


Figure 1: La distribution des OS sur le squelette

La majorité des OS se développent au niveau des fémurs et des tibias.

D'après (Sadykova et al.2020)

On observe un premier pic d'incidence chez les adolescents et les jeunes adultes, ce qui suggère un lien étroit entre la croissance osseuse rapide et le risque de former des tumeurs osseuses (Ottaviani et Jaffe 2009). Un deuxième pic d'incidence apparaît aux alentours de 65 ans. Ces tumeurs osseuses tardives sont souvent des récives développées après radiothérapie ou après certaines maladies osseuses comme la maladie osseuse de Paget et plus rarement, ces OS surviennent chez des patients atteints d'ostéochondroses multiples héréditaires ou de dysplasies fibreuses (« Bone Sarcomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up » 2012) (cancer.org | 1.800.227.2345).

Les OS sont fréquemment associés à une maladie disséminée. Selon le programme SEER, le taux de survie après 5 ans des patients est inversement corrélé à l'état de dissémination des tumeurs (Tableau 2). D'ailleurs, chez les patients avec une tumeur disséminée ce taux n'a pas

évolué depuis des décennies. Il est donc important de mieux comprendre la biologie des ostéosarcomes pour trouver des traitements efficaces.

Localisation de la tumeur	Taux de survie à 5 ans
Tumeur localisée	74%
Tumeur régionale	66%
Tumeur distante	27%
Toutes les localisations combinées	60%

Tableau 2 : Taux de survie après 5ans des patients ostéosarcomateux selon le stade de progression de la tumeur

Ce tableau représente le taux de survie après 5ans des patients selon l'état de dissémination de la tumeur. D'après le programme de Surveillance, d'Epidémiologie et de Résultats Finaux (SEER) (cancer.org | 1.800.227.2345)

- Une tumeur localisée est caractérisée par l'absence de cellules cancéreuses en dehors du site primaire.
- Une tumeur régionale correspond à la présence de cellules cancéreuses autour du site primaire et des nœuds lymphatiques.
- Une tumeur disséminée est caractérisée par la présence de cellules cancéreuses dans des sites distants de la tumeur primaire tels que les poumons.

1-2- Caractéristiques anatomorphologiques

Il existe plusieurs formes anatomorphologiques d'ostéosarcomes. **Radiologiquement il s'agit de tumeurs très agressives, avec appositions périostées, destruction de la corticale, et envahissement des parties molles.** La tumeur peut être purement lytique, condensante, ou le plus souvent mixte. On distingue des OS dits « conventionnels » et « non conventionnels ».

1-2-1- Les ostéosarcomes conventionnels

Les OS conventionnels sont composés à plus de 50% de cellules non différenciées. On observe une grande hétérogénéité intra tumorale avec des cellules de différentes formes (fusiformes, ovoïdes, rondes, mono ou multi nucléées, petites ou géantes) au sein d'une même tumeur. Ces tumeurs sont subdivisées en trois principaux sous-groupes (les plus fréquents) selon le type cellulaire prédominant et la nature protéique de la matrice extracellulaire (MEC) produite (« osteosarcome; cancer.org ») (figure 2). Selon la classification de Broder, les OS conventionnels sont classés comme des tumeurs de grade III ou IV et sont associés à un risque métastatique élevé (P.Anract et al. 2006).

- **Les OS ostéoblastiques**

La majorité des OS conventionnels (50% des cas) sont des OS ostéoblastiques. Ils sont à croissance rapide et sont les plus agressifs avec des cellules cancéreuses non différenciées à plus de 75%. Ils s'étendent à la surface de l'os et sont caractérisés par une matrice ostéoïde abondante formant un complexe trabéculaire (Figure 2A). En terme de marqueurs histologiques, les antigènes couramment exprimés dans les tumeurs sont SATB2, l'ostéocalcine, l'ostéonectine, l'ostéoprotégérine, RUNX2, la protéine S100, les actines et CD99 et la phosphatase alcaline (PAL) (Davis et Horvai 2016)

- **Les OS chondroblastiques**

Les ostéosarcomes chondroblastiques (25%) sont caractérisés par une matrice cartilagineuse rappelant l'ossification endochondrale qui présente des petits foyers ostéoïdes (Figure 2B). Ces derniers sont absents dans les formes les plus sévères d'OS chondroblastiques. Dans ce cas, pour différencier les OS chondroblastiques des chondrosarcomes, il faut identifier des mutations spécifiques des chondrosarcomes IDH1et2 (Kerr et al. 2013).

- **Les OS fibroblastiques**

Les ostéosarcomes fibroblastiques (Figure 2C) contiennent très peu de matrice voire pas du tout dans les formes indifférenciées. Ces formes sévères sont aussi appelées histiocytomes fibreux malins. Les OS fibroblastiques sont plutôt superficiels mais ils peuvent avec le temps, s'étendre en profondeur. Ils sont composés de cellules plutôt fusiformes.

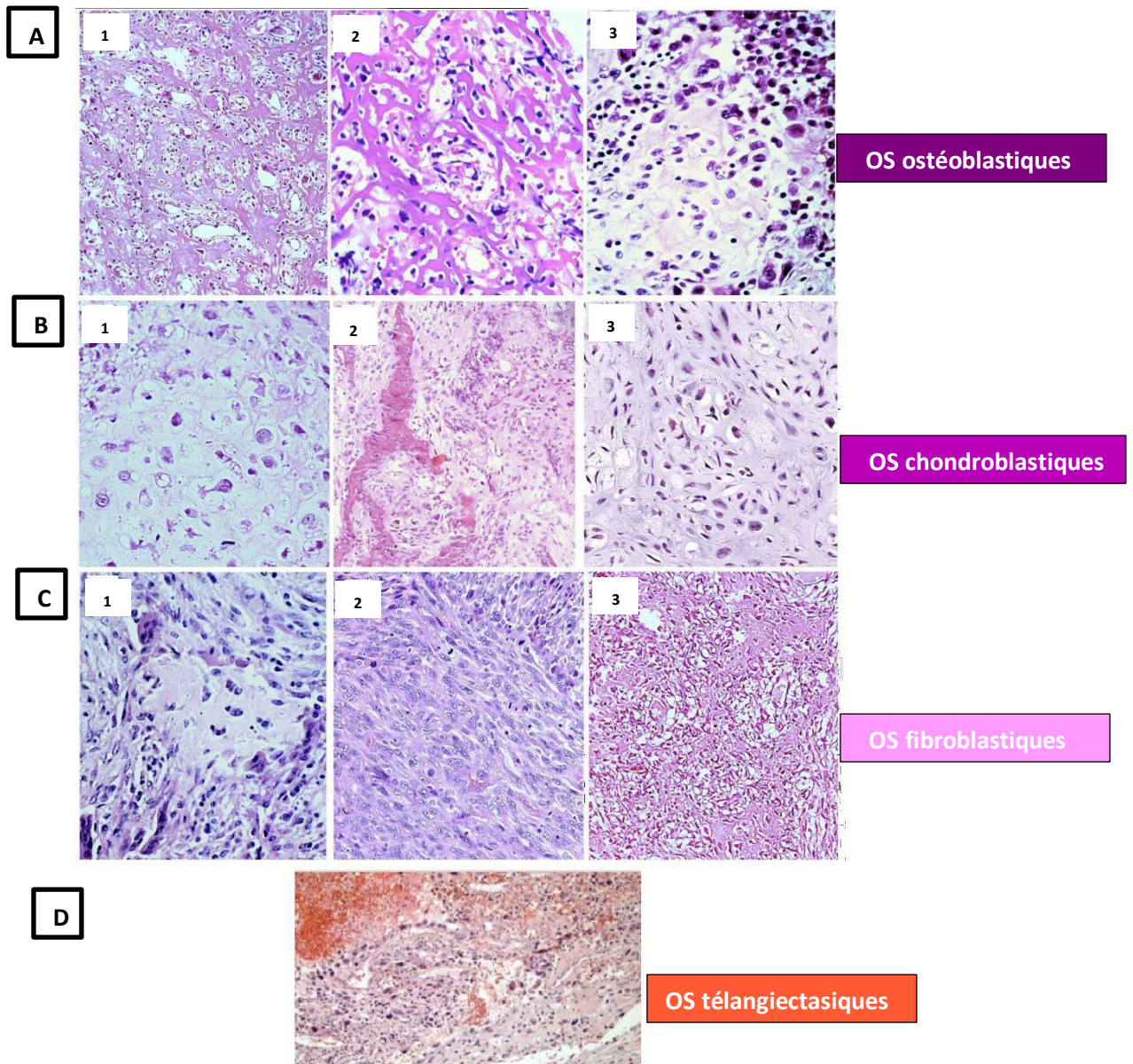


Figure 2: Les principaux sous- types histologiques d'ostéosarcomes

(A1/2) forme classique des OS ostéoblastiques avec une matrice ostéoïde abondante. (A3) : pléomorphisme prononcé.

(B1) OS chondroblastiques avec matrice cartilagineuse. (B2) OS chondroblastiques avec foyers ostéoïde.

(B3): Forme grave d'OS chondroblastiques sans matrice ostéoïde.

(C1) Les OS fibroblastiques avec présence de zones ostéoïdes. (C2) : forme indifférenciée. (C3): myosites ossifiantes immatures .

(D) OS télangiectasiques : cellules tumorales pléomorphes produisant des kystes remplis de sang et une matrice ostéoïde faiblement présente. Les patients présentent fréquemment des fractures pathologiques.

D'après <https://www.iheartpathology.net/> et (Roessner, Lohmann, et Jechorek 2021)

1-2-2- Les ostéosarcomes non conventionnels

Les OS non conventionnels sont moins fréquents et sont radiologiquement différents des OS conventionnels (Yarmish et al. 2010). Ils se divisent en deux grands groupes : les OS juxtacorticaux et médullaires (Figure 3) et présentent des formes bénignes et malignes.

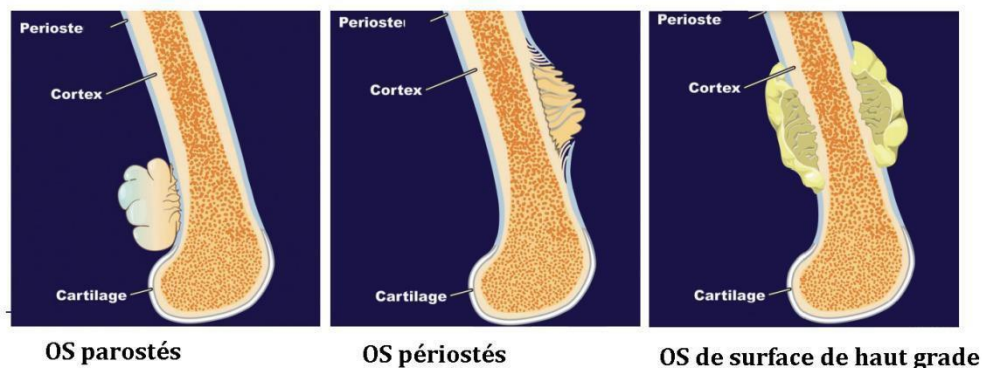
- Les OS juxtacorticaux

Ce sont des OS de surface qui sont principalement associés au périoste avec variables atteintes du canal médullaire. Ils se développent en général chez des personnes âgées. Dans cette catégorie, on retrouve des OS parostés, périostés et des OS de surface de haut grade (Figure 3). Ils sont associés à un meilleur pronostic vital que les OS conventionnels.

- Les OS médullaires

Ce sont des OS rares qui peuvent se développer chez les jeunes adultes. Dans cette catégorie, on retrouve les OS télangiectasiques qui sont des formes très vascularisées souvent épiphysaires, les OS à petites cellules et les OS centraux de faible grade. Les deux premiers sous-types sont des tumeurs plus agressives que les OS juxtacorticaux (Figure 3).

OS JUXTACORTICAUX



OS MEDULLAIRES

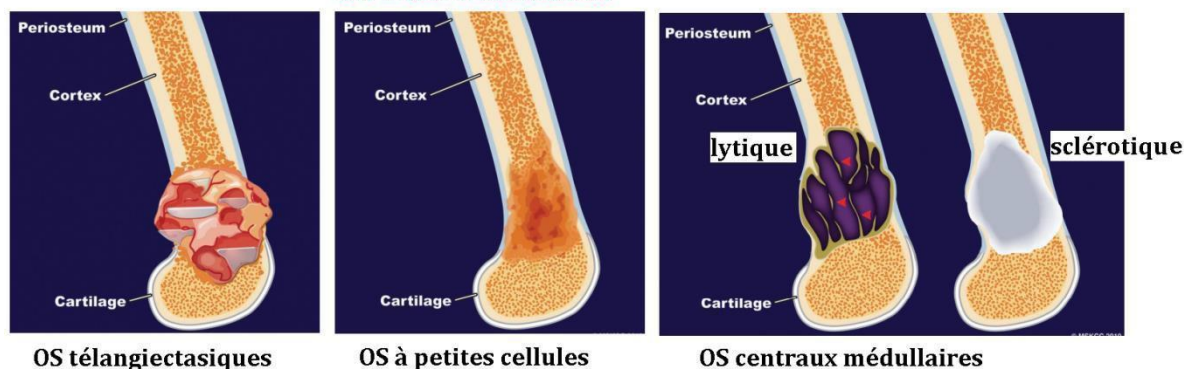


Figure 3: Représentation schématique des OS non conventionnels selon leur localisation sur l'os.

Les OS non conventionnels sont classés en deux groupes selon leur localisation : juxtacorticaux et médullaires.

Les OS parostés : ce sont les plus communs (5%) et se développent le plus souvent chez les personnes âgées. Ils proviennent de la couche fibreuse externe du périoste. Ils apparaissent sous forme d'une masse lobulée et exophytique avec une ossification centrale dense adjacente à l'os.

Les OS périostés : ils se développent dans 1,5% des cas et préférentiellement chez les personnes âgées. Ils sont localisés le plus souvent sur le tibia. Ils proviennent de la couche germinative interne du périoste et sont à prédominance cartilagineuse.

Les OS de surface de haut grade sont les moins fréquents des OS juxtacorticaux (0,4%). Ce sont de larges tumeurs allant jusqu'à 22cm et sont composés de cellules à fort potentiel mitotique.

Les OS télangiectasiques : ils représentent 1,2% à 7% des cas. Ils sont hémorragiques, kystiques ou nécrotiques avec très peu de tissu solide. Les cellules présentent un pléomorphisme nucléaire et un haut potentiel mitotique.

Les OS à petites cellules : ils apparaissent dans 1% des cas et sont souvent confondus aux sarcomes d'Ewing. Ils sont composés de petites cellules rondes avec des noyaux hyperchromatiques et peu de pléomorphisme. De plus ils présentent des calcifications et une matrice ostéoïde, contrairement aux sarcomes d'Ewing.

Les OS centraux de faible grade : ils apparaissent dans moins d'1% des cas et se développent dans le canal médullaire du fémur distal ou du tibia proximal. Ils sont composés d'une matrice osseuse microtrabéculaire dans un stroma fibreux avec une production osseuse variable. Ils sont principalement lytiques mais peuvent présenter un motif sclérotique dense. D'après (Yarmish et al. 2010)

1-3- Etiologie des ostéosarcomes

L'étiologie des ostéosarcomes est extrêmement hétérogène et complexe et n'est pas bien comprise à ce jour (Martin, Squire, et Zielenska 2012) . La plupart des cas sont sporadiques (95% des cas) ; cependant, certaines mutations de la lignée germinale représentent des facteurs de risque au développement des ostéosarcomes. Pour expliquer l'hétérogénéité

intra-tumorale des OS, il faut prendre en compte les trois notions de développement tumoral : les altérations génétiques, le type de cellules d'origine et l'influence du microenvironnement.

1-3-1- Altérations géniques- Gènes conducteurs

Les OS sont différenciés par le nombre et le type de mutations. On parle de « gènes conducteurs » de l'ostéosarcomagénèse (Rickel, Fang, et Tao 2017). Des mutations sur ces gènes confèrent aux cellules un avantage clonal conduisant à un développement tumoral. Ces gènes conducteurs sont divisés en deux groupes : **les oncogènes actifs et les suppresseurs de tumeurs inactifs** (STI). Pour étudier ces gènes et les mutations associées, de nouvelles techniques de criblage ont été mises en place ; notamment les méthodes de séquençage de nouvelle-génération, incluant des séquençages du génome entier (WGS) ; des exomes (WEG) et des ARNs.

1-3-1-1- La Recherche de gènes conducteurs

Depuis des décennies, la recherche se concentre essentiellement sur l'identification des gènes conducteurs pour apporter des solutions plus efficaces au traitement des cancers. Dans le cas des OS, le gros problème qui se pose est le manque d'échantillons humains dû à la faible incidence de ces tumeurs, mais aussi la faible représentativité des différents sous-groupes d'OS (majoritairement ostéoblastiques et chondroblastiques) (Perry et al. 2014 ; Kovac et al. 2015). Toutefois, grâce aux nouvelles générations de criblage nécessitant de moins en moins d'échantillons, un catalogue de gènes conducteurs des OS a pu être établi. Selon la fréquence à laquelle ils sont mutés dans un cancer donné, les oncogènes sont classés en trois groupes : « les montagnes » avec une fréquence supérieure à 20%, « les collines » et « les queues » avec des fréquences de 2% à 20% et moins de 2%, respectivement (Tableau 3).

Gènes	Voies de signalisation	Fréquences
ONCOGENES		
GNAQ	PI3K-mTOR; RAS; MAPK	4/20.
JAK1	IFN	jusqu'à 2/20
MAML2	Notch	1/34.
ALK	PI3K-mTOR; RAS	jusqu'à 2/20
PDGFRA	PI3K-mTOR; RAS	jusqu'à 3/20
PIK3CA	PI3K-mTOR	jusqu'à 5/20
CCNE1	Cycle cellulaire/apoptose	2/20 .
COPS3	Cycle cellulaire/apoptose	4/20.
SUPPRESSEURS DE TUMEURS		
SMAD4	TGF-beta	2/34.
Runx1	Reégulation transcriptionnelle	1/34.
RB1	Cycle cellulaire/apoptose	jusqu'à 61%
CDKN2A DNA	Cycle cellulaire/apoptose ; réparation de l'ADN	jusqu'à 15% SNCA
TP53	Cycle cellulaire/apoptose ; réparation de l'ADN	jusqu'à 90%
BRCA1/2	réparation de l'ADN	jusqu'à 91% SCNA
ATRX	modification de la chromatine	jusqu'à 10/20.
PTEN	PI3K-mTOR	jusqu'à 50% SNCA

Tableau 3 : Listes des mutations somatiques associées aux « gènes driver » des cancers

Ce tableau liste les différents gènes driver et les voies de signalisation associées. La liste n'est pas exhaustive. D'après des études génomiques de (Perry et al. 2014; Kovac et al. 2015; X. Chen et al. 2014).

Dans les OS, parmi les gènes fréquemment mutés on retrouve p53, Rb, CDKN2A et PTEN (Berman et al. 2008 ; Walkley et al. 2008 ; Freeman et al. 2008). Chez les patients atteints respectivement du syndrome de Li-Fraumeni, d'un rétinoblastome héréditaire, du syndrome de Rothmund-Thomson, Bloom ou Werner, les gènes mutés associés à un développement d'OS syndrome de Rothmund-Thomson, Bloom ou Werner, les gènes mutés associés à un développement d'OS sont p53, Rb, RECQL4, BLM et WRN (Tableau 4).

Gènes muté	Syndrome	Phénotype
P53	syndrome de Li-Fraumeni	le plus fréquent incluant le cancer du sein, les leucémies, le cerveau... 3% des OS
RB1	Rétinoblastome héréditaire	tumeur de la rétine survenant dans l'enfance. 12,1% des OS
RECQL4	Syndrome de Rothmund-Thomson	Poikilodermie, petite taille, chevelure clairsemée, squelette anormal, accélération du vieillissement. 32% dans les cohortes d'OS.
BLM (RECQL2)	Syndrome dermatologique de Bloom	photosensibilité, érythème télangiectasique et tumeurs malignes du tractus gastro-intestinal, des organes génitaux et des voies urinaires. Les patients ont des voix aiguës, une statue courte et une réduction de la graisse sous-cutanée. Forte incidence des OS
WRN(RECQL3)	Syndrome de Werner	Vieillesse accélérée commençant dès l'adolescence. 7,7% des OS.

Tableau 4 : Les syndromes génétiques héréditaires associés au développement d'OS

Ce tableau liste les différentes mutations génétiques associées au développement des OS.

D'après (Rickel, Fang, et Tao 2017)

Les altérations géniques associées au développement d'un OS sont le plus souvent sporadiques. Elles pourraient résulter de mutations ponctuelles qui incluent des substitutions de base unique, des insertions ou des suppressions de petits segments d'ADN. Mais les OS sont surtout caractérisés par des variations structurelles (SV) de la chromatine qui comprennent des réarrangements sur le même chromosome ou des translocations entre chromosomes des suppressions ou des duplications qui conduisent à des altérations du nombre de copies somatiques (SCNA). L'augmentation du nombre de copies est plutôt activatrice tandis que la réduction du nombre de copies ou la perte d'un fragment d'ADN peut inactiver un gène suppresseur de tumeur. En se basant sur 34 échantillons d'OS, Chen et al ont démontré par WGS que les OS ont le nombre le plus élevé de mutations ponctuelles et de SV comparées aux autres cancers pédiatriques (X. Chen et al. 2014). D'autres équipes comme Perry et al ont confirmé que les OS ont l'incidence la plus élevée de mutations somatiques avec une médiane de 230 réarrangements par tumeur et que les SCNA affectent jusqu'à 87% du génome des OS (Perry et al. 2014; Kovac et al. 2015). Parmi les réarrangements chromosomiques les plus fréquents on trouve des gains de copies dans les régions 6p12.3,

8q24.3, 12q13.11, 17p11.2 et 19q12 et des délétions aux loci 2q21.2 et 6p22.31 (Wang et al, 2018).

Les nouvelles générations de séquençage ont permis de révéler des évènements génétiques d'une complexité supérieure aux « mutations classiques » notamment des évènements de type chromothripsis c'est à dire des réarrangements génomiques massifs et des hypermutations localisées (kataegis) (Stephens et al. 2011). Une étude a montré que ces évènements sont fréquents puisqu'ils sont présents dans 50 à 85% des prélèvements humains d'OS analysés (Perry et al. 2014). Ces phénomènes sont complètement différents d'une acquisition graduelle/ progressive de mutations classiquement décrites. La chromothripsis est associée aux mutations de P53 mais un lien direct avec l'ostéosarcomagenèse reste à prouver. Par ailleurs, il a été montré que la régulation des télomères contribue à l'intégrité génomique des cellules. Or , les cellules d'OS ont des télomères plus grandes et une activité ALT élevée suggérant une possible implication de cette voie dans la complexité génomique des OS (Selvarajah et al. 2006). Un autre facteur dans l'induction de la chromothripsis est le rayonnement ionisant (Morishita et al. 2016). Une impulsion de rayonnement ionisant induit un cycle de réarrangements massifs de l'ADN. Plus le rayonnement est fort, plus les dommages sont importants. Cela explique pourquoi l'induction d'OS par des radiations chez les humains ou les animaux est dose-dépendante. On estime que le rayonnement ionisant cause jusqu'à 3 % des cas d'OS et la majorité des cas d'OS secondaires. Ces OS peuvent apparaître jusqu'à 30 ans après exposition car si une seule cellule acquiert une mutation pilote à partir d'un tel évènement, ce clone présentera alors une période de latence considérable. Une fois de plus, toutes ces études témoignent de la complexité de la biologie des OS. Malgré cette description détaillée des altérations génomiques associées aux OS, à ce jour, aucune cible thérapeutique n'a pu être déduite ou ne s'est révélée pertinente pour diminuer la mortalité. Probablement à cause de la complexité et l'implication de multiples gènes plutôt qu'un oncogène unique. De nombreuses études ont mis en évidence l'importance d'un autre niveau de régulation et ont montré des altérations de la régulation épigénétique de certains gènes qui confèrent aux cellules un avantage prolifératif (Vogelstein et al. 2013).

1-3-1-2- La régulation épigénétique de l'ostéosarcomagenèse

L'épigénétique est définie comme les modifications héréditaires ou non de l'expression des gènes qui ne sont pas causées par une altération de la séquence d'ADN en elle-même. Contrairement aux altérations génétiques qui sont immuables, les modifications épigénétiques sont réversibles (Jones et Baylin, 2007). Cette propriété est d'ailleurs utilisée en thérapie contre les cancers. La régulation épigénétique de l'ostéosarcomagenèse est assurée par l'acétylation ou la méthylation des gènes driver. Il peut s'agir de modifications de la chromatine ou des histones et par l'action de différents ARNs non codants.

1-3-1-2-1- Méthylation/ Hypoacétylation des gènes conducteurs

Les patients présentant des altérations du gène Rb ont un risque élevé de développer un OS. Di Fiore et al, ont montré que l'hyperméthylation du gène Rb contribue à la pathogenèse de plusieurs tumeurs solides telles que les rétinoblastomes (Di Fiore et al. 2013). Dans les U2OS, il a été montré que les promoteurs des gènes p16^{INK4a} et p14^{ARF} sont méthylés ; et la méthylation de ces gènes dans les tumeurs est associée à un mauvais pronostic vital pour les patients (J. H. Oh et al. 2006). Par ailleurs, Badal et al, ont montré que le promoteur de p14^{ARF} dans les U2OS est méthylé à plus de 99% et l'utilisation d'un agent déméthylant peut permettre d'induire l'entrée en sénescence des cellules tumorales (Badal et al. 2008). Dans plusieurs cancers, il a été montré que l'expression de p21 est réprimée par hypoacétylation des histones (Mitani et al. 2005). Dans les OS, il a été montré que l'inhibition de p21 dans les U2OS passe par la méthylation des arginines des histones (Kleinschmidt et al. 2012). Dans les modèles in vivo, il a été montré que l'inhibition du promoteur WIF-1 par hyperméthylation est liée au développement spontané des OS induit par radiation (Kansara et al. 2009). Concernant les oncogènes, il n'y a pas de preuves que l'activation épigénétique de ces gènes joue un rôle fondamentale dans l'étiologie des tumeurs comparée à l'inhibition des gènes suppresseurs (B. Li et Ye 2014).

1-3-1-2-2- Les ARNs non codants

Les ARNs non codants qui ciblent les gènes conducteurs, sont impliqués dans la tumorigénèse de plusieurs cancers. Il s'agit principalement des microARNs. Dans les OS, ces microARNs sont impliqués dans diverses voies de signalisation comme MAPK, Notch, WNT et RAS (J. Yang et Zhang 2013). Il a été récemment démontré qu'un certain nombre de microARNs suppresseurs

de tumeur étaient sous exprimés dans les OS. Notamment, miR-34, dont l'hyperméthylation est associée au développement métastatique (He et al. 2009). MiR-335 et 340 sont inhibés par régulation épigénétique dans les OS et dans d'autres cancers comme les neuroblastomes (Das et al. 2013). MiR-29a est surexprimé dans les OS et affecte la méthylation de l'ADN et l'apoptose (Namløs et al. 2012). Les microARNs qui régulent les oncogènes au niveau épigénétique ne sont pas directement liés à l'initiation des tumeurs.

Récemment, il a été montré que les ARNs circulaires (circARNs) jouaient un rôle crucial dans l'initiation et la progression des tumeurs (Z. Li et al. 2021). Les circARNs sont des ARNs simple brin qui forment des boucles fermées de manière covalente. Ce sont des régulateurs importants du génome dont l'action passe par la régulation de la transcription, l'épissage alternatif et la liaison directe avec l'ADN. Dans les OS, les circARNs jouent un rôle important dans l'initiation et la progression des tumeurs (Yong Zhang et al. 2019). Des analyses de profils d'expression ont permis d'identifier les circARNs impliqués dans la progression des OS en utilisant des puces à ARN et le séquençage du génome entier (Tableau 5).

OS CircARNs	Régulation	Cible	Fonctions	Gènes associés	Rôle
circTCF25	surexprimé	miR-206	Prolifération, migration	MEK/ERK/AKT/mTOR	Oncogène
CircPVT1	surexprimé	miR-205-5p; miR-526b	Invasion, EMT	c-FLIP/FOX C2	Oncogène
circTADA2A	surexprimé	miR-203a-3p	Métastases, migration, invasion	CREB3	Oncogène
Circ_001621	surexprimé	miR-578	Prolifération, migration,	VEGF CDK4 MMP9	Oncogène
Circ-0000285	surexprimé	miR-599	Prolifération, migration, colonie	TGF-β	Oncogène
circMYO10	surexprimé	miR-370-3p	EMT, croissance	RUVBL1, β-catenin, LEF1	Oncogène
circLRP6	surexprimé		invasion, migration, cycle cellulaire, apoptose	EZH2, LSD1,	Oncogène
Circ_0000190	inhibé	miR-767-5p	Prolifération, migration, invasion		Suppresseur de tumeurs
circ-LARP4	inhibé	miR-424	Chimiosensibilité		Suppresseur de tumeurs
Circ-ITCH	inhibé	miR-7, miR-2	Prolifération, migration, invasion	MEK,ERK	Suppresseur de tumeurs

Tableau 5 : les circARNs impliqués dans l'initiation et la progression des OS

Les circARNs impliqués dans l'initiation et la progression des OS peuvent agir comme des oncogènes ou des suppresseurs de tumeurs. La liste n'est pas exhaustive. D'après (Z. Li et al. 2021).

1-3-2- La cellule d'origine

L'hétérogénéité des OS pourraient aussi trouver une explication en considérant le type de cellules qui sont transformées à l'origine des OS. Deux théories sur l'origine cellulaire des OS s'opposent : celle impliquant des cellules souches mésenchymateuses (CSMs) et celle mettant en jeu des cellules ostéoblastiques plus différenciées (Figure 4)((Sadykova et al. 2020).

1-3-3-1- Les Cellules Souches Mésenchymateuses (CSMs)

L'hypothèse que les cellules transformées à l'origine des OS sont des CSMs se base sur des études qui ont montré que l'on pouvait induire la transformation de CSMs humaines et murines en cellules de sarcomes (Rodriguez, Rubio, et Menendez 2012; Xiao et al. 2013). Chez la souris, il a même été observé des cas de transformation spontanée de CSMs en OS (Xiao et al. 2013). Les CSMs sont une population relativement hétérogène pouvant s'engager dans différentes voies de différenciation pour devenir des progéniteurs de différentes lignées. Ainsi, les CSMs seraient à l'origine de différents types de sarcomes notamment des sarcomes d'Ewing (Rodriguez, Rubio, et Menendez 2012). Il a été montré que l'incidence des OS issus de la transformation de CSMs est assez faible et dépend fortement de l'environnement (Roessner, Lohmann, et Jechorek 2021) (Figure 4B). Cette faible incidence des CSMs pour les cellules d'OS a été démontré en utilisant un modèle transgénique de souris Prx1-Cre p53^{fl/fl} et pRb^{fl/fl} (Lin et al. 2009).

1-3-3-2- Les ostéoblastes

Des données récentes montrent l'implication possible de précurseurs ostéoblastiques tardifs ou d'ostéoblastes matures dans l'ostéosarcomagenèse. Contrairement aux CSMs, toutes les études ont été faites *in vivo*, en comparant l'effet de la délétion de p53 à différents stades de l'engagement dans la différenciation ostéoblastique. Tao et al, ont montré que la stimulation de la prolifération des ostéoblastes immatures par l'expression conditionnelle de Notch1 entraînait une ostéosarcomagenèse (J. Tao et al. 2014). Lee et al ont réussi maintenir la tumorigenèse des OS *in vivo* à partir de xéno greffes humaines (D.-F. Lee et al. 2015). De plus, la délétion de p53 sous le contrôle de promoteurs tardifs comme celui de l'ostéocalcine, a permis d'induire avec une forte incidence des OS chez la souris. Ces promoteurs étant plus efficaces comparés à des promoteurs plus précoces comme ceux d'Osterix ou du Col1a1 (Mutsaers et al. 2013). Ainsi, à partir d'ostéoblastes plus ou moins matures, on obtient des OS de façon plus efficace (Mutsaers et Walkley 2014) (Figure 4A).

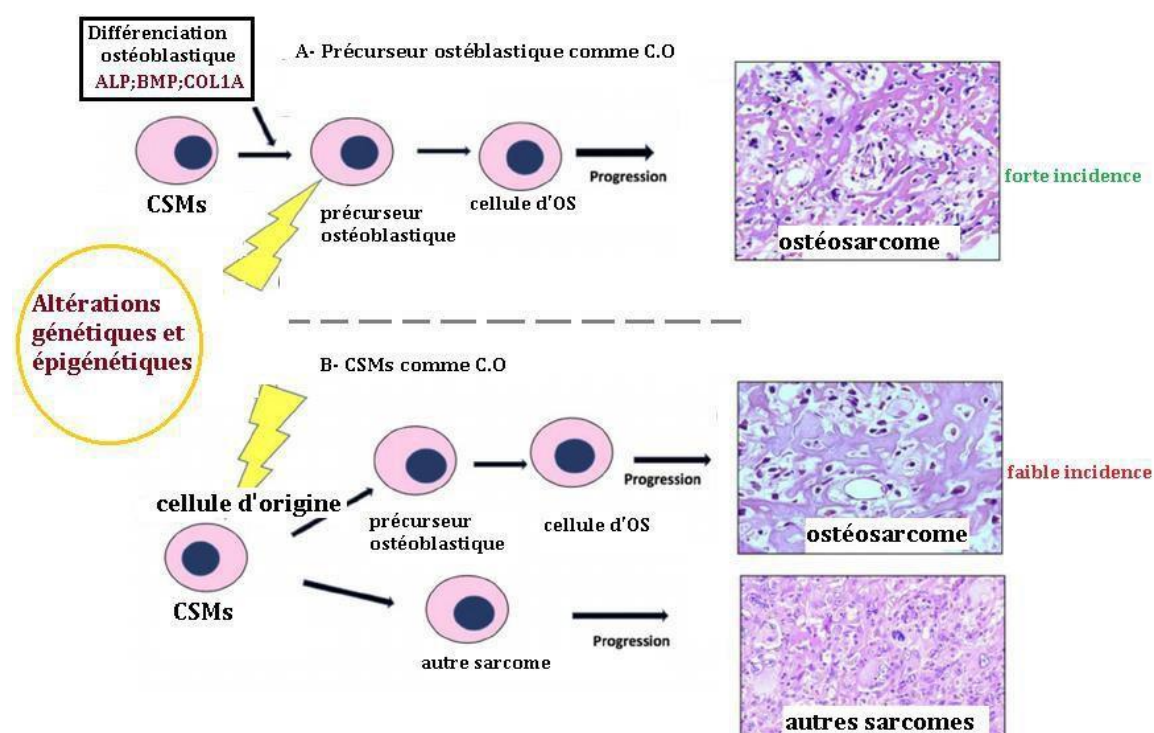


Figure 4 : Les cellules d'origine des OS

A : Les mutations qui se produisent sur des progéniteurs ostéoblastiques entraînent dans la quasi-totalité des cas un développement des OS. B : Quand les mutations surviennent sur des CSMs, l'incidence des OS est diminuée. D'après (Roessner, Lohmann, et Jechorek 2021) .

1-3-3- L'Influence du microenvironnement

Les théories du « seed and soil » (Paget) et de la « tissue tension » (Triolo) ont conceptualisé cette idée que le développement tumoral est largement dépendant de l'environnement. De plus, il a été largement documenté que la perte de l'homéostasie tissulaire est un événement majeur dans l'apparition des cancers et joue un rôle important dans la progression tumorale et métastatique (Yuhua Zhang et al. 2014; Saviola et al. 2016). La difficulté à reproduire la maladie humaine chez la souris renforce l'idée que les altérations géniques ne peuvent pas toutes seules expliquer la survenue des OS. Les OS se développent dans un ensemble de niches osseuses, vasculaires et immunitaires comprenant des cellules, des matrices extracellulaires (MEC) et des facteurs solubles particuliers qui peuvent jouer des rôles importants pour supporter la croissance tumorale (Brown et al. 2018). Le fait que les OS surviennent principalement chez des patients en croissance et donc dans des os hyper dynamiques indique aussi que la physiologie du tissu hôte influence la survie des cellules transformées. Pourtant, à ce jour les conditions ou les facteurs environnementaux qui pourraient contribuer à l'initiation des OS ne sont pas bien connus. Néanmoins, des études récentes ont montré que l'hypoxie participe à l'hétérogénéité des OS en augmentant les phénomènes de chromothripsis (Smida et al. 2017). Cette instabilité génomique est liée à la dérégulation du microARN miR-133a (W. Yang et al. 2020).

1-3-3-1- L'inflammation et l'initiation des tumeurs

Initialement, la présence de leucocytes au sein des tumeurs, observée au 19^e siècle par Rudolf Virchow, a fourni la première indication d'un lien possible entre inflammation et le développement des cancers (Karin 2006). Aujourd'hui, plusieurs études ont démontré l'implication de l'inflammation dans l'initiation mais surtout dans la progression des cancers. En effet, les réponses inflammatoires conduisent à l'accumulation de mutations et à divers changements épigénétiques dans les cellules environnantes (Greten et Grivennikov 2019). Les macrophages et les neutrophiles sont de puissants producteurs d'espèces réactives d'oxygène (ROS) et d'azote (RNI) qui induisent des mutations. Ainsi, l'induction de l'inflammation peut conduire à une mutagenèse accrue. Dans les cellules épithéliales intestinales, il a été montré que l'inflammation chronique conduit à l'accumulation de mutations sur le gène Tp53 et à la formation de tumeurs (Robles et al. 2016). Les cytokines inflammatoires telles que l'IL-22 peuvent également induire l'expression de gènes de réponse aux dommages de l'ADN (DDR)

en réponse à une éventuelle agression génotoxique (Gronke et al. 2019). De plus, des cytokines telles que IL-6, TNF α , IL-1 β activent des modifications épigénétiques des oncogènes et suppresseurs de tumeurs via la modulation de l'ADN et des histones (Dnmt1, Dnmt3, DOTL1), et des miARN et lncRNA (Grivennikov 2013). Schwitalla et al, ont montré que les réponses inflammatoires peuvent déclencher la dédifférenciation et l'acquisition d'un phénotype de cellules souches dans le cancer de l'intestin (Schwitalla et al. 2013). Dans les OS, il n'y a pas de données factuelles sur l'implication de l'inflammation dans l'étiologie des tumeurs.

1-4- Prise en charge et Traitement

1-4-1- Classification

Une étape importante pour la prise en charge des patients est la classification des ostéosarcomes (Sadykova et al. 2020). A ce jour, deux systèmes sont couramment utilisés (cancer.org | 1.800.227.2345).

1-4-1-1 Le système MSTS

Connu sous le nom de système Enneking, il décrit 3 stades d'évolution de la tumeur (Tableau 6) et se base sur le grade de la tumeur, son extension locale et la présence ou non de métastases.

- Le grade (G) est défini après l'évaluation de l'état d'anaplasie des cellules cancéreuses. Les cellules dans les tumeurs de bas grade (G1) sont bien différenciées avec une atypie cytologique modérée. Elles ont des capacités mitotiques faibles et disséminent peu. Contrairement aux cellules des tumeurs de haut grade (G2) qui sont peu différenciées avec des capacités mitotiques et un rapport cellules/matrice élevés.
- L'étendu de la tumeur primaire (T) qui peut être intracompartimentale (A-T1 : dans l'os) ou extracompartimentale (B-T2 : au-delà).
- L'état de dissémination (M) qui définit deux types de tumeurs. Une tumeur qui n'atteint pas les nœuds lymphatiques (M0) et une tumeur qui métastase (M1).

Ainsi, nous avons donc des tumeurs de bas-grade I (G1 / T1ouT2/ M0), des tumeurs de haut-grade II (G2/T1ouT2/M0) et des tumeurs disséminées III (M1).

Stade	Grade	Localisation	Métastases
IA	G1 (bas)	T1 (tumeur localisée)	M0 (absence de métastases)
IB	G1 (bas)	T2 (tumeur régionale ou extracompartmentale)	M0 (absence de métastases)
IIA	G2 (haut)	T1 (tumeur localisée)	M0 (absence de métastases)
IIB	G2 (haut)	T2 (tumeur régionale ou extracompartmentale)	M0 (absence de métastases)
III	G1 ou G2	T1 ou T2	M1 (présence de métastases sur le même site ou sur un site distant)

Tableau 6 : Classification selon le système Enneking's

Cette classification décrit trois types de tumeurs: des tumeurs de bas-grade I (G1 / T1ouT2/ M0), des tumeurs de haut-grade II (G2/T1ouT2/M0) et des tumeurs disséminées III (M1). D'après (Raza et al. 2020)

1-4-1-2 La classification des tumeurs osseuses selon l'AJCC

Ce système est utilisé par l'American Joint Commission on Cancer (AJCC). Il décrit 4 stades d'évolution de la tumeur en se basant sur le grade, la taille, et la localisation des métastases (Kundu 2014) (Tableau 7). Les cancers de stades I (bas grade) et II (haut grade) ne métastasent pas, bien qu'on observe dans ces groupes des tumeurs de grande taille. Les tumeurs de stade III sont caractérisées par des métastases « discontinues » le long de l'os. Dans le groupe des tumeurs de stade IV, on distingue celles avec des métastases pulmonaires de celles avec des métastases dans d'autres organes distants.

Stade	Grade	Taille de la tumeur	Métastases
IA	bas	inférieur à 8cm	absence de métastases
IB	bas	supérieur à 8cm	absence de métastases
IIA	haut	inférieur à 8cm	absence de métastases
IIB	haut	supérieur à 8cm	absence de métastases
III	bas ou haut	inférieur ou supérieur à 8cm	petites métastases osseuses
IV A	bas ou haut	inférieur ou supérieur à 8cm	métastases pulmonaires
IV B	bas ou haut	inférieur ou supérieur à 8cm	métastases dans des sites distants

Tableau 7 : Classification selon l'AJCC

La classification selon l'American Joint Commission on Cancer (AJCC) décrit 4 stades d'évolution de la tumeur en se basant sur le grade, la taille, et la localisation des métastases D'après (Kundu 2014)

Ces classifications témoignent de l'hétérogénéité des OS et donc de la difficulté de les prendre en charge. Actuellement, les ostéosarcomes sont traités par combinaison de chimiothérapie néoadjuvante (pré-opératoire), chirurgie et chimiothérapie adjuvante postopératoire (Lindsey, Markel, et Kleinerman 2017).

1-4-2 Traitements

1-4-2-1 La Résection chirurgicale

L'excision chirurgicale implique généralement une résection tumorale avec des marges négatives, car plusieurs études ont associé des marges positives à un risque accru de récives locales et un taux de survie inférieure (Bertrand et al. 2016). Chez les patients atteints d'une maladie disséminée, la résection complète des métastases pulmonaires est vitale lorsque cela est possible (Redondo et al. 2013). En effet, il a été démontré que la métastectomie pulmonaire prolonge de manière significative la survie de cette population (Briccoli et al. 2005; Rusch 1995). Ainsi, dans la mesure du possible, la résection chirurgicale d'une maladie récurrente est un traitement de première intention.

1-4-2-2 La Radiothérapie

La radiothérapie peut être utilisée pour aider à éliminer ou à minimiser la maladie résiduelle lorsqu'une résection chirurgicale n'est pas possible (DeLaney et al. 2005) ou que son emplacement est à risque. Cependant, les ostéosarcomes sont considérés comme radiorésistants.

1-4-2-3 Les Chimiothérapies conventionnelles

Les chimiothérapies modernes sont dites 'multi-agents' car elles combinent deux à sept agents thérapeutiques (Geller et Gorlick 2010) ; (Kudawara et al. 2013). Les 3 médicaments ayant une activité reconnue sont le cisplatine, la doxorubicine, le méthotrexate administré à forte dose et combiné à la leucovorine et l'isofosfamide avec ou sans étoposide. Anninga et al. 2011 ont montré dans une méta-analyse que l'utilisation de trois médicaments chez les patients, donnait des résultats supérieurs à la combinaison de deux médicaments. De plus, l'utilisation de quatre médicaments n'avaient aucun avantage (Ferrari et al. 2012). Ainsi, la chimiothérapie multi-agents MAP (combinant cisplatine, doxorubicine et methotrexate) est le traitement de première intention et la norme de soins à l'heure actuelle.

Son objectif est d'induire la nécrose d'au moins 90% de la tumeur avant la résection chirurgicale. Les effets de la chimiothérapie (% de cellules nécrotiques au moment de la résection) servent pour affiner le pronostic clinique et éventuellement à modifier la prise en charge post-opératoire (Picci et al. 1985). La chimiothérapie néoadjuvante augmente considérablement la survie sans récurrence (RFS) des patients atteints d'une maladie non métastatique. Chez un certain nombre de patients notamment ceux avec des métastases, la plupart des chimiothérapies conventionnelles entraînent des réponses thérapeutiques médiocres. Ce constat a conduit au développement de nouvelles approches thérapeutiques.

1-4-2-4 Les Nouvelles approches thérapeutiques

1-4-2-4-1 Nouvelle formulation des agents chimiothérapeutiques

Afin de réduire sa cardiotoxicité, des formulations liposomales de doxorubicine ont été conçues et présentent une efficacité similaire à la doxorubicine conventionnelle (Xing et al. 2015). La doxorubicine liposomale est actuellement testée en phase I dans des tumeurs

solides pédiatriques réfractaires. La formulation liposomale peut également être utilisée pour moduler des profils pharmacologiques de médicaments tels que l'irinotécan pour lequel sa pharmacologie a probablement limité son activité clinique. Le bénéfice positif des liposomes de sucrosolate d'irinotécan a été démontré dans un modèle de xénogreffe de sarcome d'Ewing et est évalué dans un essai de phase (NCT02013336) (Kang et al. 2015). (Figure 5).

1-4-2-4-2 Inhibiteurs de la tyrosine kinase

Les cellules cancéreuses dites « quiescentes » sont insensibles aux agents cancéreux cytotoxiques (Mitchison 2012) et peuvent être réactivées dans un microenvironnement favorable (Avnet et al. 2017). Ainsi, la rupture du dialogue entre les cellules cancéreuses et leur microenvironnement est une approche thérapeutique prometteuse dans les sarcomes osseux. Les cytokines ou les récepteurs tyrosine kinase sont des facteurs contrôlant la migration, la survie et la croissance cellulaire (Ségaly et al. 2015a). Le régorafénib, un inhibiteur oral de multiples kinases et ciblant des facteurs angiogéniques (VEGFR1-3, TIE2), des kinases oncogéniques (KIT, RET, RAF) et le pazopanib inhibant le VEGFR, PDGFR et cKIT sont en cours d'évaluation dans l'ostéosarcome. Le régorafénib a montré son activité antitumorale dans un essai clinique de phase I (Mross et al. 2012). Une phase II est en cours et comprendra 126 patients traités quotidiennement avec 160 mg de régorafénib par voie orale. De même, l'erlotinib ciblant l'EGFR, le cabozantinib bloquant le cMET et l'entrectinib, un inhibiteur sélectif de TrkA, B et C, l'oncogène 1 et l'ALK C - ros sont également en phase II dans les tumeurs rares, y compris le sarcome d'Ewing.

1-4-2-4-3 Radiothérapie osseuse ciblée

Le radium - 223 (^{223}Ra) est un composé radiopharmaceutique émetteur alpha qui présente des propriétés calimimétiques et, par conséquent, possède des propriétés intrinsèques de ciblage des tissus calcifiés. Une première étude a montré les effets bénéfiques du radium-223 dans le traitement de l'ostéosarcome avec une réduction de la douleur osseuse et du remodelage osseux après traitement (Subbiah, Anderson, et Rohren 2015).

1-4-2-4-4- Le ciblage de la réparation de l'ADN

La poly (ADP-ribose) polymérase 1 (PARP1) est une protéine clé impliquée dans la réparation des ruptures simple brin de l'ADN. En 2012, Garnett et al. ont démontré une sensibilité élevée des cellules du sarcome d'Ewing aux inhibiteurs de PARP (Garnett et al. 2012). Des études précliniques ont démontré un avantage prometteur lors de la combinaison d'inhibiteurs de PARP avec d'autres voies de ciblage (comme l'inhibition de l'IGF1) et ont justifié plusieurs essais cliniques de phase I (NCT01858168, NCT02044120) (van Maldegem et al. 2016). En 2015, Kovac et al. a étudié 31 échantillons d'ostéosarcome par séquençage d'exosomes et a montré pour la première fois des signatures récurrentes de mutation de déficit en BRCA (Kovac et al. 2015). Cette observation pourrait être un excellent argument pour évaluer l'efficacité thérapeutique des inhibiteurs de PARP dans l'ostéosarcome et les essais cliniques sont en discussion.

1-4-2-4-5- Les immunothérapies

Le système immunitaire joue un rôle clé dans le développement et la progression des cancers. En effet, les cellules immunitaires recrutées par les cellules cancéreuses (lymphocytes, cellules dendritiques, macrophages) sont responsables d'une tolérance immunitaire locale. De plus en plus d'études se focalisent sur le ciblage de l'environnement immunitaire dans les tumeurs (C. Chen et al. 2021). Dans les ostéosarcomes, les lymphocytes T infiltrent les tissus (Théoleyre et al. 2005). Le ligand de mort cellulaire programmé 1 (PDL - 1) est une protéine de surface cellulaire qui réprime la réponse immunitaire induite par les cellules T CD8 + cytotoxiques. Il a été rapporté que PD-1 et PDL-1 étaient exprimés par certains ostéosarcomes, et sarcomes d'Ewing (Paydas et al. 2016). Plus récemment, Sandara et al. ont démontré une augmentation de l'expression de PDL-1 et une infiltration de cellules T dans les ostéosarcomes métastatiques de haut grade renforçant l'intérêt clinique de l'inhibition de PDL-1 / PD-1 dans l'ostéosarcome (Sundara et al. 2017). Paoluzzi et al. ont montré le bénéfice clinique du nivolumab (anti - PD1) chez 50% des patients méastatiques évalués (Paoluzzi et al. 2016). Sur la base de ces observations, l'évaluation de deux anticorps anti-PD-1, le pembrolizumab (NCT02301039) et nivolumab (NCT02304458) sont en cours dans l'ostéosarcome (Figure 2). L'inhibiteur de PD-1 (nivolumab) est actuellement évalué dans le sarcome d'Ewing en association avec un anticorps anti-CTLA-4 (Ipilimumab).

Le ciblage de cellules immunitaires telles que les cellules dendritiques, les lymphocytes T chargés et les cellules NK (tueuses naturelles) est également en cours d'évaluation dans les essais cliniques de phase I / II dans l'ostéosarcome (Figure 5) et le sarcome d'Ewing. L'objectif principal de ces études est de lever la tolérance immunitaire locale et de réactiver la réponse immunitaire contre les cellules cancéreuses. Ainsi, une étude pilote (NCT02409576) dans laquelle des cellules NK haploidentiques activées sont administrées à 20 patients sarcomateux, est en cours.

L'infiltration des macrophages contribue au contrôle de la croissance de l'ostéosarcome (Dumars et al. 2016). A partir de cette observation, plusieurs stratégies thérapeutiques ont été développées. L'un des agents les plus « polémiques » est le Mifamurtide (L - MTP - PE), un analogue synthétique d'un composant de la paroi bactérienne capable d'activer les macrophages. Son utilisation entraîne une amélioration de la survie globale d'environ 10% en association avec la chimiothérapie (M.-F. Heymann, Brown, et Heymann 2016). Cependant, en raison d'une controverse sur la conception de l'étude, son utilisation n'est pas universellement admise et un essai clinique de phase II / III est en cours (NCT01459484).

1-4-2-4-6- Les inhibiteurs de la kinase dépendants de la cycline

CDK4 et CDK6 sont des kinases impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire en contrôlant la phase G1. Afin de bloquer la prolifération cellulaire, des inhibiteurs de kinase dépendant de la cycline ont été conçus. Parmi eux, l'Abemaciclib inhibe CDK4 et CDK6 et induit un arrêt du cycle cellulaire en agissant sur la phosphorylation de Rb. Une étude est en cours (NCT02644460) sur des patients atteints d'ostéosarcome et de sarcome d'Ewing.

1-4-2-4-7- Le ciblage du disialoganglioside (GD2) et de la glycoprotéine (gpNMB)

Une étude récente a révélé une forte expression de GD2 dans la plupart des ostéosarcomes et sarcome d'Ewing qui augmenterait l'agressivité tumorale (Nazha, Inal, et Owonikoko 2020). Une étude clinique de phase II dans le traitement des récurrences d'ostéosarcome est en cours [NCT02502786]. Il s'agit d'utiliser l'anticorps monoclonal humanisé 3F8 (Hu3F8) avec facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages (GM-CSF).

La glycoprotéine, la protéine B du mélanome non métastatique (gpNMB) est fortement exprimée dans les tumeurs solides et favorise la progression métastatique par modulation de

l'invasion et de la migration. Un essai clinique de phase II (NCT01353625) évalue le bénéfice thérapeutique du glembatumumab vedotin, un conjugué anticorps-médicament ciblant le gpNMB, chez les patients atteints d'ostéosarcome métastatique ou récurrent.

1-4-2-4-8- Pharmacogénomique

La pharmacogénomique permet d'identifier et de valider des biomarqueurs génomiques afin d'apporter un traitement personnalisé tout en réduisant leur toxicité (Serra et Hattinger 2017). A ce jour, on ne compte que très peu de gènes dans les OS qui ont démontré un lien direct avec la réponse au traitement.

- ABCB1

La doxorubicin reste l'une des références dans le traitement des OS. Il a été montré que la surexpression d'ABCB1 est associée à la résistance à la doxorubicin (Claudia M. Hattinger et al. 2009; Claudia Maria Hattinger et al. 2015). Ainsi, les nouveaux critères de diagnostic prennent en compte l'expression d'ABCB1 associée à l'étendue de la nécrose tumorale après chimiothérapie préopératoire. De plus, ces patients sont traités de manière intensive, en associant Mifamurtide et Doxorubicin, Cisplatine, Méthotrexate et Ifosfamide [NCT01459484]. Cette étude est en cours (Claudia Maria Hattinger et al. 2015).

- DHFR et SLC19A1/RFC1

Dans les OS, la résistance au méthotrexate a été associée à une amplification et/ou surexpression de sa cible DHFR et des gènes SLC19A1/RFC1 (Patiño-García et al. 2009; Claudia M. Hattinger et al. 2009). De ce fait, des analogues comme le triméthotrexate ont été utilisés. Son efficacité a été évaluée chez des patients avec un OS récurrent cependant aucune amélioration n'a été observée comparée aux fortes doses de méthotrexate (O'Day et Gorlick 2009). Chez les patients avec un OS métastatique, le Pemetrexed n'a montré aucune amélioration du pronostic vital (Duffaud et al. 2012).

- PI3K/mTOR

Les techniques de séquençage de nouvelles générations ont permis d'identifier la voie de signalisation PI3K/mTOR comme une cible thérapeutique clé dans la lutte contre les OS. Les inhibiteurs de mTOR le temsirolimus (CCI-779, Torisel, Wyeth Pharmaceuticals, Midrand,

South Africa), l'everolimus (RAD-001 ; Novartis, Basel, Switzerland), le deferolimus (AP23573, Ariad Pharmaceutical, Cambridge, MA, USA) et le ridaforolimus (AP23573/MK-8669, Merck, Kenilworth, NJ, USA) ont été évalué chez des patients avec un OS avancé. Pour l'instant, ils ont montré des effets anti-tumoraux encourageants (Perry et al. 2014).

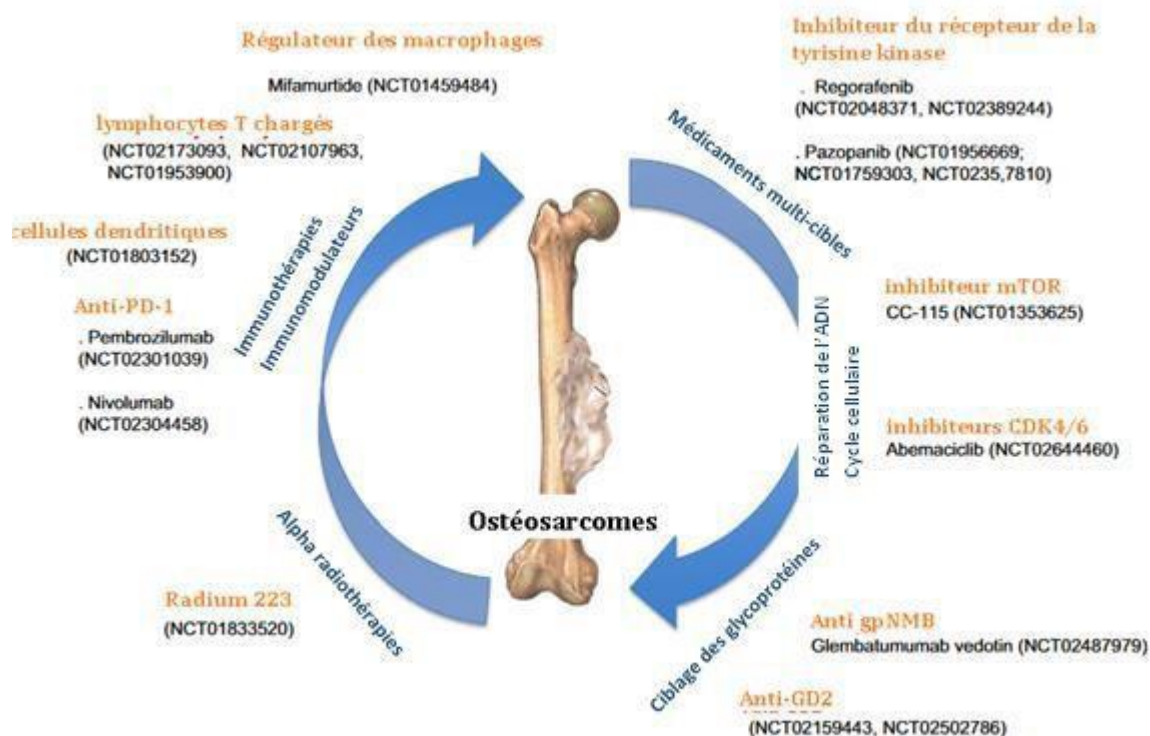


Figure 5 : Les essais cliniques en cours sur le ciblage des ostéosarcomes

De nombreuses approches thérapeutiques sont en cours de développement clinique et reposent sur une cible spécifique et directe des cellules cancéreuses (par ex. Réparation de l'ADN, cycle cellulaire ou ciblage glycoprotéique), ou sur le ciblage indirect des cellules cancéreuses par modulation de leur microenvironnement (par ex. Immunothérapies). Après intégration dans la matrice osseuse tumorale extracellulaire, les agents radiothérapeutiques alpha peuvent tuer indirectement les cellules cancéreuses.

NCT: National Clinical Trial NuClinicalTrials. Numéro de registre du gouvernement. D'après (Brown et al. 2018)

Malgré toutes ces avancées techniques le taux de survie après 5ans et le nombre de patients avec métastases n'a pas évolué. Il est donc important de mieux comprendre la biologie des métastases pour prévenir leur survenue et/ou les traiter efficacement.

2- Les Métastases

Les ostéosarcomes sont associés à un développement métastatique qui peut être précoce ou tardif. En effet, 1 patient sur 5 présente au diagnostic des métastases « détectables » tandis que la majorité, développe une maladie résiduelle (PosthumaDeBoer et al. 2011). Dans 80% des cas, les métastases sont localisées en périphérie des poumons. Ces patients présentent une insuffisance respiratoire qui conduit à la mort. Plus rarement (< 8% des cas), on observe des métastases au niveau du cerveau. Ces métastases sont considérées comme secondaires car elles surviennent chez des patients qui ont déjà des métastases pulmonaires (Qasem 2016). Ces patients présentent une augmentation de la pression intracrânienne et sont sujets à des troubles neurologiques comme des hémiparésies et des convulsions. Les OS peuvent aussi métastaser au niveau d'un second site osseux et sont alors appelés « ostéosarcomes méthachrones » (Bacci et al. 2006) . Ces métastases apparaissent en général longtemps après rémission et bien que rares (10% des cas) sont très agressives. Ces observations suggèrent une grande hétérogénéité dans la biologie des métastases des OS et la difficulté à les traiter. Dans tous les cas, les métastases des OS sont associées à un mauvais pronostic vital (Lindsey, Markel, et Kleinerman 2017) avec un taux de survie à 5 ans inférieur à 30% depuis des décennies. Les traitements actuels associent chimiothérapie et métastasectomie. Différentes équipes, ont montré que la résection chirurgicale des métastases améliore le taux de survie à 5ans des patients avec des métastases isolées et même des patients présentant une maladie récurrente (Z. Liu et al. 2020; Macherey et al. 2017). Cependant, il faut noter que cette amélioration est dépendante de l'étendue, de la taille et du nombre des métastases. Il reste donc beaucoup à comprendre sur la biologie des métastases pour les cibler de manière efficace. D'autant plus que le nombre de patients métastatiques ne diminue pas à ce jour.

2-1- Le processus métastatique

Le processus métastatique est décrit comme un enchaînement d'étapes permettant aux cellules cancéreuses de sortir de la tumeur primaire et de coloniser un site distant. Bien qu'un grand nombre de cellules s'échappent en permanence de la tumeur primaire (proportionnellement à son volume), seules très peu ont la capacité de contourner les obstacles moléculaires et biophysiques et de s'installer ailleurs. Il s'agit soit de cellules qui vont acquérir des propriétés invasives, soit des cellules particulières qui en sont déjà dotées

(cellules souches cancéreuses). Les cellules disséminantes peuvent se déplacer seules ou en clusters (Massagué et Obenauf 2016) ; cependant les clusters ont un avantage à former des métastases (Aceto et al. 2015). Dans les modèles murins, les cellules cancéreuses injectées en intraveineuse qui arrivent aux poumons meurent massivement au bout de deux jours. Il en est de même pour les cellules injectées en intraartériel qui se retrouvent dans le cerveau ou le foie (Wong et al. 2001; Minn et al. 2005). Toutes ces observations montrent que le processus métastatique est un processus « inefficace » et **hautement sélectif** avec moins de 0.01% des cellules tumorales dans la circulation qui formeront des métastases (Chambers, Groom, et MacDonald 2002). Aujourd'hui, plusieurs études ont montré qu'il ne s'agit pas d'une cascade linéaire d'évènements mais plutôt d'un chevauchement de plusieurs évènements concurrents résultant en la sélection d'un nombre limité de cellules métastatiques (Lambert, Pattabiraman, et Weinberg 2017). Schématiquement, le processus métastatique comprend des étapes d'initiation avec une invasion locale et un franchissement de la membrane basale, un déplacement des cellules tumorales circulantes (CTCs) à travers les vaisseaux et une extravasion. Arrivées dans un site distant, les CTCs subissent une période plus ou moins longue de latence et développent des mécanismes pour échapper au système immunitaire local. Enfin, les cellules tumorales développent des interactions avec le stroma hôte leur permettant de proliférer et de devenir des cellules initiateuses de métastases (MICs) (Lawson et al. 2018) (Figure 6).

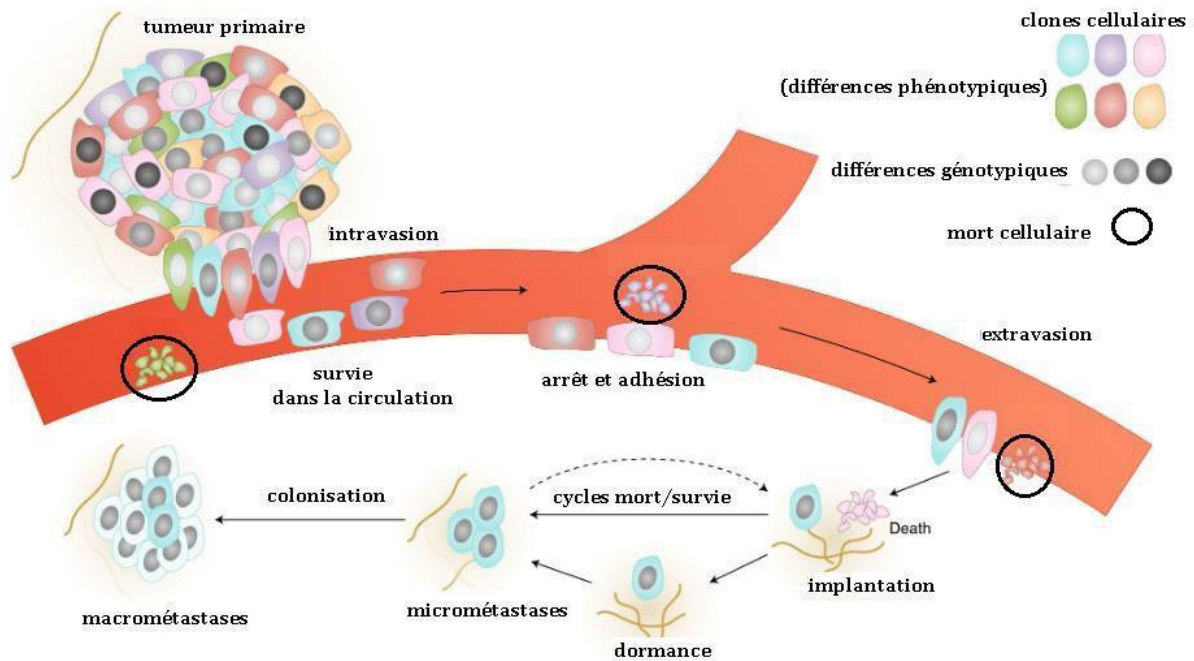


Figure 6 : Les étapes du processus métastatique

Le développement métastatique est un processus complexe comprenant plusieurs étapes. Des éléments comme la plasticité des cellules cancéreuses, les interactions avec le stroma du tissu hôte et les cellules immunitaires peuvent influencer son efficacité.

La phase de pré-colonisation comprend l'invasion locale de différents clones cellulaires dans la tumeur primitive, l'intravasation dans le système vasculaire sous forme de cellules individuelles ou d'amas de cellules, la sélection et la circulation des clones compétents, l'arrêt dans les capillaires sur le site distant et l'extravasation des vaisseaux.

La colonisation : Les CTCs s'installent dans des niches de soutien où elles survivent au système immunitaire et aux autres défenses du tissu hôte par des mécanismes de dormance et préservent ainsi leurs capacités d'initiation de tumeur. La sortie de dormance permet le développement de macro-métastases. D'après (Lawson et al. 2018)

2-1-1- La Régulation du caractère métastatique

Le caractère métastatique des cellules tumorales est régulé à plusieurs niveaux. En plus des altérations génétiques et des modifications épigénétiques, les interactions avec le microenvironnement tumoral confèrent aux cellules un potentiel invasif et métastatique (Alexander et al. 2008; Hofschroer et al. 2017).

2-1-1-1- Les Gènes de métastases

2-1-1-1-1- Les Altérations génétiques

Tout comme les gènes conducteurs des tumeurs primaires, il existe des gènes conducteurs des métastases. Ils sont principalement divisés en trois catégories. **Les gènes responsables de l'initiation des métastases** dont les altérations permettent aux cellules tumorales d'atteindre

un site distant et **les gènes responsables de la croissance des métastases**. Ils sont souvent mutés dans la tumeur primaire et le site métastatique bien qu'ils puissent avoir des fonctions différentes selon leur localisation. Enfin, il existe des gènes exclusivement mutés dans les sites métastatiques. Ces derniers, sont **responsables de l'agressivité des métastases** (Nguyen, Bos, et Massagué 2009). Dans les OS, Moriarity et al, ont permis d'établir grâce à un criblage génétique avancé, une liste de 43 gènes métastatiques potentiels (Moriarity et al. 2015). Parmi ces gènes, 28 ont été identifiés comme gènes responsables de l'agressivité des métastases étant donné qu'aucune mutation de ces gènes n'a été identifiée dans la tumeur primaire. D'autre part, cette étude a permis de mettre en évidence le fait qu'une régulation génétique différente d'un même gène peut aboutir à l'établissement ou non de métastases (Figure 7). En effet, chez des souris au fond génétique mutant R270H Trp53, la surexpression des gènes Raf1 ou Snap3 ou l'inhibition du gène Ube2d2a par intégration de transposons, aboutit au développement d'OS non métastatiques. Au contraire, chez les souris mutantes R270H Trp53 qui ont développé des métastases, les gènes Raf1 et Snap3 sont inhibés tandis que le gène Ube2d2a est surexprimé.

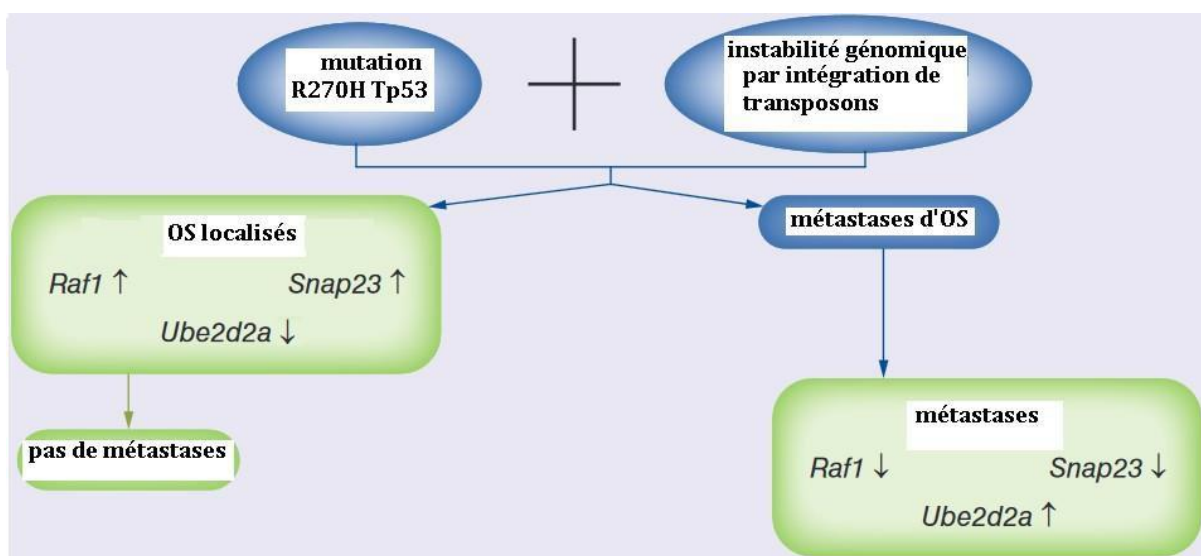


Figure 7 : Exemple d'altérations génétiques conférant des capacités métastatiques différentes aux cellules d'OS

Il existe différents mécanismes génétiques régulant l'établissement des métastases. Chez des souris mutantes R270H Trp53, des altérations génétiques par intégration de transposons dans les gènes Raf1 ou Snap23, ou Ube2d2a modulent le développement métastatique. Ces gènes jouent le rôle de gènes de virulence des métastases. D'après (Maximov et Aqeilan 2016).

Des études récentes de génomique ont permis d'établir une liste non exhaustive de gènes impliqués dans le développement métastatique des OS (Maximov et Aqeilan 2016) (Tableau 8). Parmi ces gènes, on retrouve le gène NFIB dont le rôle anti métastatique est spécifique aux OS (Mirabello, Koster, et al. 2015; Quattrini et al. 2015) et passerait par la régulation négative de miR-21(Fujita et al. 2008). Mirabello et al, ont montré que la mutation de la 213^{ème} arginine de Tp53 est associée à un risque métastatique élevé tandis que les variants classiques de Tp53 sont antimétastatiques (Mirabello, Yeager, et al. 2015). L'action pro métastatique de Tp53 n'est possible que combinée aux amplifications du gène COSP3.

Gènes associés au développement métastatique dans les OS	Gènes inhibant le développement métastatique dans les OS
AKT1	ASS1
AMF (GPI)	CD44
APEX1	COL3A1
B7H3 (CD276)	DKK3
COPS3	NAT2
CYR61	NFIB
CXCR4	PTEN
CXCR7	RB1
CTGF	SMAD7
IGFBP5	TP53
IL17A	WIF1
JUN	WWOX
LIF	
MAPK1 (ERK2)	
MMP1	
TWIST1	
FOS	
HIF1A	
MAP2K1 (MEK1)	
GLI2	
S100A4	

Tableau 8 : Les gènes impliqués dans le développement métastatique des OS

Ce tableau représente la liste non exhaustive de gènes impliqués dans le développement métastatique des OS. D'après (Maximov et Aqeilan 2016)

2-1-1-1-2- La régulation épigénétique

Les gènes conducteurs des métastases sont aussi régulés au niveau épigénétique ou par épissage alternatif (Robert 2013). Plusieurs études ont montré l'implication des microARNs dans l'établissement des métastases des OS (Tableau 9).

microARNs associés au développement métastatique dans les OS	Action	cibles
miR-132	antimétastatique	SOX4
miR-135b	antimétastatique	C-MYC
miR-144	antimétastatique	ROCK1/2
miR-145	antimétastatique	MMP16; VEGF
miR-17	prométastatique	PTEN
miR-194	antimétastatique	CDH2 et IGF1R
miR-195	antimétastatique	CCND1
miR-21	antimétastatique	RECK
miR-214	antimétastatique	WASF3
miR-217	prométastatique	PTEN
miR-27	prométastatique	CBFA2T3
miR-33b	antimétastatique	C-MYC
miR-34a	antimétastatique	C-MET et CD44
miR-34c	antimétastatique	LEF1 et NOTCH1
miR-382	antimétastatique	YB-1
miR-646	antimétastatique	FGF2

Tableau 9 : Les MicroARNs impliqués dans la régulation épigénétique des métastases des OS.

Plusieurs microARNs sont impliqués dans la régulation épigénétique des métastases des OS.

Liste non exhaustive. D'après (Maximov et Aqeilan 2016)

2-1-1-1-3- La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT)

La transition épithéliale-mésenchymateuse (EMT) est le processus par lequel les cellules épithéliales acquièrent des caractéristiques mésenchymateuses. Cette plasticité cellulaire est associée à la progression des cancers, au potentiel métastatique des cellules tumorales et à la résistance aux traitements (Bakir et al. 2020). Dans les carcinomes, il a été montré que les cellules acquièrent un phénotype invasif et franchissent la membrane basale via l'EMT

(Ribatti, Tamma, et Annese 2020). **Etant donné l'origine mésenchymateuse des cellules d'OS, les questions de l'occurrence et du rôle de l'EMT ont longtemps été débattues** (J. Yang et al. 2014). Des études *in vitro et in vivo* ont montré que l'inhibition de l'AMF/PGI (un promoteur de l'EMT) promouvait un phénotype épithélial dans les cellules cancéreuses et une diminution de la mobilité et des capacités invasives (Niinaka et al. 2010). De plus, il a été montré que dans des cellules ayant déjà un phénotype mésenchymateux, des facteurs de transcription de l'EMT tels que Snail1, Snail2 et Twist étaient surexprimés pour faciliter leur migration (Deng, Zhang, et Chen 2018). Ehnman et al, ont récemment décrit une signature pronostique comprenant le gène suppresseur de tumeur FHIT (Ehnman et al. 2019). Ce gène réprimé dans les tissus d'OS contrôle la reprogrammation des cellules mésenchymateuses en cellules épithéliales. Aujourd'hui, il est établi que l'EMT n'est pas un processus binaire et inclue des états transitoires. Berlanga et al, ont montré que **les cellules d'OS peuvent être de différents phénotypes : mésenchymateux, plutôt épithéliaux dans les poumons ou bi phénotypiques avec des clusters comprenant des cellules aux deux phénotypes** (Berlanga et al. 2016). Ainsi, les cellules d'OS **alternent entre EMT et MET**. Durant les étapes précoces de la dissémination, les cellules d'OS subissent une EMT qui facilite leur migration, leur invasion et leur déplacement à travers les vaisseaux. Arrivées dans un nouvel environnement, les cellules ont tendance à acquérir un phénotype plutôt épithélial qui leur permet de s'implanter et de proliférer, formant ainsi des macrométastases (Chong, Yeap, et Ho 2021a) (Figure 8).

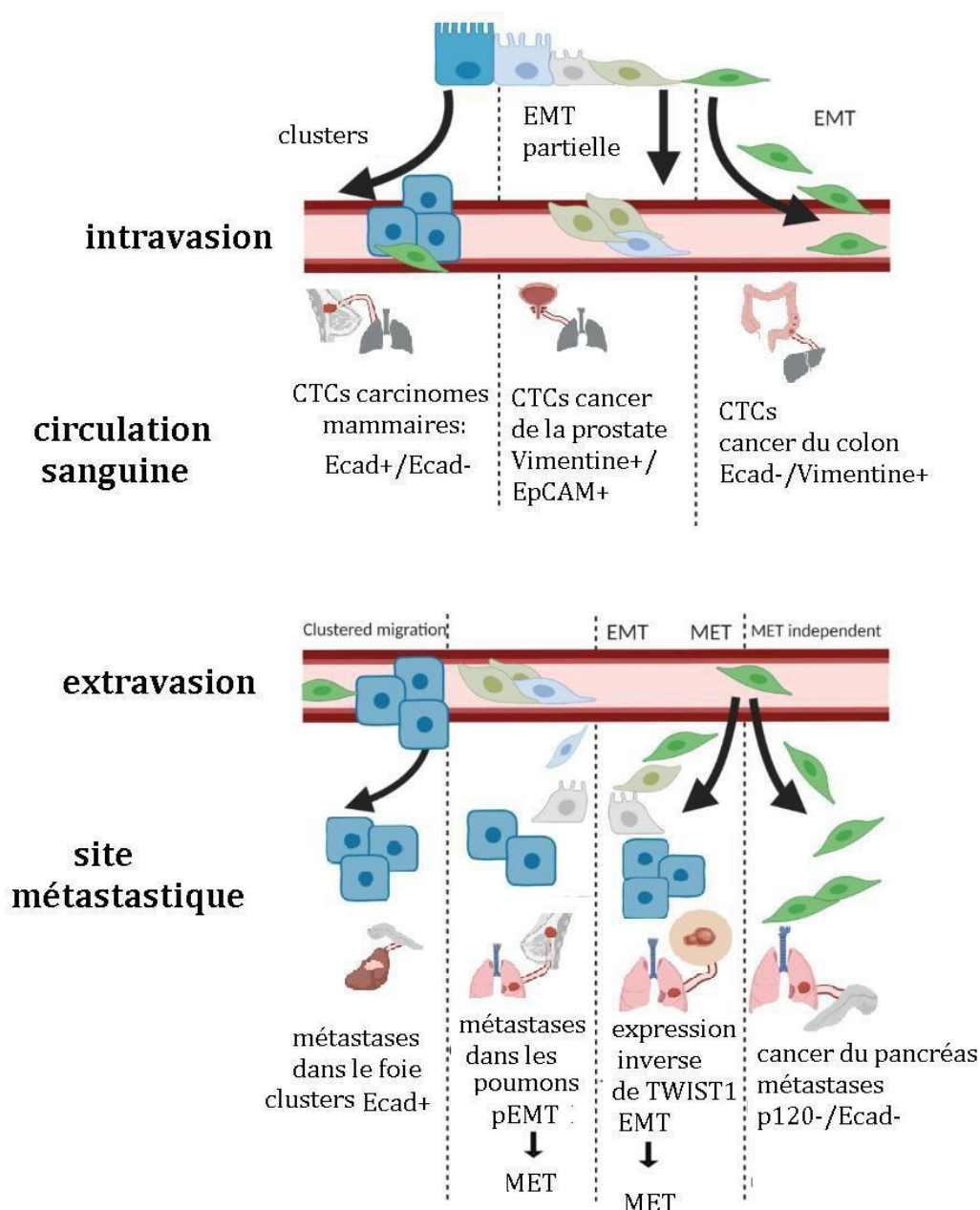


Figure 8 : Le rôle de l'EMT dans le processus métastatique

L'un des mécanismes permettant aux cellules cancéreuses de se détacher de la tumeur primaire et d'intravaser les systèmes lymphatiques et vasculaires est l'EMT. Plusieurs cas de figures peuvent être observés. Seules les cellules « lead » d'un cluster peuvent exprimer des marqueurs mésenchymateux; les cellules qui extravasent peuvent garder certains marqueurs épithéliaux (EMT partielle). L'EMT peut être complète avec la perte totale des marqueurs épithéliaux. Il a été démontré dans plusieurs études que le phénotype épithélial permet aux cellules de s'établir dans un nouvel environnement, de proliférer et de former des macrométastases. D'après (Bakir et al. 2020)

Plusieurs études in vivo et in vitro ont montré le rôle essentiel des microARNs dans la régulation de l'EMT dans les OS. Ces microARNs peuvent être divisés en deux catégories : les « promoteurs » et les « inhibiteurs » de l'EMT. Ils ont un intérêt thérapeutique car il a été montré chez les patients que la majorité d'entre eux sont associés à un bon pronostic vital. En

effet, ces microARNs inhibent des voies de signalisation impliquées dans la tumorigenèse, l'EMT et l'établissement des métastases (L. Xie et al. 2018; S. Zhang et al. 2020). Au contraire, certains de ces microARNs sont associés à un mauvais pronostic vital et au développement d'une maladie récurrente (C. Xie et al. 2020)(Tableau 10).

MicroARNs associés à un bon pronostic vital	MicroARNs associés à un mauvais pronostic vital
miR-16	miR-19
miR-22	miR-21-5p
miR-34a	miR-93
miR-101-3p	miR-135b
miR-128	miR-196a
miR-132	miR-210-5p
miR-133b	
miR-144-3p	
miR-145	
miR-200b	
miR-200c	
miR-203	
miR-217	
miR-323b-3p	
miR-363	
miR-382	
miR-449a	
miR-486	
miR-488	
miR-495	
miR-499a	
miR-503	
miR-579	
miR-765	
miR-766-3p	
miR-1284	

Tableau 10 : Les microARNs associés à l'EMT et utilisés dans le diagnostic des OS

Actuellement, 26 microARNs régulant l'EMT ont été recensés, associés à un bon pronostic vital contre 6 associés à un mauvais pronostic vital. D'après (Chong, Yeap, et Ho 2021b)

2-1-1-1-4- Le rôle du microenvironnement tumoral (MT)

Le MT joue un rôle essentiel dans les étapes de pré-colonisation. C'est un environnement complexe associant différents types de cellules, notamment des fibroblastes, des cellules endothéliales et immunitaires qui communiquent par l'intermédiaire de métabolites, de cytokines, de facteurs de croissance et de microvésicules. La cohésion tumorale est assurée grâce à une matrice extracellulaire.

2-1-1-1-4-1 La matrice extra-cellulaire (MEC)

De manière générale, la MEC est un réseau tridimensionnel de macromolécules régulant le développement et l'homéostasie tissulaire. Sa composition, sa biomécanique et son anisotropie sont parfaitement ajustées pour refléter l'état physiologique du tissu. Ainsi, la perte de cette homéostasie est un événement majeur dans l'apparition des cancers et joue un rôle important dans la progression tumorale et métastatique de plusieurs cancers dont les OS (Yuhua Zhang et al. 2014; Saviola et al. 2016; Cui et al. 2020a). Les collagènes de type I et III sont fortement exprimés dans les sérums de patients non traités (Wiklund et al. 1996). De plus, la surexpression de collagène de type I qui induit l'augmentation des métalloprotéases MMP-2 dans des lignées cellulaires d'OS, est associée à un mauvais pronostic vital chez les patients ostéosarcomeux (Korpi et al. 2011). Le collagène de type III est quant à lui associé à la chimiorésistance (Xu et al. 2018). Bien que l'expression de la plupart des collagènes soit augmentée dans les OS, il a été montré que la diminution du collagène de type XVIII est associée à l'angiogenèse et à la progression des OS (Niu 2011). L'augmentation de fibronectine a été associée à la chimiorésistance chez les patients ostéosarcomeux (Kun-Peng et al. 2019). L'augmentation d'autres composants de la MEC comme les laminines et les protéoglycans a été associée à des capacités invasives accrues des cellules d'OS et au développement métastatique (Caon et al. 2020). A cela, il faut ajouter le rôle des métalloprotéases et des héparinases dans la progression des OS. En particulier, les métalloprotéases MMP-2, -9 et -13 promeuvent l'invasion des cellules d'OS et le développement métastatique en dégradant la matrice (Cheng et al. 2016; Hirahata et al. 2016). Dans les tissus de patients ostéosarcomeux, une forte expression d'héparinase corrèle avec des vaisseaux plus dense et un taux de métastases pulmonaires élevé (Vlodavsky et al. 2012). Ling et al, ont montré que bloquer la liaison entre l'héparinase et EGFR1 induit l'apoptose des cellules d'OS en empêchant l'interaction entre FGF2 et FGFR1 (Ling et al. 2015). D'autre part, la protéine matricielle-Gla (MGP) a été identifiée dans les profils transcriptomiques des ostéosarcomes (Zanduetta et al. 2016). In vitro, MGP influence l'adhésion endothéliale et la migration trans-endothéliale. Dans les modèles murins, il a été montré qu'elle influence la capacité d'extravasation des cellules tumorales et sa suppression entraîne la réduction des métastases. De plus, les patients métastatiques présentent des taux élevés de MGP dans la tumeur et dans le sang. Dans l'ensemble, les composants de la MEC

participent de manière active à l'acquisition du caractère malin des cellules tumorales. Ils se révèlent donc être des biomarqueurs cliniques et cibles thérapeutiques prometteurs dans le ciblage des métastases d'OS. Plusieurs modèles précliniques ciblant la MEC sont en cours d'évaluation (Tableau 11).

Les composants de la matrice extracellulaire		Pronostic vital		Mécanismes thérapeutiques ciblés
		Expression dans les OS		
collagènes	CTHRC1	élevée	faible survie	
	COL1A	élevée	faible survie	
	COL3A1	élevée		résistance au méthotrexate, apoptose
	Tumstatine (collagène IV)	élevée		prolifération cellulaire, apoptose
	Endostatine (collagène XVIII)	faible		métastases
Fibronectine	fibronectine	élevée	métastases, chimiorésistance, faible survie	sensibilité à la doxorubicine
	intégrines			prolifération cellulaire, métastases
Proteoglycans	CD44	élevée	chimiorésistance, métastase, récurrence, faible survie	sensibilité à la doxorubicine
	Decorine	faible		invasion cellulaire, métastases

Tableau 11 : Les composés de la MEC utilisés comme biomarqueurs et cibles thérapeutique dans les OS

La MEC est composée principalement de collagènes, fibronectine et de protéoglycans. Ils sont impliqués dans la progression maligne des OS et sont utilisés comme biomarqueurs cliniques et cibles thérapeutiques. D'après (Cui et al. 2020b)

2-1-1-1-4-2- Les cellules associées à la tumeur

2-1-1-1-1-4-2-1- Les cellules souches mésenchymateuses (CSMs)

En plus d'être considérées comme des cellules d'origine des OS, les CSMs sont associées à la prolifération, les métastases et la résistance aux médicaments dans de nombreux cancers. Dans les OS, les CSMs subissent une série de transformations fonctionnelles résultant en trois types de cellules. Les CSMs circulantes sont recrutées au site tumoral où elles acquièrent un pouvoir tumorigène et/ou se différencient en fibroblastes associés aux tumeurs (CAFs) (Y. Zheng et al. 2018) (Figure 9).

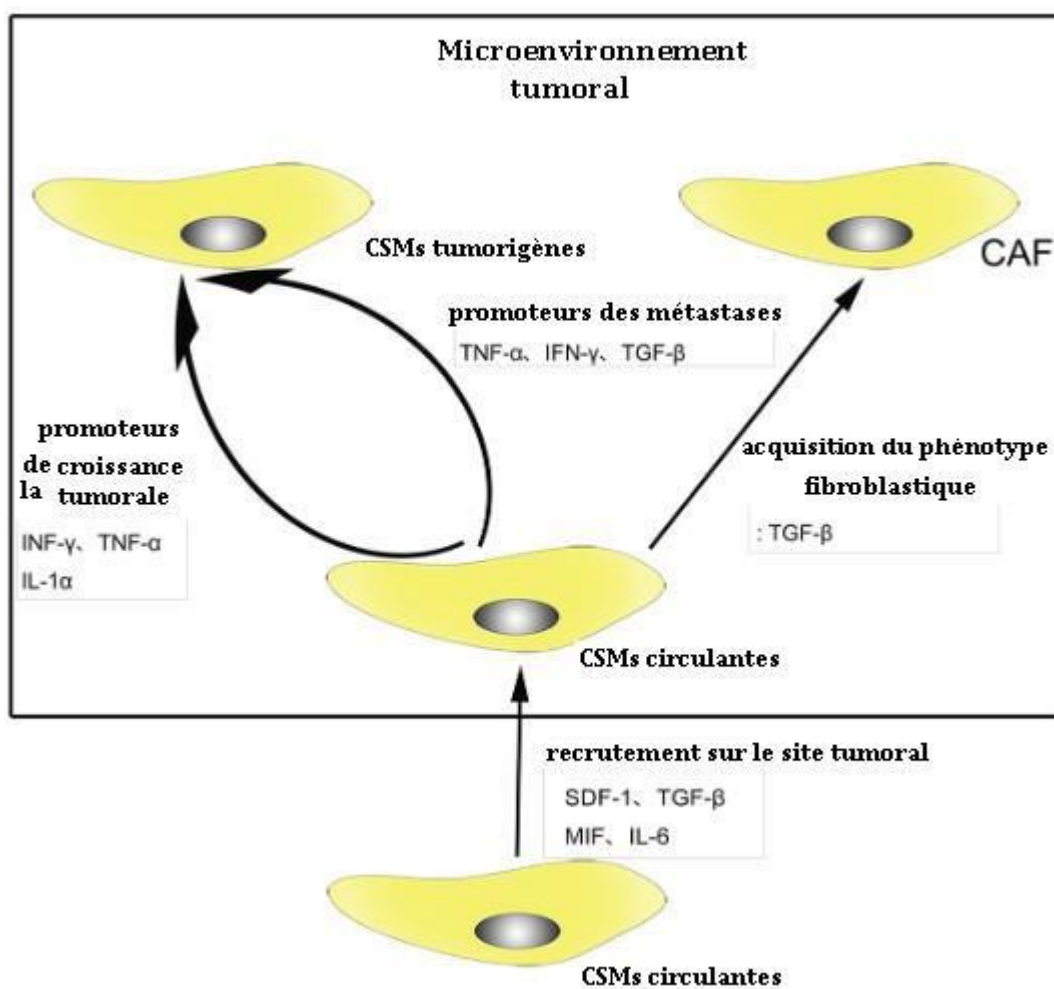


Figure 9 : Le dialogue entre les CSMs et microenvironnement tumoral

Grâce au réseau paracrine du microenvironnement, les CSMs subissent une série de transformations fonctionnelles en faveur du développement tumoral et métastatique. Les cytokines SDF-1, MIF, TGF- β permettent le recrutement des CSMs au site tumoral. D'une part, INF- γ , TNF- α IL-1 α et TGF- β favorisent le pouvoir tumorigène des CSMs. De plus, les CSMs peuvent se différencier en fibroblastes associés au cancer (CAF) sous la stimulation du TGF- β . D'après (Zheng et al. 2018)

Cette plasticité cellulaire est possible grâce à l'existence d'un réseau paracrine d'interactions entre le microenvironnement, les cellules tumorales et les CSMs. De nombreuses cytokines participent à la communication entre ces cellules comme l'interleukine-6 (IL-6) qui est associée à une augmentation de la croissance tumorale (D. Heymann et al. 2005), le facteur de croissance transformant TGF- β , le facteur dérivé du stromal (SDF)-1, le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α), interféron γ (IFN- γ), le facteur d'inhibition des macrophages (MIF) et IL-1 α (Z. Sun, Wang, et Zhao 2014; Lourenco et al. 2015). Wang et al ont montré que les cellules d'OS induisent la transformation des CSMs en CAFs en modulant la signalisation par AKT/NOTCH (Y.-M. Wang, Wang, et Qiu 2017). Les CAFs sont des fibroblastes activés qui participent à la progression tumorale soit par une activité E2DH augmentée (Adams, Coldham, et James 1988) soit via TGF- β (Stuelten et al. 2010). Ils participent activement à l'invasion cellulaire grâce à leur production d'IL-6 qui est 100 fois plus importante que celles des fibroblastes des tissus normaux (Hugo et al. 2012). D'autre part, en augmentant l'activité des métalloprotéases MMP9 et 14, ils participent au processus métastatique (Hu et al. 2009).

Les CSMs tumorigènes en sécrétant CCL5 sont directement impliquées dans les phénomènes de migration associés à la dissémination tumorale (P. Zhang et al. 2014). D'autre part, les CSMs participent à l'établissement des métastases en produisant des ROS qui vont activer la glycolyse dans les cellules tumorales et créer une acidification du milieu (Bonuccelli et al. 2014; Avnet et al. 2017). La glycolyse influence la progression tumorale et le lactate produit est réutilisé par les cellules d'OS ce qui augmente leur activité mitochondriale et **stimule leurs capacités migratoires** (Bonuccelli et al. 2014). Concernant l'acidification, plusieurs études ont démontré son rôle dans les phénomènes de chimiorésistance et d'invasion des cellules d'OS (Avnet et al. 2016; Kolosenko et al. 2017).

Néanmoins, plusieurs études ont montré un rôle anti-tumoral des CSMs. Dans les OS, il a été montré à partir de xénogreffes que les CSMs inhibent la croissance tumorale en supprimant l'activité Akt dans les cellules tumorales (Khakoo et al. 2006). Les CSMs dérivées de la gelée de Wharton (WJ-CSMs) sont des populations homogènes de CSMs isolées à partir de la gelée de Wharton dans le cordon ombilical. Gauthaman et al, ont montré que des cellules d'ostéosarcome (MG-63) cultivées dans un milieu conditionné par des WJ-CSMs perdent leurs propriétés prolifératives et migratoires in vitro (Gauthaman et al. 2012). En conclusion, les CSMs, grâce à leur rôle « mixte » dans la malignité des tumeurs apparaissent comme des cibles

potentielles dans le traitement des ostéosarcomes. D'ailleurs, différentes études prometteuses se basent l'utilisation des cellules souches mésenchymateuses comme « véhicules » pour délivrer les drogues au site tumoral (Grisendi et al. 2015) (Qiao et al. 2015).

2-1-1-1-1-4-2-2- Les macrophages associés aux tumeurs (TAMs)

Dans les tumeurs, les macrophages associés aux tumeurs (TAMs) sont impliqués dans l'angiogénèse, la migration et l'invasion cellulaire mais aussi dans l'établissement des métastases (S. Gordon et Martinez 2010; Noy et Pollard 2014). Dans le cancer du sein, ils peuvent induire la dissémination précoce des cellules HER2+(Linde et al. 2018). Les TAMs sont composés de deux sous-populations principales : les TAMs-M1 qui sont anti-tumoraux et les TAMs-M2 pro-tumoraux (Shapouri-Moghaddam et al. 2018). Dans les OS, les TAMs sont la population immunitaire la plus abondante(T. Liu et al. 2015) (Figure 10). De façon générale, ils participent à l'initiation des métastases en favorisant l'angiogénèse (Colegio et al. 2014). Han et al, ont montré qu les TAMs favoriser l'EMT des cellules tumorales en activant un axe COX-2/STAT3(Y. Han et al. 2019). Chez la souris, l'inhibition des TAMs a réduit les capacités d'invasion et la charge métastatique (Maloney et al. 2020). Dumars et al, ont montré que le ratio M1/M2 supérieur à 1 est associé à une maladie localisée et à un taux de survie positif (Dumars et al. 2016).D'autres études ont montré que le phénotype M2 est associé à un mauvais pronostic vital, à la suppression des lymphocytes T activés (Figure 10) et à l'établissement d'un environnement anti-inflammatoire (Q. Han, Shi, et Liu 2016).

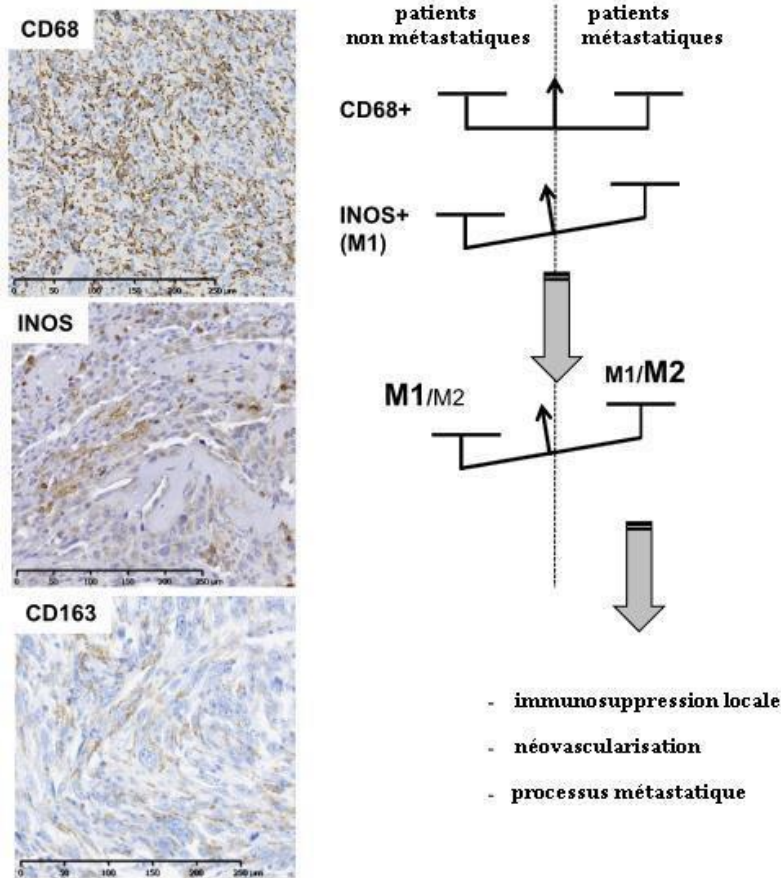


Figure 10 : Les TAMs dans les OS

Le nombre de macrophages associés aux tumeurs CD68+ (TAMs) dans les tumeurs primitives avant chimiothérapie est le même chez les patients non métastatiques et métastatiques. Cependant, le nombre de macrophages polarisés INOS+ M1 est plus élevé chez les patients non métastatiques que chez les patients métastatiques. Un dérèglement de ce ratio conduit à une augmentation de la vascularisation et du développement métastatique. (M.-F. Heymann, Lézot, et Heymann 2019)

Dans les modèles murins, le phénotype M2 est associé à une augmentation de la taille des tumeurs, une néovascularisation et à un développement métastatique (Ségaly et al. 2015b; Q. Zhou et al. 2017). Ainsi, les macrophages sont devenus des cibles thérapeutiques intéressantes dans le traitement des OS. Kleinerman et al ont été les premiers à montrer qu'en activant les macrophages dans des modèles in vitro d'OS et chez les chiens, on réduisait la taille des métastases (Kleinerman et al. 1983; MacEwen et al. 1989) . Plusieurs essais cliniques ont montré que l'agent thérapeutique L-MTP-PE plus connu sous le nom générique de mifamurtide augmente la survie des patients de 8 % (Meyers et al. 2008). Il permet d'induire le phénotype M1. Ce traitement, associé la chimiothérapie (Ando et al. 2011) est aujourd'hui utilisé dans plusieurs pays tels que le Japon, le Mexique et Israël. A l'exemple du cancer de la prostate, les macrophages pourraient être utilisés dans l'ingénierie d'adénovirus oncolytiques (Bommareddy, Shettigar, et Kaufman 2018).

2-1-1-1-4-3- L'hypoxie

Le taux d'oxygène dans les tumeurs est inférieur à la concentration d'oxygène physiologique dans les organes hôtes. Cette hypoxie associée aux cancers est appelée physioxie. Dans les tumeurs humaines, elle se situe entre 5% et 9% d'oxygène (Wenger et al. 2015) et est caractérisée par la présence de zones nécrosées ou apoptotiques (Brahimi-Horn et Pouysségur 2007). Les principaux biomarqueurs de l'hypoxie modulés dans les OS sont HIF α , mTOR et CA IX (Mizobuchi et al. 2008; Okuno et al. 2018; B. Zhang et al. 2018). HIF1 α est souvent surexprimé dans les OS de grade III et son expression est associée à une augmentation de l'expression de GLUT-1, CA IX et VEGF/VEGFR (Okuno et al. 2018; Capasso et al. 2019). Cela explique comment l'hypoxie promeut la néo-angiogénèse. D'autre part, HIF1 α stimule la dissémination des cellules cancéreuses en induisant le phénotype améboïde (Lehmann et al. 2017). Dans les sarcomes, il a été montré que HIF1 α active la voie de signalisation SDF1-CXCR4 (Guan et al. 2015). L'activation de cette voie induit le chimiotactisme, l'adhésion des cellules tumorales aux cellules endothéliales et la production de métalloprotéases telles que MMP-2/9 (Libura et al. 2002) promouvant ainsi, le développement métastatique (J. Zhou, Liu, et Wang 2018). De plus, CXCR4 est détecté dans 67 % des OS et est inversement corrélé à la survie des patients (Oda et al. 2006). Par ailleurs, HIF2 α semble être impliqué dans la prolifération cellulaire et le caractère souche des cellules d'OS (Johnson, Schipani, et Giaccia 2015). L'hypoxie participe aussi à l'échappement au système immunitaire en inhibant l'expression de MICA (Molécules de chaîne A liées au CMH de classe I) (McEachron et al. 2018). L'impact de l'hypoxie sur le score immun dans les OS est associé à la modulation de la glycolyse, de la biosynthèse du collagène et de la régulation redox (Song et al. 2020). Par ailleurs, l'hypoxie participe à la résistance aux traitements en modulant l'expression des gènes de « multidrug resistance » MRD (Roncuzzi, Pancotti, et Baldini 2014). En 2017, Zheng et al ont montré que HIF1 α rend les cellules d'OS insensibles au cisplatine (D. Zheng et al. 2017). Toutes ces études montrent que l'hypoxie joue un rôle spécifique aux différents stades de développement des OS (de l'initiation au développement métastatique)(Pierrevelcin et al. 2020).

2-1-1-1-4-4- Les voies de signalisation impliquées

2-1-1-1-4-4 -1- La signalisation Notch

La signalisation Notch est une voie bien conservée à travers les espèces. Elle régule des processus majeurs au cours du développement embryonnaire tels que la détermination du destin cellulaire, la prolifération, la différenciation et l'homéostasie. Les récepteurs Notch et leurs ligands sont des protéines transmembranaires qui initient une cascade de signalisation par contacts cellule-cellule (Zieba et al. 2020). Chez les humains, on dénombre quatre récepteurs Notch (1 à 4) et cinq ligands différents (JAG1, JAG2, DLL1, DLL3 et DLL4). A cause de son rôle primordial dans le maintien du linéage ostéoblastique et de l'homéostasie du squelette (Lawal et al. 2017; Muguruma et al. 2017), les altérations de la signalisation Notch sont associées au développement des OS (J. Tao et al. 2014). De plus, la signalisation Notch est associée au développement des métastases (Hughes 2009). Dans un modèle murin de gain de fonction Notch (Col1a1 2.3kb-Cre; Rosa26^{NICD}), il a été montré que les souris développaient une maladie disséminée aux poumons (J. Tao et al. 2014). Les mécanismes par lesquels cette voie est hyperactivée dans les OS sont encore mal connus. Néanmoins, récemment, Jin H. et al, ont montré l'implication du microARN miR-135b dans l'activation des voies de signalisation Notch et Wnt/ β -caténine (Jin et al. 2017) ; ce qui promeut le développement métastatique et les récives dans les OS. Mécaniquement, l'activation de la signalisation Notch induit l'expression de l'éphrine B1 stimulant ainsi le développement tumoral (Yu et al. 2019). D'un point de vue thérapeutique, la signalisation Notch apparait donc comme un marqueur moléculaire dans le pronostic des OS et comme cible thérapeutique. D'autre part, l'étude d'Adamowicz et al, suggère que la voie de signalisation Notch serait impliquée dans l'instabilité génomique observée dans les OS et métastases (Adamowicz, Vermezovic, et d'Adda di Fagagna 2016). En plus des OS, il a été montré que la signalisation Notch via la stimulation de la maturation des ostéoclastes, promeut les métastases osseuses dans les carcinomes mammaires (H. Wang et al. 2015). Enfin, dans le cancer de la prostate, Notch1 est associé à l'expression de marqueurs de l'EMT suggérant son rôle dans l'agressivité de la maladie (H. Zheng et al. 2017).

2-1-1-1-4-4 -2- La signalisation WNT

Les protéines WNT sont une grande famille de glycoprotéines riches en cystéine. Elles activent des voies de signalisation conservées entre les différentes espèces en se liant aux protéines réceptrices transmembranaires Frizzleds (Fzs) et aux protéines co-réceptrices transmembranaires LRP-5/6 ou ROR-2 et RYK. Il existe au moins quatre cascades de signalisation WNT distinctes : une voie canonique Wnt/ β -caténine et des voies non canoniques Wnt/ Ca^{2+} , Wnt/PCP et Wnt/PKA (M. D. Gordon et Nusse 2006). L'activation aberrante de la voie Wnt/ β -caténine est étroitement associée à la progression des OS et au développement métastatique. La β -caténine est utilisée comme un marqueur biologique du potentiel métastatique des OS (Iwaya et al. 2003; Y. Lu et al. 2015) . De même, l'expression du récepteur LRP5 est associée au potentiel métastatique des OS et son inhibition supprime les capacités invasives des cellules(Y. Guo et al. 2008). Mécaniquement, WNT/LRP5 module l'EMT des cellules d'OS et stimule la production de métalloprotéines (Y. Guo et al. 2007). De plus, il a été montré que BMP2 et la fibuline-3 induisaient l'EMT dans les OS via la voie canonique de WNT(Tian et al. 2019; S. Wang et al. 2017).Plusieurs microARNs sont impliqués dans la régulation de cette voie. MiR-552-5-p est surexprimé dans les OS et son expression est associée à la régulation positive de WIF1 et à l'établissement des métastases (Cai et al. 2019). Au contraire, les faibles expressions de microARNs comme miR-377/873/758 et 885-5-p dans les OS sont associées à plus de métastases (Danieau et al. 2019). Ces microARNs régulent négativement β -caténine. La voie de signalisation canonique de WNT participe aussi à l'échappement au système immunitaire (Malladi et al. 2016) (Figure 11).

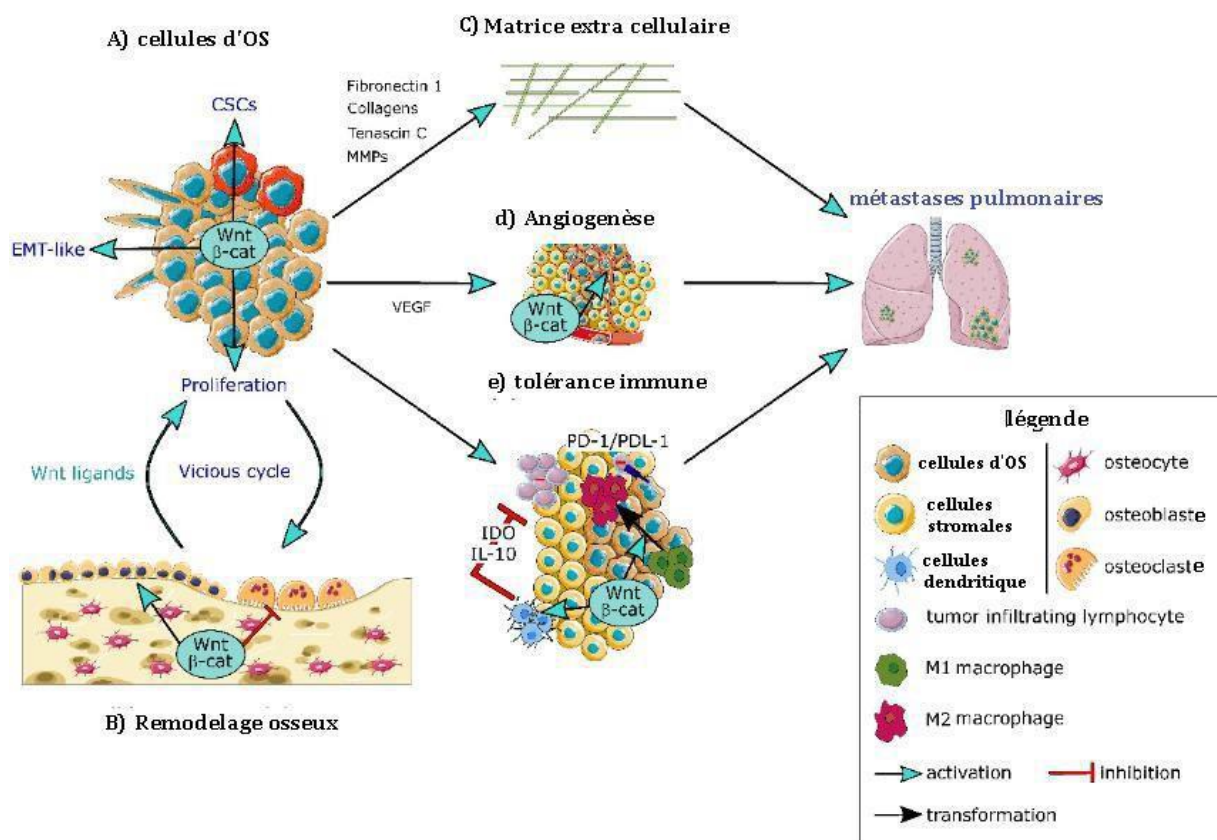


Figure 11 : Le rôle de la voie de signalisation Wnt/β-caténine dans la progression des OS et l'établissement des métastases

A : Wnt/β-caténine améliore la prolifération des cellules tumorales en stimulant l'EMT via différents facteurs comme la fibuline-3 et favorise l'acquisition des propriétés des cellules souches du cancer (CSCs). B : La voie Wnt/β-caténine participe à l'établissement d'un cercle vicieux entre les cellules tumorales et le remodelage osseux. C : La voie Wnt/β-caténine favorise la modulation de la matrice extracellulaire (MEC), augmentant la sécrétion de composants matriciels tels que la ténascine C, la fibronectine 1 ou les collagènes et stimule la dégradation de la MEC en stimulant la sécrétion des MMPs. D : La voie Wnt/β-caténine induit une surexpression de VEGF et la migration des cellules endothéliales, conduisant à une augmentation de l'angiogenèse. E : Wnt/β-caténine participe à l'établissement d'une tolérance en améliorant la polarisation des macrophages pro-tumoraux M2 et en inhibant l'infiltration et les fonctions des lymphocytes T cytotoxiques. Ce complexe participe à la résistance aux médicaments. L'activation de la voie de signalisation Wnt/β-caténine dans les cellules dendritiques conduit à la sécrétion d'IL-10 et d'IDO résultant en l'inhibition des propriétés cytotoxiques des TILs. Ainsi, la voie de signalisation Wnt/β-caténine participe à la progression de la maladie et à l'établissement de métastases pulmonaires. D'après (Danieau et al. 2019).

Concernant les voies de signalisation non canoniques, le complexe Wnt-5a/ROR-2 confère des propriétés invasives aux cellules d'OS en stimulant la production de MMP13 (Enomoto et al. 2009). Plus récemment, Lu et al, ont montré que Wnt-5a était détecté chez 80% des patients de leur cohorte et ROR-2 chez 73,8% des patients. De plus, l'expression de ces protéines corrèle avec la sévérité de la maladie et la présence de métastases (B.-J. Lu et al. 2012).

Ainsi, différentes voies de signalisation influencent le caractère métastatique des cellules tumorales.

2-1-2- La progression des cellules tumorales : de cellules tumorales circulantes à disséminantes (de CTCs à DTCs)

Une fois la membrane basale traversée, les cellules tumorales circulantes (CTCs) peuvent emprunter plusieurs voies pour disséminer. La voie lymphatique conduit à l'invasion des ganglions lymphatiques drainant la tumeur. C'est une extension métastatique de voisinage qui est associée en général à un pronostic plutôt favorable (Kawada et Taketo 2011). Par la voie sanguine, les CTCs envahissent des organes distants comme le foie, le cerveau, l'os ou le poumon. C'est la voie principalement utilisée dans les sarcomes. Plus rarement, les CTCs peuvent se propager par contact en s'implantant sur une membrane comme le péritoine ou la plèvre. Dans le sang, les cellules tumorales circulantes (CTCs) sont exposées à plusieurs contraintes et notamment des forces de cisaillement, des cellules immunitaires, du stress oxydatif. Ainsi, seulement 0.2% des CTCs présentes dans la circulation deviendront des cellules tumorales disséminées (DTCs) (Chambers, Groom, et MacDonald 2002). Pour survivre, elles utilisent diverses stratégies. Dans le cancer de la prostate, il a été montré que les CTCs s'associent aux plaquettes pour se protéger et extravaser en sécrétant du TGF- β (Labelle, Begum, et Hynes 2011). Dans les mélanomes, les DTCs augmentent la production de NADPH via la voie de signalisation des folates se protégeant ainsi du stress oxydatif (Piskounova et al. 2015). Dans les carcinomes mammaires, les DTCs s'associent aux macrophages associés aux métastases (MAMs) en surexprimant VCAM1 pour échapper à la surveillance immunitaire (Q. Chen, Zhang, et Massagué 2011) ; et sont alors à l'origine des rechutes pulmonaires. **Dans les OS, il y a très peu de données sur les DTCs ; probablement du fait d'un manque de système d'enrichissement et de marqueurs de surface.** Néanmoins, en utilisant l'hybridation in situ, Li et al. ont montré dans les OS, une corrélation entre le nombre de DTCs, l'état pathologique des patients et la réponse aux thérapies néoadjuvantes (Li et al. 2019). L'anoïkose est une forme d'apoptose due à l'absence d'attachement à une membrane. Marco et al, ont montré que les DTCs résistaient à l'anoïkose grâce à l'intégrine $\alpha 4$ (Marco et al. 2003). Ils ont aussi montré une corrélation entre l'expression de cette protéine et les métastases des OS. Les cellules peuvent aussi résister à l'anoïkose en stimulant la voie de signalisation PI3K/Akt (Díaz-Montero, Wygant, et McIntyre 2006) ou Wnt/ β -catenin (Rubin et al. 2010). En termes de

marqueurs, ils ont montré que la protéine 1 associée aux métastases (MAT1) étaient fortement exprimée dans les CTCs de phénotype mésenchymateux et les tissus des patients avec métastases. Pour pallier au problème de détection des CTCs dans les débuts du développement métastatique, les diagnostics actuels prennent en compte la présence d'ADN sans cellules tumorales (cfDNA) dans les biopsies liquides (TRACERx Consortium et al. 2019).

2-1-2-1- Influence des cellules endothéliales

Même s'il n'y a pas d'évidence de la corrélation entre la densité des vaisseaux et le processus métastatique dans les sarcomes osseux, **les cellules endothéliales sont fortement impliquées dans l'intra / extravasation des cellules cancéreuses**. Dans le cancer du sein, il a été montré que Les cellules endothéliales jouent un rôle important dans la croissance et l'invasion tumorale (Shekhar et al. 2001). De plus, il a été montré que les cellules endothéliales étaient impliquées dans des phénomènes de chimiorésistance en produisant du TNF- α via NF- κ B (Acharyya et al. 2012). Récemment, il a été montré que les cellules endothéliales favorisent la survie des cellules d'ostéosarcome via l'induction des récepteurs 1 et 4 des acides gras libres (FFA1 et FFA4)(Minami et al. 2020).

2-1-2-2- Le rôle de la niche pré-métastatique

Il est maintenant bien établi que la tumeur primaire produit également des facteurs de croissance, des cytokines et des miARNs qui peuvent être transportés dans des vésicules extracellulaires (VEC) pour modifier des sites locaux et distants afin d'influencer les niches métastatiques et ainsi favoriser le développement de tumeurs disséminées(Bonner et Willms 2021a). Il s'agit de membranes fermées formées d'une bicouche phospholipidique (van Niel, D'Angelo, et Raposo 2018). Selon leur taille, elles sont divisées en trois groupes (Shoucair et al. 2020). Les exosomes qui mesurent entre 50nm et 150nm ; ils proviennent du trafic endosomal et sont le produit de la fusion entre des endosomes tardifs et des corps multivésiculaires. Les exosomes sont des messagers qui peuvent agir à très longue distance. Les microvésicules plus grandes (jusqu'à 1000nm) sont un groupe hétérogène comprenant des oncosomes (liés au cancer) et des migrasomes (liés à la migration cellulaire). Elles sont formées à partir du bourgeonnement vers l'extérieur de la membrane plasmique. Enfin, les

corps apoptotiques (jusqu'à 4000nm) qui résultent de la désintégration de cellules en apoptose. Plusieurs études ont montré que ces particules jouent un rôle essentiel dans le dialogue entre les cellules tumorales et les cellules du microenvironnement (Y Chen et al. 2017; Dai et al. 2018; Bhome et al. 2017). Dans les OS, des analyses protéomiques ont identifié plus de 1000 protéines différentes contenues dans les VEC. Il s'agit en majorité de protéines impliquées dans des processus d'angiogenèse, d'adhésion cellulaire et de migration (Jerez et al. 2017). Macklin et al ont montré que dans les OS de haut grade, les VECs étaient préférentiellement adressées aux poumons(Macklin et al. 2016a) ; ce qui confirme le rôle des VECs dans la préparation d'une niche métastatique. Il a été récemment rapporté que la protéine de fusion Rab22a-NeoF1 et son partenaire PYK2 transportées par des exosomes promeuvent le développement des métastases pulmonaires(Zhong et al. 2021). TGF- β transporté dans les VECs s'est avéré induire la différenciation/activation des fibroblastes pulmonaires avec une expression accrue de la fibronectine (Mazumdar, Urdinez, Boro,Migliavacca, et al. 2020). Ainsi, les VECs sont des acteurs majeurs du processus métastatiques, de l'initiation à la macrométastase (Figure 12) (Perut, Roncuzzi, et Baldini 2019).

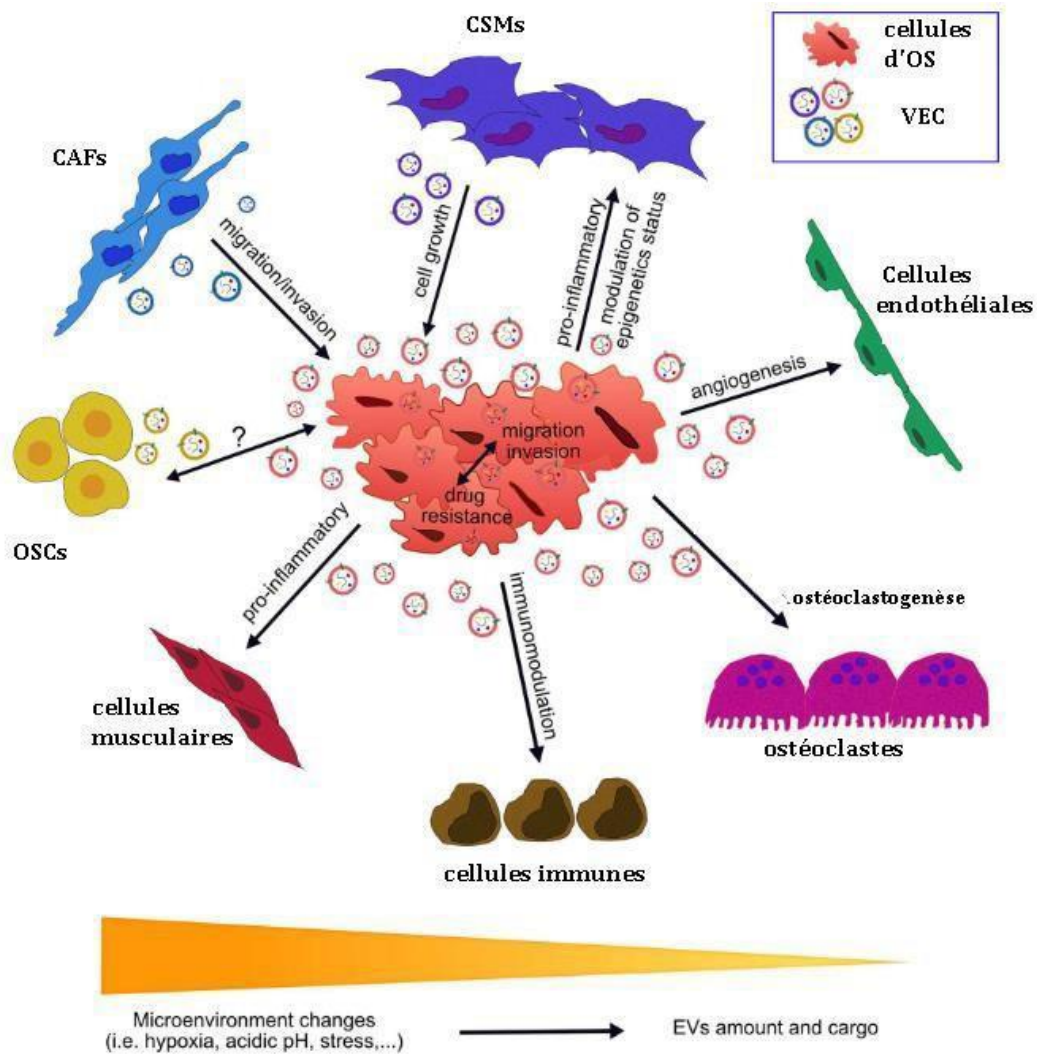


Figure 12 : Le rôle des vésicules extracellulaires dans l'établissement des métastases des OS

Les vésicules extracellulaires sont des acteurs majeurs de la communication cellulaire et sont impliquées dans toutes les étapes du développement métastatique. D'après (Perut, Roncuzzi, et Baldini 2019)

Plus récemment, Mazumdar et al ont montré que les VECs d'origine tumorale identifiées dans les poumons de souris n'ont pas d'effet sur le développement des métastases (Mazumdar, Urdinez, Boro, Arlt, et al. 2020). Cela suggère que le développement métastatique peut être influencé par des événements indépendants de la tumeur primaire. Cela pourrait expliquer les récives observées longtemps après la résection de la tumeur primaire.

2-1-2- La croissance des métastases

2-1-2-1- La dormance

Dans la plupart des cas, les patients développent des métastases des mois après le diagnostic voire des années après totale rémission. Cela suggère qu'une fois infiltrées dans l'organe cible, les DTCs persistent dans le tissu hôte soit en état de dormance ou en proliférant très lentement. Les cellules tumorales en dormance échappent à la surveillance immunitaire et aux traitements qui ciblent les cellules proliférantes. Deux mécanismes de dormance ont été décrits (Phan et Croucher 2020) :

- Un mécanisme intrinsèque qui bloque le cycle cellulaire et empêche les cellules tumorales de proliférer ; induisant un état de quiescence. Par exemple, dans des modèles précliniques de carcinomes, il a été montré que TGF- β et BMPs contraignent les DTCs à la quiescence et les empêchent de s'auto-renouveler (Gao et al. 2012). Dans les cancers ovariens et pancréatiques, les cellules métastatiques rentrent dans un état de quiescence en inhibant l'expression de protéines impliquées dans les phases G1/S du cycle cellulaire telles que P27 et la cycline D1 (Ewton et al. 2011).

- Un mécanisme dépendant du microenvironnement dans lequel le tissu hôte peut restreindre le développement des métastases grâce à un appauvrissement en nutriments, par le blocage de l'angiogenèse et par l'action du système immunitaire. On parle alors de phénomènes de sénescence. Le microenvironnement induit l'apoptose des cellules qui prolifèrent au sein de la micro-métastase et empêche ainsi la métastase d'évoluer (1-3mm).

Ces deux mécanismes ne sont pas exclusifs et on peut observer des micrométastases avec des cellules tumorales quiescentes. Dans les OS, Almog et al. ont montré que les phénomènes de dormance sont étroitement liés à l'angiogenèse (Almog et al. 2009). Dans des modèles précliniques de dormance, ils ont montré que l'expression de protéines anti-angiogéniques était augmentée par rapport aux modèles de prolifération. D'autre part, il a été montré que des protéines anti-apoptotiques comme BCL-xl, l'activation de l' $\alpha 5\beta 1$ -intégrine via la voie NF- κ B et le ratio protéique ERK/p38- MAPK jouent un rôle dans les phénomènes de dormance des OS (L. Zhu, McManus, et Hughes 2013). Tiram et al. ont montré dans des modèles précliniques et chez les patients l'implication des micro-ARNs dans les phénomènes de dormance des OS (Tiram et al. 2016). Ils ont observé une perte d'expression des microARNs miR-34a, miR-93 et miR-200c durant le passage d'un état de dormance à un état prolifératif.

Malgré l'importance clinique de ce phénomène, les mécanismes sous-jacents restent encore mal connus surtout ceux permettant la sortie de la dormance. Néanmoins, dans les métastases cérébrales du cancer du sein, il a été montré que les astrocytes participent à la sortie de dormance en induisant la perte d'expression de PTEN dans les cellules tumorales (L. Zhang et al. 2015). Dans les modèles pré-cliniques de carcinomes mammaires, les cellules métastatiques dans la moelle osseuse sortent de dormance en régulant de manière positive VCAM1 (Aguirre-Ghiso, Bragado, et Sosa 2013). Il est important de cibler la réactivation des cellules dormantes pour empêcher l'expansion des tumeurs disséminées et réduire l'apparition des maladies résiduelles.

2-1-2-2- L'échappement au système immunitaire

La survie des DTCs dans un nouvel environnement dépend aussi de leur capacité à échapper au système immunitaire présent. Ce dernier exerce dans le tissu hôte une action anti-métastatique qui peut être détournée par les cellules métastatiques (Garner et de Visser 2020).

2-1-2-2-1- Les lymphocytes infiltrant les tumeurs (TILs)

Après les TAMs, les lymphocytes T constituent la population la plus représentée dans les infiltrats des tissus d'OS (T. Liu et al. 2015; Inagaki et al. 2016). Des analyses récentes estiment que les TILs sont détectés dans 75% des OS et dans 86% des métastases (Koirala et al. 2016). Ces TILs migrent des organes lymphoïdes secondaires vers les sites tumoraux qu'ils envahissent par la suite. Ils sont composés de différentes sous-populations de lymphocytes T et présentent une réactivité immunologique très spécifique par rapport aux lymphocytes circulants et non infiltrants (Rosenberg 2001). Fritzsching et al ont été les premiers à mettre en évidence un profil de TILs déterminant le devenir des patients (Fritzsching et al. 2015). En effet, les patients avec un rapport CD8+/FOXP3+ supérieur à 3,08 au moment du diagnostic ont eu un meilleur taux de survie après traitement. Ainsi, les TILs apparaissent comme des cibles thérapeutiques clé grâce à leur rôle d'immunosuppresseurs. Dans les mélanomes, l'utilisation de TILs enrichis en anti-gènes tumoraux a donné des résultats positifs chez les patients métastatiques (Geukes Foppen et al. 2015). Dans les OS, l'utilisation de cette technique n'a pas été concluante (Hinrichs et Rosenberg 2014). Koirala et al, ont mis en évidence un sécrétome utilisé par les cellules cancéreuses pour inactiver les TILs (Koirala et al. 2016). En effet, les cellules métastatiques d'OS expriment un certain nombre de protéines de

la famille des B7 et principalement PDL-1 et HHLA2 pour échapper au système immunitaire. HHLA2 est surexprimé dans les échantillons de patients métastatiques par rapport aux patients avec une tumeur locale et est associée à un mauvais pronostic vital. Bien qu'il n'y ait pas de corrélation directe entre le niveau de HHLA2 et la quantité de TILs, ils ont néanmoins montré que HHLA2 est associé à un phénotype pro-tumoral (lymphocytes T CD3+, lymphocytes B CD20+, macrophages CD68+...). De même, B7-H3 est fortement exprimé par les cellules d'OS et corrèle avec une maladie métastatique (Zang et Allison 2007). Dans 100% de cas, PDL1 et PDL2 sont surexprimés. La liaison de ces ligands au récepteur PD-1 des TILs régule négativement l'activation des cellules T (Z. Zhu et al. 2017). Cela a pour conséquence, l'inhibition de leur propriété cytotoxique (Figure 13).

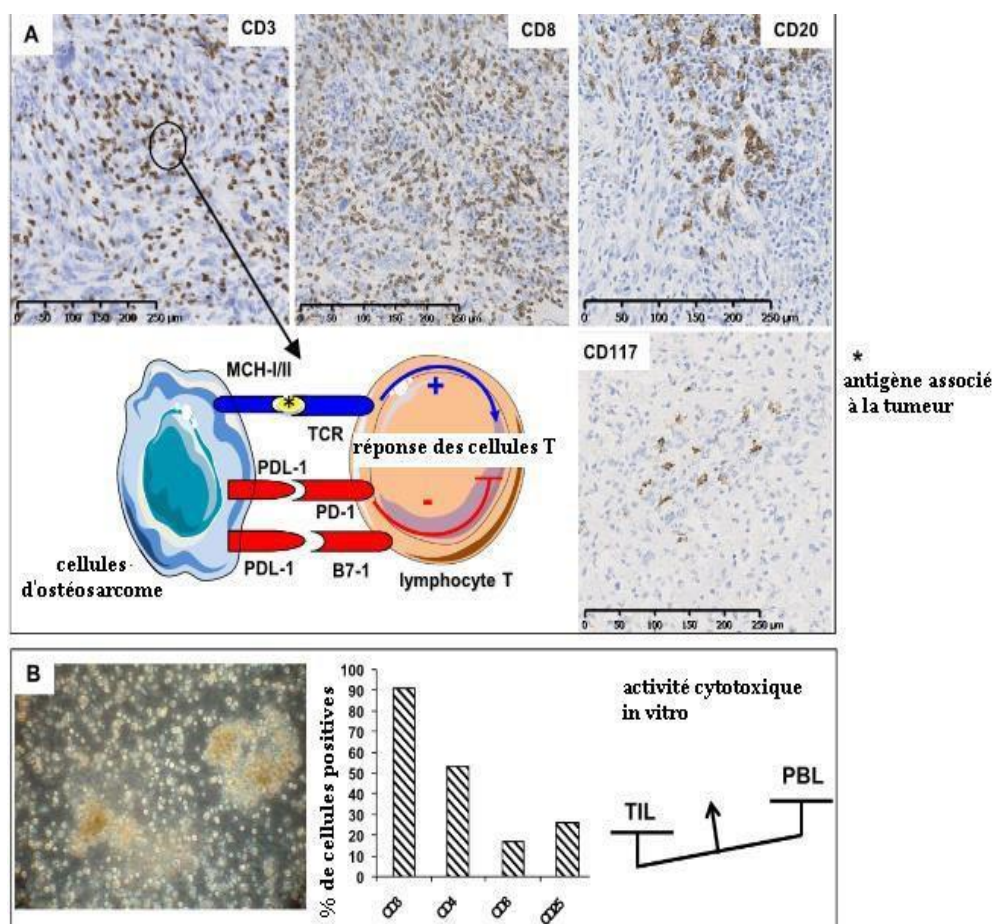


Figure 13 : L'expression des TILs dans les tissus d'ostéosarcome

(A) Immunohistochimie démontrant l'infiltrat CD3+ des tissus de l'ostéosarcome humain. Les cellules CD3 sont principalement composées de populations de lymphocytes T CD8. Le microenvironnement local immunitaire des cellules d'ostéosarcome est également composé de lymphocytes B (CD20) et de quelques mastocytes (CD117). Les cellules d'ostéosarcome expriment PDL-1 qui se lie à PD-1 et/ou B7/1 exprimé à la surface cellulaire des lymphocytes T. Cette liaison est associée à l'inhibition du signal d'activation des cellules T (TCR) déclenché par le système d'histocompatibilité majeur (MHC). Cela entraîne une réduction de la prolifération des cellules T et une augmentation de leur apoptose. (B) Les TILs de rat isolés et développés à partir d'OSRGA Ostéosarcome de Sprague Dawley. Les TILs expansés sont composés de cellules CD4 et CD8 qui présentent une activité cytotoxique in vitro plus élevée que les lymphocytes du sang périphérique (PBL). Un infiltrat similaire a été observé dans des échantillons humains. D'après (M.-F. Heymann, Lézet, et Heymann 2019)

Ainsi, l'étude des TILs a permis le développement de nouvelles approches thérapeutiques dans le traitement des ostéosarcomes. Dans les modèles murins, le blocage de la liaison PD-1/PDL-1 a eu un impact thérapeutique significatif, en réduisant la taille des tumeurs et en augmentant la survie (Lussier et al. 2015). Trois essais cliniques impliquant des anti-PD-1 et anti-PDL-1 sont en cours (n° NCT : 03006848 ; 02301039 ; 03013127). D'autres facteurs comme la triade OPG / RANK / RANKL peuvent être utilisés par les cellules d'OS pour moduler le comportement des TILs (Renema et al. 2016). Dans le mélanome, il a été montré que le blocage de RANKL sauvait les cellules T spécifiques de la délétion thymique et augmentait la

réponse immunitaire anti-tumorale (Khan et al. 2014). Dans les modèles murins d'ostéosarcome, le transfert du gène OPG empêche la formation de lésions ostéolytiques associées au développement de la tumeur et conduit à une multiplication par quatre de la survie des souris 28 jours après l'implantation (Lamoureux et al. 2007).

2-1-2-2-2- Les cellules natural killer (NK)

Dans les OS, il a été montré que les cellules tumorales disséminantes compromettent la reconnaissance des lymphocytes-T en inhibant l'expression du récepteur de surface HLA de classe 1 (Tsukahara et al. 2006). Cependant, il a été montré que la régulation négative de HLA1 facilite la reconnaissance des cellules NK (Schiavone et al. 2019). Pour échapper aux cellules NK, les DTCs diminuent leur expression de Fas. D'ailleurs, une faible expression de Fas corrèle avec un mauvais pronostic vital (Worth et al. 2002). Dans les cancers pulmonaires et les carcinomes mammaires, les cellules tumorales échappent à la surveillance des cellules NK en inhibant de manière autocrine WNT (Malladi et al. 2016). Dans les OS, IL-10 est aussi impliqué dans l'échappement à la surveillance des cellules NK (Whelan et al. 2010).

2-1-2-3- Le Rôle des cellules de la tumeur primaire dans la croissance des métastases

Par ailleurs, les CSMs participent à l'échappement au système immunitaire des cellules d'OS (Chang et al. 2015). D'une part, le TGF- β sécrété permet d'atténuer les réponses immunitaires antitumorales. D'autre part, en analysant l'expression du génome entier, Mohseny et al. ont constaté que, dans les CSMs tumorigènes, l'expression d'un gène associé à la réponse des cellules T (Fut-7) et des gènes liés au complexe majeur d'histocompatibilité (H2-K1 et H2-D1) était réduite, tandis que le gène pro-angiogénique Est1 était surexprimé (Mohseny et al. 2012). L'acidose joue aussi un rôle dans la participation des CSMs à l'échappement du système immunitaire. En effet, dans les CSMs, l'acidose active la voie de signalisation NF- κ B, favorise sa nucléarisation et stimule l'expression de P50, RelA et RelB (Avnet et al. 2017). Cela promeut la sécrétion de cytokines et de facteurs de croissance impliqués dans l'échappement au système immunitaire (IL-1, IL-6, IL-8, CCL5, CXCL2, GM-CSF, G-CSF...).

Les CSMs contribuent activement à la croissance des macrométastases en augmentant l'expression de CXCR4 dans les cellules d'ostéosarcome via la sécrétion de VEGF (P. Zhang et al. 2013). Enfin, les CSMs promeuvent la survie des cellules cancéreuses et la résistance à

plusieurs médicaments tels que cisplatine et la doxorubicine en augmentant l'expression des gènes de résistance comme SDF-1 ; MDR-1 et MRP (Tu et al. 2016; Lis et al. 2011).

Le développement des OS est associé à une ostéolyse para-tumorale provoquant de fortes douleurs chez les patients. Dans certains cas, l'agressivité de la maladie a été associée à des marqueurs d'ostéolyse comme RANKL, RANK, TNFSF11 (Avnet et al. 2008). Il est établi que les ostéoclastes sont des agents pro-tumoraux impliqués dans l'initiation de la tumeur (Cackowski et al. 2010). Bien qu'une corrélation positive ait été faite entre la diminution de l'activité ostéoclastique et le développement métastatique (Endo-Munoz et al. 2010), Ibanez et al, ont montré que les ostéoclastes sont des immunomodulateurs qui stimulent la réponse des cellules T CD4+ dans un contexte inflammatoire (Ibáñez et al. 2016). Ainsi, les ostéoclastes sont des acteurs majeurs de la progression tumorale soit par leur action résorbative aux stades précoces, et/ou par leur impact sur le système immunitaire. Néanmoins, beaucoup de zones d'ombre restent à être élucidées (Corre et al. 2020).

Malgré les connaissances actuelles, il n'y a toujours pas de cibles thérapeutiques efficaces permettant de lutter contre l'apparition des métastases et/ou les récurrences dans les OS. Le problème réside donc dans la nature même des métastases, qui sont très complexes et bien plus hétérogènes que les tumeurs primaires (D. Wang et al. 2019). Il est donc important de mieux comprendre cette hétérogénéité pour pouvoir traiter les métastases efficacement.

2-1-3- L'hétérogénéité des métastases

Les métastases ont longtemps été considérées comme un phénomène tardif dans le développement tumoral. Aujourd'hui, il est établi qu'elles sont inscrites dans les propriétés de la tumeur primaire malgré d'importantes disparités observées (Stoecklein et Klein 2010) et qu'elles peuvent se former très tôt au cours du développement tumoral (Schardt et al. 2005). Des comparaisons histologiques sur une cohorte de sarcomes osseux ont montré que 60% des tumeurs partageaient le même paysage ostéoblastique ou chondroblastique avec les métastases correspondantes tandis que 40% avaient un paysage totalement différent (Jambhekar et al. 2011). Les métastases des OS peuvent donc s'avérer plus complexes et hétérogènes que la tumeur primaire correspondante. Il existe plusieurs modèles de

disséminations tumorales qui pourraient expliquer l'hétérogénéité des métastases.

2-1-3-1- Les Modèles de Dissémination

2-1-3-1-1- Le modèle linéaire

Historiquement, les métastases ont été décrites selon un modèle de progression linéaire (Ghajar et Bissell 2016). Il stipule que les métastases apparaissent **bien après** que la tumeur primaire se soit développée et ait atteint un certain volume. Dans ce modèle, les métastases sont le **résultat de mutations génétiques qui se sont accumulées dans la tumeur primaire** au fil du temps et ont permis à un groupe particulier de **cellules tumorales d'acquérir des capacités métastatiques**. Les mutations oncogènes apparaissent sur une « sélection de clones dominants » et décrivent **une évolution monoclonale** de la maladie (McGranahan et Swanton 2017). Ce modèle de dissémination est valable dans plusieurs cancers dans lesquels le volume de la tumeur primaire est un facteur de risque à l'apparition des métastases et des signatures moléculaires semblables ont été identifiées entre les métastases et la tumeur correspondante (Albini, Mirisola, et Pfeffer 2008).

2-1-3-1-2- Les voies de progression parallèles

Dans les tumeurs **avec un diagnostic précoce des métastases**, le modèle linéaire ne peut pas s'appliquer. On parle alors de « voies de progression parallèles » (Ehnman et al. 2019). Ici, les cellules tumorales sortent très tôt du site primaire et évoluent alors indépendamment de la tumeur primaire. Cette description est en accord avec le paysage mutationnel observé dans les OS, avec des clones métastatiques plus ou moins différents de ceux dans la tumeur primaire. Il décrit **une évolution polyclonale** avec des mutations qui apparaissent dans différentes cellules (McGranahan et Swanton 2017). Dans le cancer du sein par exemple, il a été montré que les cellules qui disséminent dans la moelle osseuse subissent des altérations génétiques complètement différentes des cellules qui restent dans la tumeur primaire (Braun et al. 2005).

2-1-3-1-3- Le modèle organotropique

Les métastases peuvent aussi être décrites selon un modèle organotropique dans lequel il ne s'agit plus du moment où les cellules disséminantes sortent mais de leur tropisme (seed) pour un organe (soil) (Paget 1889). Plusieurs études ont montré la propension du cancer du sein à métastaser au niveau des os longs, du cerveau et des glandes surrénales (Brooks et al. 2010). Weil R et al, ont montré que les cellules des carcinomes mammaires qui expriment les oncogènes ERB-B métastasent préférentiellement dans le système nerveux central (Weil et al. 2005). Ainsi l'expression de certains gènes dans la tumeur primaire peut prédire et définir le second site de dissémination (Ramaswamy et al. 2003).

2-1-3-1-4- Le modèle anatomique/mécanique

Le modèle anatomique/mécanique quant à lui, stipule que les barrières mécaniques du tissu hôte contrôlent l'implantation des cellules métastatiques. Déjà en 1928, Ewing a montré que des agrégats de CTCs pouvaient être piégés dans les premiers vaisseaux qu'elles rencontrent et s'y implanter ; ce qui justifie certaines lésions métastatiques observées. On parle alors de niches « pré-métastatiques » qui jouent un rôle majeur dans l'acquisition des capacités métastatiques des cellules. Dans les Rhabdomyosarcomes, Libura et al, ont montré que les cellules tumorales exprimant CRCX4 métastasent de manière préférentielle dans des tissus exprimant SDF1 (CXLC12) (Libura et al. 2002). Récemment, Lee et al ont montré que l'inflammation et particulièrement IL-6 pouvait prédisposer le foie à être un site métastatique favorable dans le cancer du pancréas (J. W. Lee et al. 2019).

On peut observer plusieurs modèles de dissémination dans une même tumeur. Dans les OS, Gambera et al, ont décrit grâce à l'utilisation d'une souris chimérique (RGB) p53^{-/-} Rb^{-/-}, le paysage clonale de l'ostéosarcomatose (Gambera et al. 2018). Aux stades précoces (25 jours) la croissance tumorale suit un modèle parallèle avec une évolution polyclonale. Cependant dans les tumeurs développées (50 jours) on observe l'émergence de clones dominants en périphérie ce qui correspond plutôt à un modèle linéaire. Grâce au séquençage génomique et à l'analyse du génome entier, Wang et al ont confirmé que les métastases pulmonaires **dans les OS, suivent les deux principaux modèles de dissémination : linéaire et parallèle** (D. Wang

et al. 2019). A cela, il faut ajouter **une notion de temps, de stratégie et d'hétérogénéité intracлонаle** pour décrire parfaitement le paysage métastatique des OS (Figure 14).

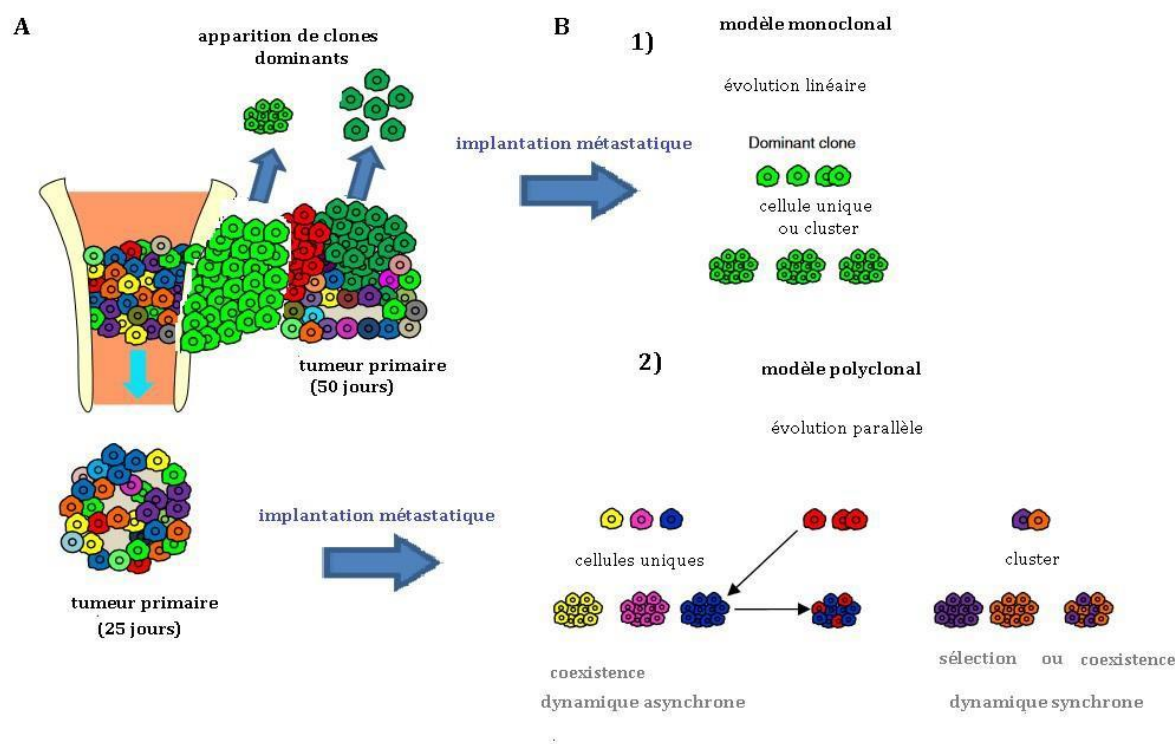


Figure 14 : Représentation schématique de l'évolution clonale de l'ostéosarcomagenèse

A1 : Les temps précoces du développement tumoral sont caractérisés par un modèle polyclonal avec la coexistence de différents clones cellulaires évoluant indépendamment. B2 : A ce stade, les clones qui sortent de la tumeur forment des métastases différentes de la tumeur primaire. Les cellules et/ ou clusters peuvent évoluer de manière synchrone ou asynchrone. On peut observer la coexistence de différents clones ou l'évolution sélective de certains.

A2 : Les tumeurs développées (50 jours) sont caractérisées par la sélection de clones dominants. B1 : à ce stade les clones qui sortent de la tumeur forment des métastases semblables à la tumeur primaire. D'après (Gambera et al. 2018)

2-1-3- 2- Les cellules d'origine : concept des cellules souches cancéreuses (CSCs)

Les tumeurs peuvent être considérées comme des organes formés à partir d'une sous population particulière : les cellules souches cancéreuses (CSCs). Cette théorie suit un modèle hiérarchique qui stipule que l'hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle de la tumeur est due à des mutations affectant des cellules avec des caractéristiques de cellules souches (Visvader et Lindeman 2012). Ce mécanisme cellulaire s'oppose au modèle stochastique qui décrit une évolution clonale de la tumeur. Dans ce modèle, les mutations génétiques affectent différentes populations cellulaires de la tumeur et leur confèrent un avantage clonal.

Aujourd'hui, on sait que ces deux modèles ne sont pas exclusifs. En effet, les études de filiation génétique ont permis de mettre en évidence l'existence de modèles « mixtes » avec la présence de clones de CSCs génétiquement différents au sein de la même tumeur (Z.-M. Zhao et al. 2016). Il faut donc différencier la notion de **cellule souche cancéreuse (CSC) qui est à l'origine de la malignité des tumeurs** (Valent et al. 2012) de la cellule d'origine qui subit les premiers événements mutagènes à l'origine d'une expansion clonale (Figure 15). Dans certaines tumeurs, il peut s'agir de la même cellule (Roessner, Lohmann, et Jechorek 2021).

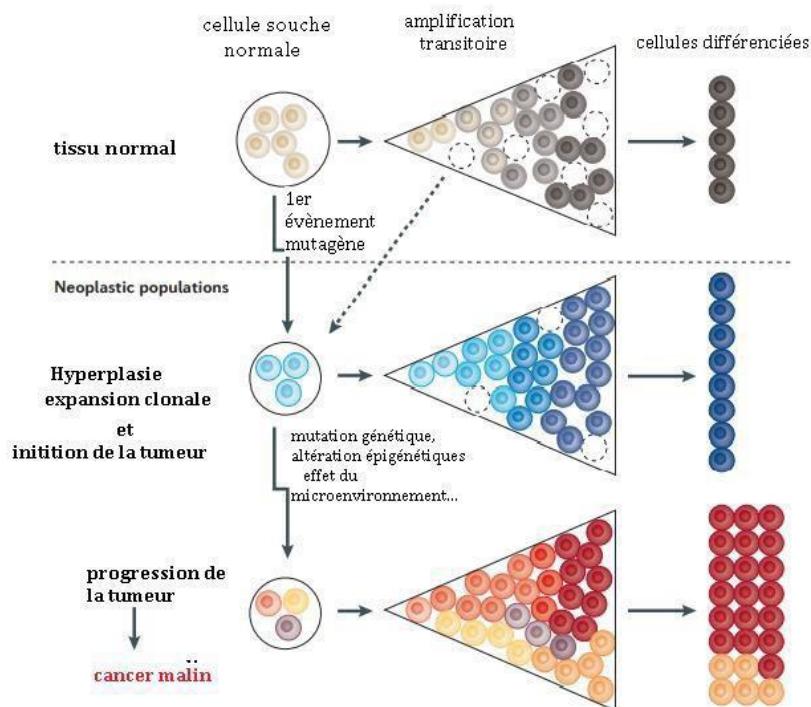


Figure 15 : Modèle d'évolution des tumeurs à partir des cellules souches cancéreuses (CSCs)

Un cancer peut être considéré comme un organe qui se forme et se régénère à partir de cellules souches. L'évolution tumorale suit alors une progression hiérarchique. Un premier événement mutagène sur les cellules souches normales ou les progéniteurs entraîne une dérégulation du cycle cellulaire ce qui entraîne une phase d'hyperplasie (initiation de la tumeur). Ensuite sous certaines conditions pouvant être liées au microenvironnement, aux mutations génétiques et épigénétiques, des clones de cellules acquièrent des caractéristiques de cellules souches ; ce qui correspond à l'acquisition du caractère malin de la tumeur. D'après (Valent et al. 2012)

Grâce à leur tolérance au système immunitaire, leur « low cycling » et leur capacité à être dans un état quiescent (Vallette et al. 2019), le modèle de CSCs explique en partie la résistance des cancers disséminés aux traitements et l'apparition de maladies résiduelles. Dick et al, ont

été les premiers à décrire de telles cellules dans les leucémies myéloïdes aiguës (Bonnet et Dick 1997). Par la suite, les CSCs ont été décrites dans diverses tumeurs solides (Visvader et Lindeman 2008). Dans les carcinomes mammaires, le rôle des CSCs dans la progression tumorale a été largement étudié. Theodoropoulos et al ont montré que la majorité des cellules qui sortent de la tumeur et initient les métastases (MICs) sont des CSCs (Theodoropoulos et al. 2010). Dans ces cancers, les CSCs sont d'ailleurs utilisées comme un marqueur précoce du développement métastatique.

2-1-3- 2-1- Les cellules souches des ostéosarcomes (OSCs)

Dans les OS, Gibbs et al, ont été les premiers à caractériser des cellules cancers avec des propriétés de cellules souches (OSCs) in vitro et dans des modèles pré-cliniques (Gibbs et al. 2005; Gibbs, Levings, et Ghivizzani 2011). Yang M et al, et bien d'autres équipes ont démontré la présence de « side populations » capables d'exclure le colorant Hoechst 33342 dans les lignées cellulaires d'OS et dans les tumeurs humaines (M. Yang et al. 2011). Ces cellules aux caractéristiques de cellules souches notamment grâce à leur expression d'Oct-4 et Nanog et leur régulation par Sox2 (Basu-Roy et al. 2015), sont capables de former des sphères in vitro et de reconstituer l'hétérogénéité de la tumeur in vivo. Durant ces dernières années, un effort considérable a été mis en place pour identifier des marqueurs des OSCs (Tableau 12) (Schivone et al. 2019). Parmi les différents marqueurs utilisés, les OSCs surexpriment l'ALDH1 dont l'expression est associée à la résistance aux chimiothérapies et au processus métastatique (Honoki 2010; Greco et al. 2014). D'autre part, les OSCs partagent des marqueurs communs avec les CSMs tels que CD117 et stro-1. Ces marqueurs sont associés à la chimiorésistance et au processus métastatique (Adhikari et al. 2010). Tirino V et al, ont montré que les OSCs qui expriment CD133 ont de fortes capacités tumorigènes in vivo (Tirino et al. 2011). Chez les patients, l'expression de ce marqueur est associée à un mauvais pronostic vital (Fujiwara et al. 2014). Enfin, Tian et al, ont montré qu'en inhibant l'autophagie, les OSCs CD271+ perdaient leurs propriétés de cellules souches (D. Zhang et al. 2016).

Récemment, différents micro-ARNs ont été identifiés dans la régulation du « caractère souche » des cellules d'OS. Ils régulent le phénotype des cellules souches, leurs propriétés de migration et d'invasion en ciblant des voies moléculaires telles que PTEN, POU5F1 Wnt ou Jagged1 (J. Lu et al. 2017; R. Zhang et al. 2018; D. Zhao et al. 2017; X. Guo et al. 2017; La Noce et al. 2018).

Marqueurs des OSCs
Oct4 (octamer-binding transcription factor 4), Nanog (Nanog Homeobox), transcription factors, stemness markers
Sox2 (SRY-related HMG-box-2) transcription factor, Stemness markers
ALDH1 (Aldehyde desyhydrigenease-1)
CD24 (cell adhesion molecule)
CD44 (receptor of hyaluronic acid)
CD117 (receptor of stem cell growth factor)
Stro-1 (marker of mesenchymal stem cells)
CD133 (prominin-1)
CD271 (low-affinity nerve growth factor receptor)
CBX3 (Chromobox protein homolog 3)
ABCA5 (ATP-binding cassette, sub-family A, member 5)
KLF4 (Kruppel Like Factor 4)
SATB2 (Special AT-rich sequence-binding protein 2)
RAB39A (Rab small GTPase) -RXRB (Retinoid X Receptor Beta)
TBIXR1 (Transducin (beta)-like 1 \times -linked receptor 1)
SENPI (Sentrin Specific Protease-1)
hTERT (human telomerase reverse transcriptase)

Tableau 12 : Les principaux marqueurs des OSCs

Ce tableau récapitule les différents marqueurs des cellules souches des ostéosarcomes. D'après (Schiavone et al. 2019)

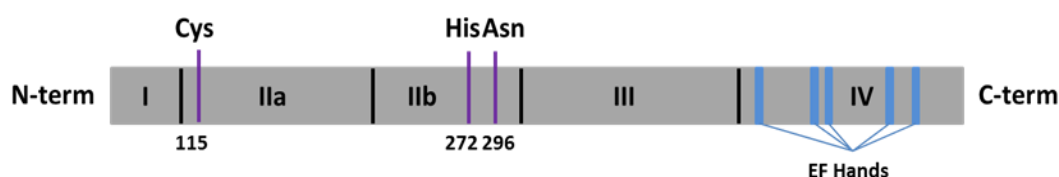
Toutes ces études montrent que les OSCs sont une cible thérapeutique prometteuse. Cependant, bien que plusieurs études aient montré l'implication des cellules souches dans la progression des tumeurs et l'établissement des métastases (Andrique et al. 2018; Schiavone et al. 2019), les mécanismes sous-jacents sont très mal connus. De plus, les marqueurs cités plus haut, ne sont pas spécifiques des OSCs ce qui limite leur identification, leur étude et leur ciblage. Il est donc important de déterminer la place et les fonctions des OSCs dans le

processus métastatique pour pouvoir traiter de manière efficace, les OS disséminés et les récidives.

2-1-3- 2-1-1- La calpaïne-6

Les calpaïnes sont une famille de protéases à cystéine, qui interviennent dans divers processus biologiques tels que la prolifération cellulaire, l'apoptose, la différenciation (Croall et Ersfeld 2007). Elles sont classées en deux groupes. D'une part, les calpaïnes classiques sont caractérisées par un domaine C-terminal qui comprend un motif EF-Hand permettant la liaison au calcium et un domaine N terminal permettant l'activité protéolytique. D'autre part, les calpaïnes non conventionnelles n'ont pas de domaines de liaison au calcium. La calpaïne 6 (CAPN6) est une calpaïne non conventionnelle, caractérisée par un domaine catalytique muté (Figure 16). De ce fait, elle n'a pas d'activité catalytique connue à ce jour.

Calpaïnes = protéases à cystéine non-lysosomales



Calpaïne-6 = calpaïne non conventionnelle

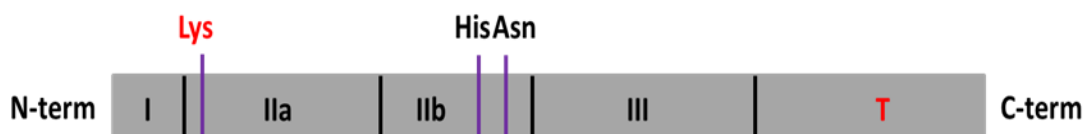


Figure 16 : Comparaison structurale entre la calpaïne-6 et les calpaïnes classiques

Les calpaïnes sont des protéases à cystéines, calcium-dépendantes. Elles sont divisées en deux groupes : les calpaïnes classiques et les calpaïne atypiques. La calpaïne-6 est une calpaïne atypique qui partage la même structure en 4 domaines que les calpaïnes conventionnelles. Cependant, elle possède un domaine C-terminal qui ressemble plus au domaine C2 d'une pkc. D'autre part, la calpaïne 6 n'a probablement pas de fonction catalytique du fait de la substitution de la cystéine par une lysine dans le domaine catalytique. D'après (Croall et Ersfeld 2007).

Par ailleurs, la calpaïne-6 diffère des autres calpaïnes ubiquitaires par son expression qui est restreinte aux tissus embryonnaires (Dear et Boehm 1999). Chez l'adulte, l'expression de la calpaïne-6 est associée à un contexte pathologique.

2-1-3- 2-1-1-1- Les fonctions cellulaires de la calpaïne-6

Initialement, la calpaïne-6 a été décrite comme une protéine régulant la dynamique des microtubules et l'organisation du cytosquelette via la polymérisation de l'actine dans les tissus embryonnaires (Tonami et al. 2007). In vivo, il a été montré que la calpaïne-6 inhibe la différenciation du muscle squelettique (Tonami et al. 2013). Récemment, Miyazaki et al, ont mis en évidence, le rôle de la calpaïne-6 dans l'épissage des ARNs dans un contexte inflammatoire (Miyazaki et al. 2016). Cette étude suggère aussi un rôle de la calpaïne 6 dans les phénomènes d'endocytose. Oh et al, ont montré dans des tissus placentaires que la calpaïne-6 interagit avec VEGFA et promeut ainsi l'angiogenèse (M. Oh et al. 2019). Ainsi, la calpaïne-6 pourrait être une cible thérapeutique potentielle dans l'inhibition de la néovascularisation associée aux maladies. Enfin, par analyse de puces à ARNs, Kim et al, ont montré un tout nouveau rôle de la calpaïne-6 dans la formation des cils primaires et la régulation négative de la signalisation sonic hedgehog (Kim et al. 2019).

2-1-3- 2-1-2- La calpaïne-6 dans les cancers

La calpaïne-6 est largement exprimée dans les tissus tumoraux (S.-J. Lee et al. 2007; Sun-Joo Lee et al. 2008; Rho et al. 2008; Andrique et al. 2018). Dans les sarcomes utérins, il a été montré que l'expression de la calpaïne 6 corrèle avec le grade des tumeurs (Sun-Joo Lee et al. 2008). Dans le cancer du foie, Liu et al ont montré que la calpaïne-6 promeut la prolifération des cellules tumorales en inhibant l'apoptose via la signalisation PI3K-Akt (Y. Liu et al. 2011). Récemment, ils ont montré que le microARN miR-449a servait d'inhibiteur de tumeur et régulait de manière négative la calpaïne-6 (Y. Liu et al. 2016). La calpaïne-6 est donc associée au développement tumoral. A ce jour, une seule exception est connue. En effet, dans le carcinome épidermoïde de la tête et du cou, la calpaïne-6 semble avoir un rôle de suppresseur de tumeur (Y. Xiang et al. 2017). Dans les ostéosarcomes, des premières études de Marion et al, ont montré que la calpaïne-6 est fortement exprimée dans les récives (Marion et al.

2012). Cette expression dans des tumeurs osseuses est inversement corrélée à la réponse des patients au traitement. La calpaïne-6 est donc associée à la chimiorésistance des ostéosarcomes. Récemment, Caroline Andrique et al, ont montré que la calpaïne-6 identifie des cellules d'OS avec des caractéristiques de CSCs (Andrique et al. 2018). Ces cellules ont également la capacité de disséminer dans les poumons et de rester sous forme de maladie résiduelle plusieurs mois après l'injection chez la souris. D'autre part, la calpaïne-6 maintient la population de CSCs en stimulant l'autophagie et en inhibant la sénescence (Figure 17).

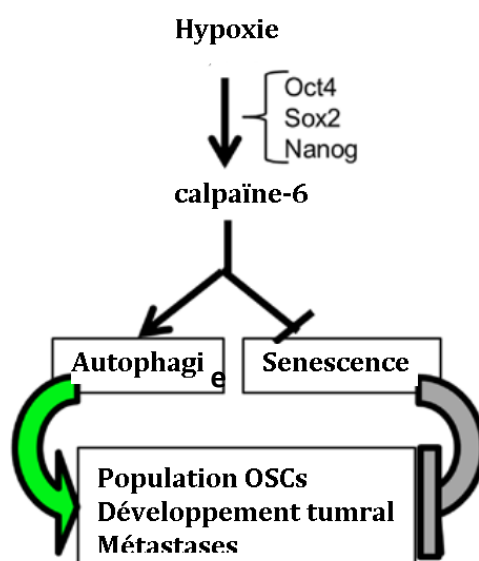


Figure 17 : Représentation schématique de la contribution de la calpaïne-6 au maintien des OSCs sous conditions hypoxiques.

La calpaïne-6 identifie des cellules d'OS avec des caractéristiques de CSCs. D'autre part, la calpaïne-6 maintient la population de CSCs en stimulant l'autophagie et en inhibant la sénescence. D'après (Andrique et al. 2018)

Toutes ces études suggèrent que **la calpaïne-6, en plus d'être un marqueur spécifique des OSCs**, apparaît comme une cible thérapeutique potentielle.

3- La signalisation HIPPO

La voie de signalisation HIPPO joue un rôle majeur dans le développement et la croissance des organes mais aussi dans la formation et l'expansion des tumeurs (Rothzerg et al. 2021). Cette voie très conservée chez les mammifères, joue un rôle important dans l'homéostasie tissulaire en régulant la prolifération, l'apoptose et la différenciation (Ahmed et al. 2017). La voie HIPPO est activée à la suite de la phosphorylation des kinases 1 et 2 (LATS1 / 2) par les protéines kinases STE-20 (MST1 / 2) (Figure 18). Cette phosphorylation est coordonnée respectivement

par les protéines régulatrices salvador homologue 1 (Sav1) et l'activateur Mobkinase 1A (Mob1). Les effecteurs de cette voie sont les facteurs YAP et TAZ. La localisation subcellulaire, la stabilité et l'activité de YAP/TAZ sont principalement régulées de manière post-transcriptionnelle (Kovar, Bierbaumer, et Radic- Sarikas 2020). L'activation de la voie Hippo induit la phosphorylation des sérines 127 et 397 de YAP et des sérines 89 et 311 de TAZ et la rétention de ces facteurs dans le cytoplasme et/ou leur dégradation par le protéasome (Figure18) (B. Zhao et al. 2010). Au contraire, les phosphorylations des tyrosines 357 de YAP et 316 de TAZ entraînent leur translocation au noyau et leur activation. Dans le noyau, ils forment des complexes avec différents facteurs de transcription comme TEAD, SMAD ou TCF (Piccolo, Dupont, et Cordenonsi 2014). La voie HIPPO interagit avec différents signaux dépendants du contact cellule-cellule ou de la matrice extracellulaire cérébrale KIBRA (Kidney/BRAin protein) (Figure 18).

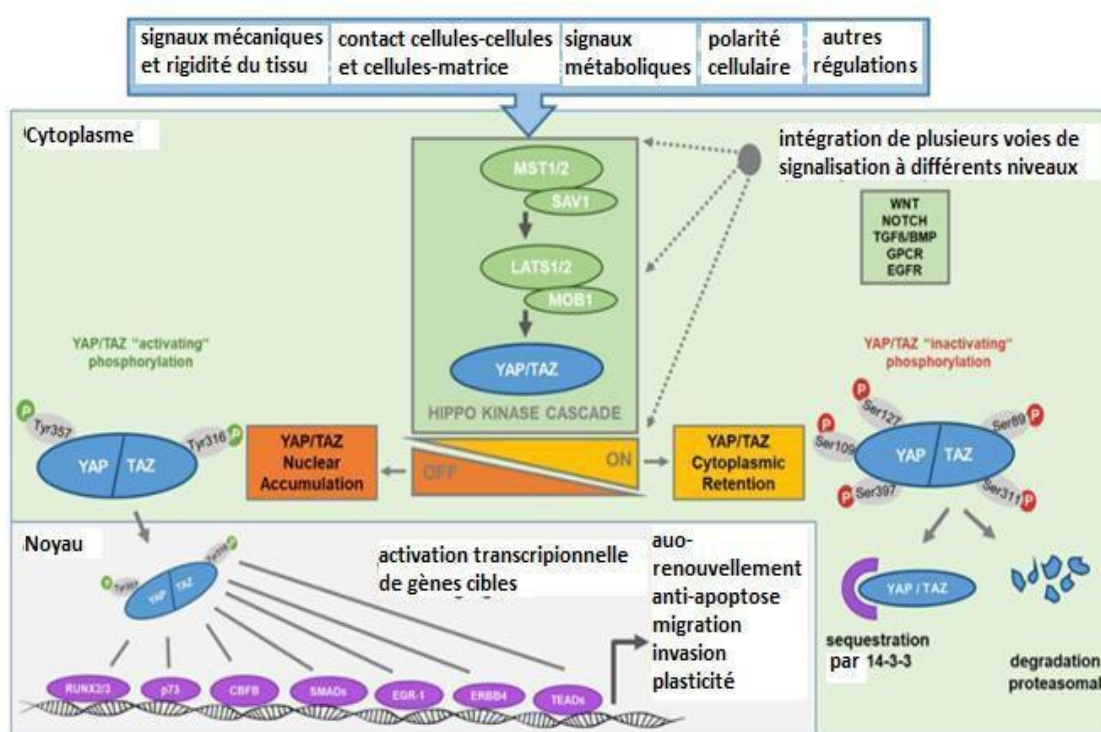


Figure 18 : Régulation post-transcriptionnelle des facteurs YAP/TAZ

YAP et TAZ sont finement régulés par la voie de signalisation HIPPO. Quand cette voie est « ON », YAP et Taz sont phosphorylés sur leurs sérines. YAP/TAZ phosphorylés peuvent être séquestrés dans le cytoplasme par 14-3-3 ou être pris en charge par le protéasome. Quand la voie HIPPO est désactivée, YAP/TAZ sont transloqués dans le noyau où ils interagissent avec des facteurs de transcription comme TEAD ; ce qui entraîne la transcription de gènes cibles.

D'après (Kovar, Bierbaumer, et Radic-Sarikas 2020)

En plus d'une régulation post-transcriptionnelle, les effecteurs YAP/TAZ sont aussi régulés par des microARNs. Mir-25 qui est surexprimé dans le cancer du poumon stimule l'expression de YAP1 en ciblant LATS2 (Wu et al. 2019). Mir-4319 dont l'expression est réprimée dans les cancers du sein et des poumons, inhibe l'expression de YAP en ciblant LIN28 et RFX5 (Y. Yang et al. 2019, 4319). Mir-550-1 et miR-455-3p inhibent TAZ respectivement dans les leucémies myéloïdes et le cancer du pancréas (L. Chen, Loh, et Song 2010; Zhan et al. 2020).

YAP est exprimé dans tous les tissus à l'exception des tissus lymphoblastoïdes et myéloïdes tandis que l'expression de TAZ est plus restreinte et quasi inexistante dans le sang. En termes de transcription, Miranda et al, ont montré que TAZ est régulé de manière positive via la signalisation TGF β et l'activation de MRTF par le complexe p38/MAPK (Miranda et al. 2017). En s'associant au complexe β -caténine/TBX5, il a été montré que YAP intervenait aussi dans la régulation de TAZ (Rosenbluh et al. 2012). De plus, Finch.E et al ont montré que YAP promeut la dégradation de TAZ via GSK3 et HSP90 dans les modèles murins et chez l'homme (Finch-Edmondson et al. 2015). Concernant la régulation transcriptionnelle de YAP, elle se fait par la protéine CREB (J. Wang et al. 2013). D'autre part, il a été montré que dans les myofibroblastes de la cornée, la suppression de TAZ entraîne une accumulation de YAP (Muppala et al. 2019). Toutes ces études récentes montrent que YAP et TAZ peuvent avoir des rôles distincts et que dans certains cas ils ne sont pas redondants.

3-1 - YAP/TAZ dans la régulation du caractère souche des cellules

Les effecteurs de la voie HIPPO, YAP et TAZ contrôlent le destin et la survie des cellules par divers mécanismes, y compris la régulation transcriptionnelle de gènes clés (LeBlanc, Ramirez, et Kim 2021). Il a été montré que YAP maintient le caractère pluripotent des cellules souches

embryonnaires humaines en réprimant WNT3, contrairement aux cellules souches embryonnaires murines (Qin et al. 2016; Chung et al. 2016; Estarás et al. 2017). De plus, YAP maintient le caractère souche des cellules du trophoctoderme en se liant aux promoteurs des gènes CCNA et CDK6 (Meinhardt et al. 2020). In vitro, il a été montré que la surexpression brève (5 à 15 jours) de YAP ou TAZ entraînait la dédifférenciation des cellules mammaires luminales (Panciera et al. 2018). En effet, il est possible de reconstituer une glande mammaire à partir d'une culture d'organoïde dérivé de cellules souches surexprimant YAP (Panciera et al. 2016). Chez la souris, il a été montré que YAP atténue la sénescence des CSMs et les symptômes d'arthrose en régulant de manière positives FOXD1 (Fu et al. 2019). D'autre part, Zhou et al, ont montré que TAZ cytoplasmique promeut l'auto-renouveaulement des cellules souches embryonnaires humaines et des cellules souches épiblastiques murines via la séquestration de B-caténine (X. Zhou et al. 2017). Dans les cellules somatiques, TAZ promeut la différenciation des cellules alvéolaires de type I durant les phases précoces du développement pulmonaire (Volckaert et al. 2019). Toutes ces études montrent que YAP/TAZ ont un rôle central dans le maintien du caractère souche des cellules et dans l'organogenèse (Raffaella Santoro et al. 2018; Noto et al. 2017) (Figure 19).

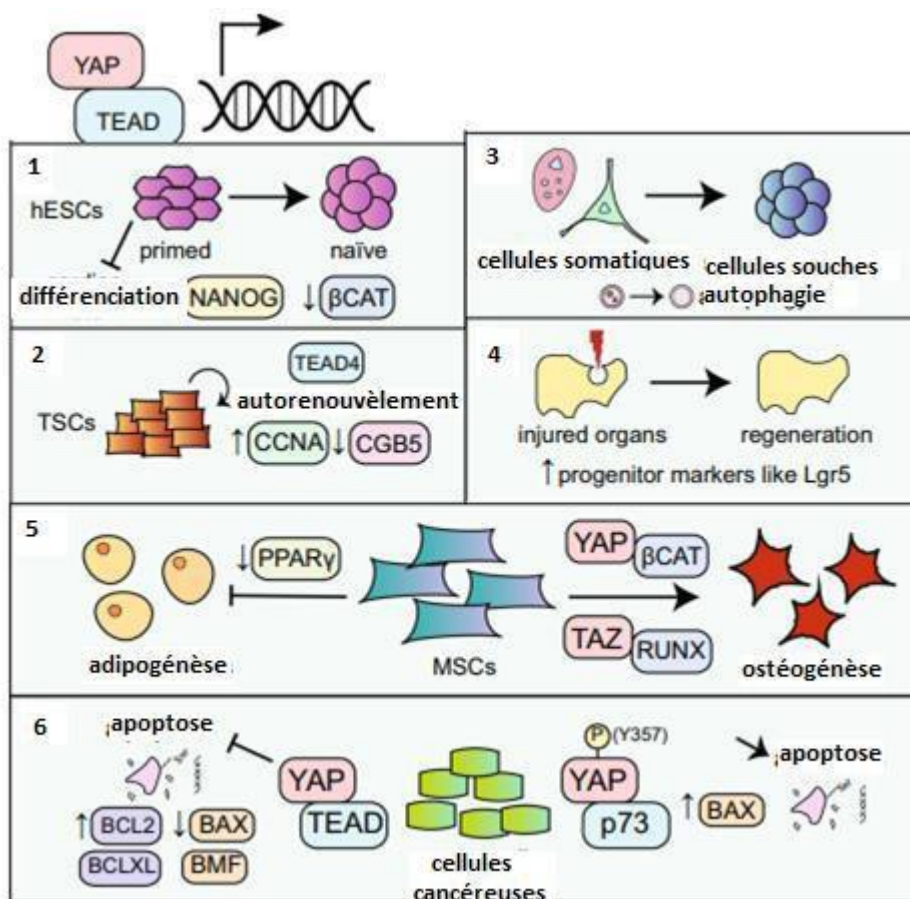


Figure 19: Le rôle de YAP sur le destin cellulaire

YAP promeut la pluripotence des cellules souches embryonnaires humaines en inhibant l'activité β -caténine. 2: En se liant à TEAD4, YAP promeut la transcription des marqueurs de souche des cellules tumorales, humaines et murines. 3: Dans les cellules somatiques, YAP stimule la dédifférenciation. 4: YAP facilite la régénération des tissus/organes en promouvant le phénotype progéniteur. 5: En fonction de la rigidité tissulaire, YAP promeut l'ostéogenèse des MSCs. 6: Enfin, dans les cellules tumorales, YAP inhibe l'apoptose quand il se lie à TEAD. Au contraire, en se liant à P73, il entraîne l'apoptose des cellules tumorales. D'après (LeBlanc, Ramirez, et Kim 2021)

3-2 - YAP/TAZ et la voie de signalisation WNT

En plus de leur rôle de co-activateurs transcriptionnels, YAP/TAZ jouent un rôle primordial dans la signalisation WNT à différents niveaux. En effet, au niveau de la membrane cellulaire, ils se lient au complexe Axin/LRP6 ce qui permet le recrutement du complexe BTRC au complexe de dégradation β -caténine et active la réponse WNT. En absence de la liaison, le complexe de dégradation est inactivé ce qui entraîne la stabilisation et la translocation de β -caténine et YAP/TAZ dans le noyau (Azzolin et al. 2014). D'autre part, Barry et al, ont montré que YAP restreint l'activité WNT en inhibant ainsi la phosphorylation et la translocation nucléaire de DVL1 durant la régénération intestinale (Barry et al. 2013). Enfin, il a été

reporté que YAP et TAZ “serine-phosphorylés” s’associent à β -caténine et le retiennent dans le cytoplasme (Imajo et al. 2012) . Au niveau du noyau, YAP phosphorylé sur la tyrosine 357 se lie et active le complexe β -caténine/ TBX5 activant ainsi la translocation de plusieurs gènes anti-apoptotiques tels que WWTR1 (Rosenbluh et al. 2012). A l’inverse, il a été montré que WNT et spécifiquement les voies « alternatives » de WNT (WNT5a et 5b) régule la nucléarisation de YAP/TAZ (Park et al. 2015). En effet, WNT5, en activant les récepteurs FZD1 entraîne l’inhibition des kinases LATS1/2 et la nucléarisation de YAP/TAZ et l’activation de leurs gènes cibles (Figure 20). Cette voie est indépendante de β -caténine et LRP5

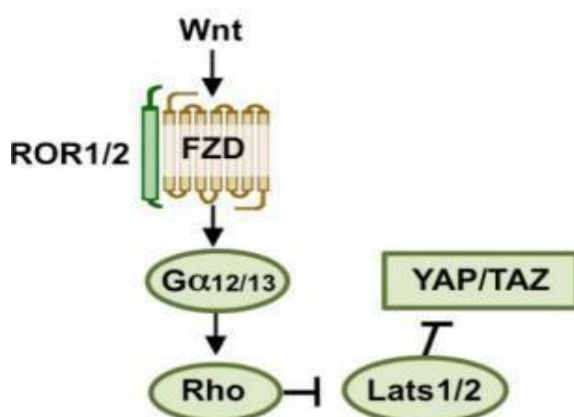


Figure 20 : Le rôle de la voie de signalisation non conventionnelle WNT5a/5b dans l’activation des effecteurs YAP/TAZ
Park et al ont montré dans les cellules épithéliales, que l’activation de la voie non conventionnelle de WNT entraîne la nucléarisation des facteurs YAP/TAZ et l’activation de leurs gènes cibles dans les cellules HEK293A. Cet axe met en jeu différents acteurs dont les récepteurs couplés aux protéines G et Rho. D’après (Park et al. 2015).

3-3 - YAP/TAZ : des mécanosenseurs

L’adaptation à un nouvel environnement est une étape cruciale dans le développement des métastases ; il a été montré que YAP/TAZ sont des mécanosenseurs capables d’adapter les cellules à l’architecture et à la mécanique des nouveaux tissus, au microenvironnement et aux interactions avec le cytosquelette (Zanconato, Cordenonsi, et Piccolo 2019). Ils capturent les informations de l’environnement physique et les convertissent en une réponse transcriptionnelle. La mécanorégulation de YAP/TAZ dépend de l’organisation structurale et de la tension du cytosquelette d’actine F, qui reçoit des stimuli via des intégrines, des jonctions adhérentes et d’autres protéines comme la protéine de polarité cellulaire CRUMBS et l’E-cadhérine (T. Chen et al. 2018; Fletcher et al. 2018). Dans les cellules normales et tumorales,

un gain de rigidité de la MEC, active la translocation nucléaire de YAP/TAZ ; ce qui entraîne la dédifférenciation des cellules et la promotion du caractère souche via l'autophagie (Totaro et al. 2019; Panciera et al. 2017). Deel et al ont récemment montré qu'un gain de rigidité de la matrice, transformait les cellules en cellules initiatrices de tumeur (Deel et al. 2015). De même, une perte de rigidité inhibe YAP/TAZ (Aragona et al. 2013).

3-4 - YAP/TAZ et cancers

Plusieurs travaux ont montré l'implication de la voie HIPPO et spécifiquement des effecteurs YAP/TAZ dans l'initiation de diverses tumeurs telles que les cancers du sein, des ovaires, du foie... (L. Guo et Teng 2015). Les kinases MST1 / 2 et LATS1 / 2 sont souvent décrites comme des suppresseurs de tumeurs tandis que YAP et TAZ sont souvent décrits comme des oncogènes. Dans 20% des cancers on observe une surexpression de TAZ qui est associée à l'invasion et au processus métastatique (Chan et al. 2008). YAP est surexprimé dans la plupart des cancers et il a été montré qu'il promeut la résistance aux chimiothérapies (Zanconato et al. 2016). En effet, il protège les cellules cancéreuses contre l'apoptose (M. Li et al. 2019; X. Wang, Wu, et Zhong 2018). Cette activité anti-apoptotique passe par la surexpression de gènes anti-apoptotiques comme BCL-2 et l'inhibition de gènes pro-apoptotiques comme BAX (K. Li et al. 2018) (figure 19). Ma K et al, ont montré que dans les cellules tumorales sénescents, YAP stimule l'expression du facteur anti-apoptotique survivine (Ma et al. 2016). Bien que dans la majorité des cas YAP ait un rôle d'oncogène, il a aussi été montré qu'en se liant à la p73, YAP stimulait l'expression de BAX et agissait donc comme un gène suppresseur de tumeur (L. Cao et al. 2020). TAZ est aussi considéré comme un oncogène dont l'expression corrèle avec un mauvais pronostic vital (Escoll et al. 2020). Tout comme YAP, TAZ peut aussi agir comme un suppresseur de tumeurs en réprimant MYC et ses cibles (Grieve et al. 2019). Récemment, Yang et al, ont montré que TAZ sensibilise les cellules des carcinomes rénaux à la ferroptose (W.-H. Yang et al. 2019). Cliniquement, YAP et TAZ peuvent avoir des rôles différents. Shreberk-S et al, ont montré que les cellules cancéreuses qui surexpriment YAP sont sensibles à l'agent thérapeutique paclitaxel tandis que les cellules tumorales surexprimant TAZ ne le sont pas (Shreberk-Shaked et al. 2020).

3-4-1 YAP/TAZ dans les OS

Dans les ostéosarcomes, les expressions de YAP et TAZ ont été extensivement étudiées dans les tumeurs osseuses et les métastases. Des analyses immunohistochimiques et de puces à ADN ont montré que YAP est surexprimé dans 60% à 85% des OS avec une localisation nucléaire dans seulement 30% à 46% des cas corrélant avec un mauvais pronostic vital (Chan et al. 2014 ; Bouvier et al. 2016; Zucchini et al. 2019). In vitro, inhiber YAP, supprime les capacités prolifératives, clonales et invasives des cellules tumorales ainsi que leur capacité à former des tumeurs in vivo (Z. Yang et al. 2014). Les mécanismes mis en jeu impliquent l'activation de la voie en amont RHO/ROCK qui réduit la nucléarisation de YAP et la voie Hedgehog impliquée dans l'action tumorigène de YAP (Chan et al. 2014; Z. Yang et al. 2014). De même, l'inactivation de LATS1/2 ou la perte de NF2 induit un développement d'OS avec métastases chez 24% des souris hétérozygotes P53^{+/-} et 64% des souris KO p53 (Robanus-Maandag et al. 2004; Nishio et al. 2012). D'autre part, Shen et al ont montré que TAZ était surexprimé dans 13/16 tumeurs comparées aux tissus sains et que son expression est associée à la transition épithélio-mésenchymateuse (Shen et al. 2017). Une étude récente chez le chien suggère que TAZ pourrait être spécifiquement associé aux caractères prolifératifs et migratoires des cellules métastatiques d'OS (Luu et al. 2018). **Toutes ces études montrent que la voie HIPPO et principalement les facteurs YAP et TAZ sont des cibles thérapeutiques potentielles dans le traitement des OS.** Mécaniquement, les processus impliqués sont encore mal connus.

Objectifs de l'étude



Objectifs de l'étude

Les ostéosarcomes sont les troisièmes cancers les plus fréquents chez les enfants et les jeunes adultes après les lymphomes et les tumeurs cérébrales. Grâce à l'amélioration des traitements combinant chimiothérapies et résection chirurgicale, le taux de survie des patients présentant une tumeur localisée s'est nettement amélioré (70% après 5 ans) (Ando et al. 2013). Néanmoins, la survie des patients avec métastases est nettement plus basse (30%) notamment pour les 25 % de patients présentant des métastases au diagnostic. Cette situation n'a pas évolué depuis des décennies. **L'objectif général du travail est de mieux comprendre les mécanismes sous-tendant le processus métastatique pour trouver des cibles thérapeutiques plus efficaces afin d'améliorer le devenir des patients.**

La notion de cellules souches cancéreuses (CSCs) intervient dans un contexte bien précis du développement tumoral c'est-à-dire à l'initiation du caractère malin de la tumeur (Valent et al. 2012). On peut émettre l'hypothèse que ces cellules sont également capables comme les cellules souches des tissus sains de former une population de réserve, pas ou peu proliférative, dans des niches spécialisées et donc de contribuer à l'établissement de la maladie résiduelle. Grâce leurs propriétés particulières et leur rôle central dans la chimiorésistance, les CSCs représentent donc une cible thérapeutique privilégiée. Les études pionnières de Gibbs, puis d'autres depuis, ont montré que l'on pouvait isoler à partir de tissus et de lignées cellulaires d'ostéosarcomes des populations cellulaires ayant des caractéristiques de CSCs (Gibbs et al. 2005; Gibbs, Levings, et Ghivizzani 2011). Cependant, l'implication des cellules souches des ostéosarcomes (OSCs) dans le processus métastatique reste largement à explorer. Des études précédentes du laboratoire ont montré que la calpaïne-6 identifie une population particulière de cellules de sarcomes, à la tête de la hiérarchie cellulaire (Andrique et al. 2018). Les cellules exprimant la calpaïne-6 ont des capacités initiatrices de tumeur et sont capables de former une maladie résiduelle chez la souris.

A partir de ces données, notre objectif général a été de mieux caractériser les CSCs identifiées par la calpaïne-6 durant la progression tumorale et d'étudier leur contribution

au processus métastatique chez des patients et dans des modèles d'ostéosarcome chez la souris.

Marion et al ont montré que la calpaïne-6 est fortement exprimée dans les récives (Marion et al. 2012) et que son expression est inversement corrélée à la réponse des patients au traitement. Cette protéine est donc associée à la chimiorésistance des ostéosarcomes. Dans un modèle murin de tumeur osseuse, Andrique et al, ont montré que l'expression de la calpaïne-6 dans la tumeur primaire corrèle avec le développement de nodules pulmonaires et que l'inhibition de la calpaïne-6 suffit à freiner le développement tumoral et à réduire la population de CSCs (Andrique et al. 2018). **Ainsi, par une approche transcriptomique, nous avons continué à explorer les fonctions de la calpaïne-6 pour déterminer si cette protéine pourrait être une cible thérapeutique dans les CSCs.**

Plusieurs travaux ont montré l'implication de la voie HIPPO dans l'initiation de diverses tumeurs. Dans les ostéosarcomes, YAP et TAZ sont fortement exprimés dans 60% des cas et leur localisation nucléaire pourrait servir de facteur pronostique. De nombreuses études suggèrent que la voie HIPPO et l'activité des facteurs YAP et TAZ pourrait être une cible thérapeutique potentielle. Par ailleurs, certains résultats indiquent que l'activité de YAP dans des cellules embryonnaires et cancéreuses est liée au phénotype de cellules souches. Pourtant, les fonctions de YAP au cours du développement de métastases pulmonaires dérivées d'un ostéosarcome sont encore mal connues. **Nous avons donc étudié la relation entre le biomarqueur de CSCs, la calpaïne-6, et le facteur YAP au cours du développement et de la progression des ostéosarcomes.**

Nous avons adopté la stratégie expérimentale suivante :

Pour mieux caractériser les CSCs exprimant la calpaïne-6, nous avons réalisé une étude transcriptomique par RNAseq (Integrage, Ivry) pour comparer le transcriptome de cellules humaines d'ostéosarcome (143B) qui expriment ou sur-expriment la calpaïne-6 au transcriptome de cellules sans calpaïne-6. Pour identifier et trier les cellules exprimant la calpaïne-6, nous avons utilisé un système rapporteur qui permet d'exprimer la GFP sous le contrôle du promoteur de la calpaïne-6 comme décrit par Andrique et al. (2018). Dans les modèles de tumeur chez la souris, nous avons utilisé une lignée cellulaire murine

d'ostéosarcome, les K7M2. Pour étudier les fonctions de la calpaïne-6, nous avons modifié les populations cellulaires pour inhiber l'expression de la calpaïne-6 grâce à un shARN ou au contraire la sur-exprimer grâce à un vecteur lentiviral. Pour mettre en évidence les différentes fonctions de la calpaïne-6 chez les patients, nous avons interrogé des bases de données publiques notamment les bases du programme « The Cancer Genome Atlas » et utilisé des données de RNA-seq issues d'ostéosarcomes (Target-OS) et de sarcomes de tissus mous (TCGA-Sarc).

**1- Les cellules souches des
sarcomes osseux dans la
croissance tumorale et les
métastases:**

**Le rôle de l'axe calpaïne-
6/YAP**



Les cellules souches des sarcomes osseux dans la croissance tumorale et les métastases: Le rôle de l'axe calpaïne-6/YAP

1-1- Introduction

Les sarcomes sont des tumeurs rares et hétérogènes qui apparaissent dans les tissus conjonctifs. Ces tumeurs sont traitées par des chimiothérapies agressives associées à une résection chirurgicale. Ce traitement est inefficace contre les récives locales et métastatiques qui réduisent fortement la survie des patients (Doyle 2014; Allemani et al. 2015). Bien que de nombreux facteurs influençant les propriétés métastatiques des cellules de sarcome aient été identifiés, on ne sait toujours pas par quels mécanismes précis les cellules disséminées entraînent la progression tumorale et l'établissement des métastases. Il a été rapporté que les tumeurs osseuses primitives et les métastases associées pouvaient partager une histologie commune et/ou variée (Jambhekar et al. 2011). Ces deux tissus restent néanmoins très hétérogènes ; ce qui suggère que les tumeurs primaires et métastatiques pourraient suivre le même processus de maturation. Bien que les sarcomes suivent principalement un modèle de développement clonal, la présence de cellules souches cancéreuses (CSC) a été démontrée dans les ostéosarcomes (OS), les chondrosarcomes et les sarcomes d'Ewing. Cela suggère que ces tumeurs peuvent également dépendre d'une organisation hiérarchique (Gambera et al. 2018; Gibbs et al. 2005; Hotfilder et al. 2018). Contrairement aux CSs des carcinomes qui acquièrent un phénotype agressif avec des capacités migratoires et disséminantes accrues (Nandy et Lakshmanaswamy 2017), la place et le rôle précis des cellules souches des sarcomes dans l'établissement des métastases restent à ce jour malconnus.

Nous avons précédemment montré que la calpaïne-6, une calpaïne atypique, est exprimée dans les cellules de sarcome avec des propriétés CSCs telles que l'auto-renouvellement, la multipotence, la chimiorésistance et l'initiation des tumeurs (Andrique et al. 2018). Il a été rapporté que la calpaïne-6 protégeait les cellules des sarcomes utérins de l'apoptose et celles des OS de la sénescence induite par l'hypoxie (Andrique et al. 2018; Marion et al. 2012; Y. Liu

et al. 2011). **Ainsi, les cellules d'OS exprimant la calpaïne-6 sont impliquées dans la malignité de la tumeur et pourraient jouer un rôle majeur dans le processus métastatique.**

La voie de signalisation Hippo est un programme de développement conservé au cours de l'évolution et un régulateur majeur de la taille des organes, du renouvellement et de la réparation tissulaire (Ahmed et al. 2017). Les effecteurs YAP et TAZ en se liant à des facteurs de transcription tels que TEAD modulent l'expression de gènes clés dans la régulation du destin et de la survie des cellules souches embryonnaires . Cependant, selon le contexte, YAP peut maintenir le caractère « souche » / progéniteur des cellules ou stimuler leur différenciation. La voie Hippo a des fonctions de suppression de tumeur et les activités de YAP ont été associées à la progression tumorale, aux métastases, à la chimiorésistance et au caractère souche des cellules cancéreuses (Meinhardt et al. 2020). Dans les sarcomes, plusieurs gènes de la cascade Hippo sont altérés. Une analyse par microarrays tissulaires a montré que l'expression de YAP est élevée dans les OS ; et que cette expression corrèle avec le grade de la tumeur (Bouvier et al. 2016). Il en est de même pour les gènes cibles YAP qui sont surexprimés dans les tumeurs osseuses (Zucchini et al. 2019). Enfin, il a été rapporté que l'inhibition de la voie Hippo maintient la «souchitude» des cellules cancéreuses (Z. Yang et al. 2014). **Ensemble, ces données suggèrent une éventuelle implication de YAP dans des fonctions spécifiques des cellules souches des sarcomes.**

Les buts de l'étude étaient premièrement de mieux caractériser les OCSs durant le processus métastatique en s'aidant de la calpaïne-6 comme marqueur. Deuxièmement, il était important d'étudier les fonctions de la calpaïne-6 afin de déterminer si elle peut être une cible thérapeutique potentielle dans le traitement de la maladie disséminée. Ainsi, par une analyse transcriptomique par RNAseq (Integrage, Ivry) entre des cellules humaines d'ostéosarcome (143B) qui expriment ou sur-expriment la calpaïne-6 et des cellules sans calpaïne-6, nous avons montré que l'expression de la calpaïne-6 et de YAP sont corrélées. Nous avons confirmé cela sur des biopsies humaines et sur des coupes de tumeurs chez la souris. Mécanistiquement, nous avons montré que la calpaïne-6 stabilise YAP en régulant la voie Hippo et le trafic du complexe de dégradation de la B-caténine à travers les vésicules intracellulaires. Nous avons aussi montré que l'axe calpaïne-6/YAP est associé à la phase G2M du cycle cellulaire et régule les gènes qui contrôlent la mitose. L'inhibition de YAP entraîne une augmentation du taux de catastrophes mitotiques dans les cellules exprimant la calpaïne-6. Chez la souris, l'utilisation de la verteporfine (inhibiteur pharmacologique de YAP) a

supprimé la néoformation des tumeurs osseuses et des métastases pulmonaires. Toutefois, dans les tumeurs bien développées, nous avons montré que l'inhibition de YAP augmente la prolifération des cellules tumorales et la formation de métastases et promeut dans les tissus de l'hôte, l'inflammation associée aux tumeurs.

Notre étude montre donc que les CSs d'ostéosarcome sont majoritairement présentes à l'initiation des tumeurs et des métastases et que l'axe calpaïne-6/YAP est impliqué dans l'excroissance des métastases. Inhiber cet axe pourrait être une stratégie thérapeutique potentielle à condition que l'on se place dans un contexte non inflammatoire.

1-2- Résultats

A Calpain-6/YAP axis in sarcoma stem cells that drives the outgrowth of tumors and metastases

Joëlle Tchicaya-Bouanga^{1,2}, Yu-Jen Hung³, Jean-Marc Schwartz³, Diane Ji Yun Yoon^{1,2}, Emilie Chotard^{1,2}, Guillaume Odri^{1,2}, Gonzague De Pinieux⁴, Martine Cohen-Solal^{1,2}, Dominique Modrowski^{1,2*}

- 1** INSERM UMR 1132, Biologie de l'os et du cartilage (BIOSCAR), Hôpital Lariboisière, Paris, France
- 2** Université de Paris, Faculté de Santé, UFR de médecine, Paris, France
- 3** School of Biological Sciences, University of Manchester, Manchester, UK
- 4** Université de Tours, Tours, France

Corresponding author : dominique.modrowski@inserm.fr

Abstract

Although it is accepted that sarcomas include stem cells, how these cells contribute to local and metastatic relapses is largely unknown. Here, we show that calpain-6, a biomarker of sarcoma stem cells, modulates the expression of Hippo pathway genes and the vesicular trafficking of β -catenin degradation complexes and thereby stabilizes YAP. Calpain-6 supports G2M-related YAP activities and up-regulates genes controlling mitosis in sarcoma stem cells and tissues. In mouse models of bone sarcoma, the majority of tumor cells express calpain-6 during early steps of tumor out-growth. YAP-inhibition prevents neoformation of primary tumors and metastases but has no effect on already developed tumors. It can even accelerate growth of lung metastases associated with large bone tumors by influencing tumor-associated inflammation in the host tissues. Our results highlight a new mechanism that is crucial during early steps of tumor and metastasis outgrowth and could be targeted to prevent relapses of sarcomas.

Introduction

Sarcomas are rare and heterogeneous tumors that appear in conjunctive tissues. These tumors are treated with aggressive chemotherapies and surgical resection but local and metastatic relapses strongly reduce the survival of the patient^{1,2}. Although many factors that are involved in metastatic properties of sarcoma cells have been identified, it is still unclear which specific features of the disseminated cells drive the progression of the disease and the formation of metastases. Metastases and primary bone tumors have been shown to have common or different histology³. However, both are very heterogeneous tissues, suggesting that primary and metastatic tumors could follow the same maturation process. The main model for sarcoma development is the clonal one, however the presence of cancer stem cells (CSC) has been demonstrated in osteo- and chondro- sarcomas as well as in Ewing sarcomas, suggesting that these tumors can also depend on a hierarchical organization^{4,5,6}. At the opposite of carcinoma SC that were shown to acquire an aggressive phenotype with increased migratory and dissemination capacities⁷, whether and how sarcoma stem cells could specifically contribute to metastasis formation is largely unknown. We previously showed that the atypical calpain, calpain-6, is expressed in sarcoma cells with CSC properties such as self-renewal, multipotency, chemoresistance and tumor initiation⁸. Calpain-6 was reported to prevent apoptosis in uterine sarcoma and hypoxia-dependent senescence in osteosarcoma cells^{8,9,10}. The functions of calpain-6 clearly link sarcoma SC to tumor malignancy and possibly to the metastatic process.

The Hippo pathway is a conserved developmental program and a major regulator of organ size, tissue renewal and repair¹¹. The effectors YAP and TAZ in complex with transcription factors such as TEAD modulate the expression of genes that are lineage determinants, self-renewal factors, and apoptosis-related genes and thus has key functions to control embryonic stem cell fate and survival^{12,13}. But YAP can either maintain a stem/progenitor state or stimulate differentiation, depending on the context. The Hippo pathway has tumor suppressor functions and the activities of YAP was associated with tumor progression, metastasis, chemoresistance and cancer stemness¹⁴. Alterations of genes of the Hippo cascade were found in sarcomas¹⁵. Tissue microarrays showed high levels of YAP correlated with staging in human osteosarcomas^{16,17}. YAP target genes were also found up-regulated in bone tumors¹⁸. Finally, inhibition of the Hippo pathway was reported to promote stemness in cancer cells¹⁹. Together these data raise the question of a possible involvement of YAP in specific functions of sarcoma stem cells.

Here, we report that calpain-6 and YAP expression are correlated in osteosarcoma cells and tissues. Calpain-6 stabilizes YAP by regulating the Hippo pathway and the trafficking of the β -catenin-degradation

complex through intracellular vesicles. The calpain-6/YAP axis is associated with the G2M phase of the cell cycle and regulates genes that control mitosis. YAP inhibition results in increased rate of mitotic catastrophes in vitro and suppression of the neo-formation of bone tumors and lung metastases in mice. However, YAP inhibition can also result in the promotion of tumor-associated inflammation in the host tissues and increase tumor cell proliferation.

Results

Calpain-6 expression was associated with alterations of the hippo pathway in CSCs. To determine active and targetable mechanisms that contribute to specific pro-tumor functions of sarcoma stem cells, we used the CSC biomarker calpain-6. Since, we previously showed that calpain-6 inhibition resulted in the suppression of tumor-initiating properties of osteosarcoma cells, we compared transcriptomes of cells that express or overexpress calpain-6 with those of calpain-6-knockdown cells. Only part of the population expresses calpain-6 within osteosarcoma cell lines⁸. We therefore used the 143B human osteosarcoma cell line that was modified to express GFP under the control of CAPN6 regulatory sequence to sort and enrich a CSC population expressing basal levels of calpain-6 (Calp6-P-GFP+ cells) (Figure 1a, Supplementary Fig. 1). We compared these cells to a homogeneous population in which calpain-6 expression was stably inhibited thanks to specific shRNA (Calp6^{shRNA} cells) (Figure 1a, Supplementary Fig. 1). We also created a homogeneous population of 143B cells which overexpressed calpain-6 using a lentiviral vector (Calp6+ cells) (Figure 1a, Supplementary Fig. 1). After checking that the RNAseq analysis passed quality controls, the lists of differentially expressed genes were ordered on the basis of log2fold-changes. Consistent with previous findings about calpain-6, biological terms associated with differentially expressed genes included those that regulate the organization of microtubules, RNA splicing and autophagy (Supplementary Fig. 2a,d). This validated our cellular models to further study calpain-6 expressing cells. KEGG analyses revealed an undiscovered relationship between calpain-6 and genes of the Hippo pathway (Supplementary Fig. 2b,e). Among the 153 genes of the Hippo signaling signature, 94 were found significantly differentially expressed in Calp6-P-GFP+ and 92 in Calp6+ as compared to Calp6shRNA cells (Fig. 1b,c). Genes coding NF2, MOB1A, TEAD2, Wnt and BMP factors were down regulated, whereas, TEAD4, CCN2 and Serpin1 were up-regulated in calpain-6 expressing and overexpressing cells as compared to cells without calpain-6 (Fig. 1b,c). Moreover, gene set enrichment analysis (GSEA) showed a significant enrichment for CORDENONSI_YAP_CONSERVED_ SIGNATURE among the up-regulated genes in calpain-6 overexpressing cells (Figure 1d). RT-PCR analyses confirmed that YAP/TEAD targets such as CTGF, Cyr61 and ANKRD1 were up-regulated in calpain-6 overexpressing 143B and U2OS cells (Supplementary Fig. 3a,b). Calpain-6 overexpression was also associated with increased TEAD (GT11c) transcriptional activity in different osteosarcoma cell lines (Figure 1e, f). It was demonstrated that YAP is a mechano-sensor whose activity is regulated by physical properties of the environment. To rule out a possible overstimulation due to the high stiffness of the regular culture plates and determine the regulation of YAP activity by calpain-6 in different tissues such as brain, lungs and the

osteoid part of the bone, we measured GT11c activity in cells cultured on collagen-coated silicone with different stiffness. Calp6+ cells had higher TEAD activity on 0.5, 2 and 64 KPa matrix (Figure 1g).

Calpain-6 stabilized YAP protein. We then investigated mechanisms that could lead to the increased YAP activity in calpain-6-expressing cells. The expression of YAP mRNA was not significantly different in Calp6+ and Calp6^{shRNA} cells (supplementary Figure 3c). At the opposite, Western blot showed higher levels of YAP protein in Calp6+ cells as compared to Calp6^{shRNA} cells (Figure 2a). In the same way, its paralogue TAZ with redundant activities was up-regulated in Calp6+ cells (Supplementary Fig. 3d). Serum suppression from the culture medium challenged Hippo pathway and resulted in LATS activation in calp6^{shRNA} cells but not in Calp6+ cells (Figure 2b). Hence, consistently with the results of RNAseq analysis, calpain-6 may be responsible for YAP stabilization, in part, through the regulation of the Hippo pathway. However, in the presence of serum, the rate of phosphorylated LATS was the same in Calp6+ and Calp6^{shRNA} cells as well as YAP phosphorylation (Fig. 2b), suggesting that other mechanisms participate to YAP stabilization. The degradation of YAP depends on its addressing to the proteasome by the β -catenin degradation complex GSK3/AXIN/APC. But, basal β -catenin was increased in Calp6+ as compared to Calp6^{shRNA} (Figure 2c). In addition, stimulation with Wnt3a resulted in increased β -catenin in Calp6^{shRNA} and Calp6+ 3 hours after the addition of the factor in the culture medium (Figure 2c). Twenty hours after Wnt stimulation, β -catenin returned to its basal level only in Calp6^{shRNA} cells and remained higher in Calp6+ cells (Figure 2c). It was reported that the sequestration of β -catenin degradation complex in multivesicular bodies (MVBs) of the endosomal compartment can block β -catenin degradation and promote Wnt signaling induction²⁰. Gargini et al. demonstrated that this sequestration can be also responsible for YAP stabilization²¹. Inhibiting the vesicular trafficking with chloroquine in 143B Calp6+ cells restored the reduction of β -catenin, 20 hours after Wnt stimulation, suggesting that calpain-6 could affect the recycling of the β -catenin degradation complex (Figure 2c). We then performed a proteinase K protection assay that showed that, GSK3 and Axin were still trapped into MVBs of Calp6+ but not of Calp6^{shRNA} cells, 20 hours after the addition of Wnt3a in the medium (Figure 2d, e). This indicates that calpain-6 controlled the fate of the β -catenin degradation complex and by the way may promote YAP accumulation in CSC.

Calpain-6-dependent promotion of YAP activity was associated with the G2M phase. The accumulation of YAP protein did not only result from calpain-6 overexpression since immunofluorescence showed that cells expressing basal levels of calpain-6 have higher levels of YAP as compared to cells without calpain-6

(Figure 3a, b). Moreover, Calpain-6 and YAP expression were found correlated in a 143B cells-derived bone tumor in mouse and in osteosarcoma lung metastases in patients (Figure 3c, d, f Supplementary Fig. 4). Of note, these correlations were not a bias due to heterogeneity of tissues labeling because DAPI did not correlate with Calpain-6 staining (Fig. 3e,g). Interestingly, GSEA failed to demonstrate a statistically significant enrichment of CORDENONSI_YAP_CONSERVED_SIGNATURE in cells that express basal levels of calpain-6 (Calp6-P-GFP+ cells) as compared to Calp6^{shRNA} (Fig. 4a). In another hand, the pattern of expression of YAP target genes was different in Calp6-P-GFP+ and Calp6+ cells indicating that YAP stabilization in calpain-6 expressing and overexpressing cells did not result in the same transcriptional regulation (Figure 4b). It was previously reported that calpain-6 overexpression blocked cytokinesis suggesting that calpain-6 expression should be fine-tuned over the cell cycle to ensure normal functions²². Reactome Pathway Analysis highlighted a differential expression of genes involved in the Mitotic G2/M phase, G2M transition and M phase in calpain-6-expressing cells (Supplementary Fig. 2c,f). GSEA further showed that basal calpain-6 expression in 143B cells but not overexpression was associated with a gene signature related to positive regulation of G2M phase (Figure 4c). Calpain-6 was also associated with the expression of genes of the G2M checkpoints (Figure 4d). Indeed, flow cytometry analyses of Calp6-P-GFP cells showed that the highest GFP expression was observed in cells in G2M (Figure 4e). Moreover, GFP expression increased in calp6-P-GFP cells that were blocked in G2M thanks to a CDK1 inhibitor, RO3306, but not in cells blocked in G1 with a Myc inhibitor (Figure 4f). These results indicate that calpain-6 was mainly produced at the particular G2M phase of the cell cycle. Consistently, YAP protein was enhanced with calpain-6 in G2M-blocked cells (Figure 4g). Hence, the calpain-6-dependent increase in YAP protein in CSC appeared mainly associated with the G2M phase of the cell cycle.

YAP controls the expression of mitotic genes in calpain-6-expressing cells. The results presented above led us to investigate whether YAP or calpain-6 inhibition could affect G2M-related functions in CSCs. Recently, it was reported that YAP regulates mitotic genes by promoting interactions between the Myb-MuvB complex and distal enhancers²³. At the opposite of CORDENONSI_YAP_CONSERVED_SIGNATURE, a significant positive enrichment of YAP-dependent mitotic genes was found in Calp6-P-GFP+ compared to Calp6^{shRNA} cells (Fig. 4h). We then used transcriptomic data from a collection of 88 osteosarcomas (Target OS) and 275 soft tissue sarcomas (TGCA-Sarc) to further characterize the possible involvement of YAP in CSC populations. The tumors were ranked according to calpain-6 expression (supplementary Fig. 5). We did not found a positive association between calpain-6 and the CORDENONSI_YAP

_CONSERVED_SIGNATURE, but a correlation with the expression of G2M-associated genes in the different types of sarcomas (Fig. 5 a,b; Supplementary Fig. 5). Interestingly, calpain-6 expression in cells and in sarcoma tissues was associated with genes involved in DNA repair (supplementary Fig. 6). We also found a strong enrichment in YAP-dependent mitotic gene signature in calpain-6-expressing soft tissue sarcomas (Fig. 5c). Although, the GSEA did not show a clear enrichment with this signature in osteosarcomas, CENPF, ECT2, TOP2A, and CCNA2 were up-regulated in calpain-6-expressing bone and soft tissue sarcomas (Fig. 5d). Together these results highlighted key functions of the Calp6/YAP axis during the G2M phase in sarcoma stem cells. Because the mitotic genes code for factors that control mitosis, we hypothesized that the calpain-6/YAP axis play a crucial role during tumor or metastasis outgrowth by protecting the cells from mitosis-associated cell death. In support to this, we observed that the expression of genes coding the anti-apoptotic factors Survivin, BCL2 and MCL1 were down-regulated in Calp6^{shRNA} cells, whereas pro-apoptotic factors such as Bad and caspase-8 tended to be up-regulated in these cells as compared to Calp6-P-GFP+ cells (supplementary Fig. 6). Moreover, calpain-6 suppression with shRNA or YAP inhibition with verteporfin resulted in increased rate of mitotic catastrophe in Calp6-P-GFP+ dividing cells (Fig. 6a, b, c).

Calpain-6/YAP axis is required for tumor and metastasis out-growth. We previously reported that calpain-6 inhibition in osteosarcoma cells resulted in the suppression of their capacities to form bone tumors and develop metastases in mice⁸. Here, we assessed the *in vivo* effect of YAP inhibition by verteporfin using a model of bone tumor that consisted in intratibial implantation of K7M2 cells that have been modified to express GFP under the control of the CAPN6 regulatory sequence (Calp6-P-GFP K7M2 cells). In this syngeneic model, the tumors developed at different rate, quickly during the 4 first weeks or only 5-7 weeks after cell implantation. Immunohistochemistry of GFP at different time points after cell implantation in bone revealed that most of the tumor cells that contributed to tumor initiation in the marrow were calpain-6-expressing cells, whereas, this specific cell population decreased during tumor progression (Fig. 6d). In large bone tumors ($\geq 520 \text{ mm}^3$) GFP expression was much more variable and can persist only in some cell clusters (Fig. 6d). We treated K7M2 cells-implanted mice with verteporfin to assess the effects of YAP inhibition on tumors at different stages of development (Supplementary Fig.7a, b). When the treatment was administrated at early time points, i.e., 7 days after cell implantation or 30 days after cell implantation in mice that still have no detectable bone tumor, verteporfin prevented tumor growth (supplementary Fig 7d-f, Fig. 6e). To determine whether verteporfin treatment impacted the metastasis process, we performed ex vivo cultures of lung cells from mice with

slowly developing tumors (treatment at 28 days after cell implantation). At the end of the experiment, half lungs were dissociated and cultured in the presence of G418 to select tumor cells. Clones of selected cells were isolated from the lungs of 3 to 11 control mice (DMSO group), whereas, no cells grew from the lungs of verteporfin-treated mice. As expected H&E staining of the other part of the lungs revealed metastatic nodules only in the 3 DMSO-treated mice (Fig. 6f). In another hand, only 2 to 5 mice that were treated with verteporfin 7 days after cell implantation had lung metastases, whereas, 4 to 5 control mice developed lung nodules (supplementary Fig 7f). Together these results suggest that YAP inhibition also prevented disseminated disease. To further document this possible role of calpain-6/YAP axis during metastasis outgrowth, we performed intra cardiac injection (IC) of calp6-P-GFP K7M2^{EF1Tomato} cells (supplementary Fig 7c). Eleven days after IC injection, clusters of Tomato+/Calp6-P-GFP+ cells were detected within the lungs, whereas, 5-6 weeks after the IC injection the lungs of control mice were invaded with tumors cells that were mostly Calp6-P-GFP- (Fig. 7a,b,c). Verteporfin treatment that was started 11 days after IC cell injection prevented the expansion of tumor cells within the lungs (Fig 7 d, e). Thus, YAP-inhibition can block early stages of the tumorigenic process that involved mainly calpain-6-expressing cells in bone and lungs.

The effects of verteporfin on tumors depend on the inflammatory context. In mice that have developed tumors before the treatment was started, verteporfin did not stop bone tumor growth (Fig. 8a). Moreover, tumor-bearing mice that were treated with verteporfin tended to have more and larger lung metastases than the control mice (Figure 8 b, c, d). Lung metastases of these verteporfin-treated mice contained higher number of Ki67+ cells suggesting that verteporfin has rapidly induced cell proliferation (Fig. 8 e, f). However, in vitro, verteporfin had inhibitory effects on the proliferation of Calp6-P-GFP+ 143B cells (Supplementary Fig. 8a). This suggests that the proliferation of tumor cells induced by this compound in vivo could be due to indirect effects. Because it was reported that YAP inhibition prevents the resolution of inflammation in lungs and joints²⁴⁻²⁶, we compared inflammation in lungs of mice with fast-growing tumors that were treated with DMSO or verteporfin. H&E staining and immunolabeling of nuclear p65 NF- κ B showed that metastases of verteporfin-treated mice were surrounded with numerous inflammatory cells as compared to control mice (Fig 8g; Supplementary Fig.8b). Using a fluorescent probe to assess pan-cathepsin activity, we confirmed that YAP inhibition can lead to increased lung inflammation in the mice with fast growing tumors (Fig 8h).

Discussion

We reveal a novel axis involving calpain-6 and YAP that is activated in CSC during early steps of primary and metastatic tumor outgrowth. It is now well documented that tumor cell clones do not evolve independently but are linked by hierarchical relationships and derive or “differentiate” from each other^{27,28}. Recently, single-cell RNAseq analyses allowed the identification of diverse osteosarcoma cells populations and showed that some specific tumor cells are at the center of a differentiation process^{29,30}. Together it supports a concept of tumor stem/precursor-like cells. Although the CSC can be very minority populations at diagnosis, they are believed to contribute to chemoresistance and disease relapses³¹. It is therefore crucial to determine specific mechanisms that could be targeted in CSC to prevent these events that are responsible for patient mortality. Our results strengthen previous data showing that calpain-6-expressing CSC are tumor-initiating cells⁸. The metastatic model consisting in IC injection of osteosarcoma cells also indicate that calpain-6-expressing cells are involved during early steps of metastasis outgrowth.

We show that calpain-6 controls YAP stability by modulating the Hippo pathway and trafficking of the β -catenin degradation complex. The underlying mechanisms were suggested by previous reports^{22,32,33,34} and confirmed here by the RNAseq analysis which associated calpain-6 with the organization of microtubule and actin cytoskeleton, autophagy, RNA splicing, endocytosis and with the “establishment of organelle localization”. These results validate the osteosarcoma cell models we used. They also highlight a new function of calpain-6 in the trafficking of intra cellular vesicles. Together, they further posit this biomarker as a key controller of the cytoskeleton-dependent signalization in CSCs, especially Rho GTPase, Wnt and Hippo signaling.

Previously, in carcinoma mouse models, YAP was shown to be involved in metastasis out-growth depending on cell-cell signaling³⁵. Calpain-6 may also regulate Hippo pathway and YAP transcriptional activity through modulation of cell-cell interactions in sarcoma SCs since the suppression of calpain-6 with shRNA impacted the expression of different genes coding cadherins such as CDH2 and CDH11. Finally, although YAP is a mechano-sensor those activity is regulated in response to matrix characteristics, calpain-6 increased YAP activity independently of the physical properties of the microenvironment^{36,37}. This indicates that the CSCs have intrinsic advantages as compared to other tumor cells to promote YAP activity in various environments.

Although calpain-6 and YAP expression was clearly correlated in cells and osteosarcoma tissues, we failed to show significant enrichment of the large non-specific YAP signature in calpain-6 expressing sarcoma tissues. At the opposite, we identified a G2M-restricted YAP activity that is promoted by

calpain-6. Especially, we show that the calpain-6/YAP axis control the expression of CENPF, TOP2A and ECT2. These proteins are important modulators of the cell cycle and cancer cell proliferation^{38,39}. They contribute to a prognosis signature in hepatocellular carcinoma and breast cancer^{40,41}. They are associated with the development of metastases in synovial sarcoma and cervical cancer^{42,43}. TOP2A and ECT2 were found up-regulated in osteosarcomas associated with lung metastases as compared to non-metastatic bone tumors⁴⁴. In contrast, we were not able to show any correlation between calpain-6 or mitotic genes and the outcome of patients with osteo or soft tissue sarcomas. It makes sense since calpain-6-expressing cells were found to be the majority population at early steps of tumor outgrowth, whereas, the CSC populations were more or less sparse in mature mouse and human tumors and metastases. Hence, thanks to our cell and mouse models we revealed mechanisms that could be important during cancer initiation and relapses but may be difficult to identify in mature tissues that are deeply modified as compared to initial tumor buds. Disappearance/replacement of initial mechanisms in tumor with time could explain the failure at finding efficient therapeutic targets to reduce the risk for developing metastasis in patients with sarcomas.

Calpain-6-expressing CSC may contribute to the metastasis process also thanks to increased chemoresistance. We previously showed that chemoresistance in osteosarcomas is related to calpain-6 expression⁴⁵. Our transcriptomic analyses further reveal that calpain-6 is associated with genes of G2M checkpoints and DNA repair. Because chemoresistance capacities through increased DNA repair was found to be a common CSC feature, calpain-6 may, thereby, be involved in the persistence of the disease after treatment^{46,47}. YAP was shown to contribute to radio resistance of different types of tumors^{48,49}. This factor may therefore play a role in the CSC-associated chemoresistance. Further studies will determine whether inhibiting YAP activity could reverse CSC chemoresistance in sarcomas and the possible impact on disease recurrence.

Although verteporfin has anti-tumor effects through induction of the death of actively dividing CSCs during early stages of tumor development, YAP inhibition resulted in increased metastasis development in mice with fast growing tumors. This is in line with the consensus that YAP controls the size of progenitor cell populations but has opposing effects to regulate stem cell fate^{12,13,50}. In another hand, our data show that the pro-tumoral effect of verteporfin can be through actions on the host tissues. YAP controls the resolution of inflammation in lungs²⁵. Here we showed that verteporfin can further stimulate the tumor-related inflammation, leading to a vicious circle to promote proliferation of tumor cells. It will be of great interest to investigate why this inflammation was restricted to the tissue

surrounding the lung nodules but did not impact tumor nodules in lungs because this may be related to tumor-dependent immunomodulation.

In conclusion, calpain-6 promotes a specific YAP-activity in CSCs and thereby prevents death associated with intensive cell division to allow for tumor and metastasis out-growth. YAP-inhibition could be an efficient strategy to prevent local or metastatic relapses but the resulting effect will depend on the inflammatory context.

REFERENCES

1. Doyle LA. Sarcoma classification: An update based on the 2013 World Health Organization Classification of Tumors of Soft Tissue and Bone. *Cancer*. 2014;120(12):1763-1774. doi:10.1002/cncr.28657
2. Allemani C, Weir HK, Carreira H, et al. Global surveillance of cancer survival 1995-2009: analysis of individual data for 25,676,887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). *Lancet (London, England)*. 2015;385(9972):977-1010. doi:10.1016/S0140-6736(14)62038-9
3. Krishnamoorthy N, Desai SS, Rekhi B, Jambhekar NA. A clinico-morphological study of 95 cases of sarcomas with metastases to the lungs. *Indian J Cancer*. 2011;48(3):335-338. doi:10.4103/0019-509X.84942
4. Gambera S, Abarrategi A, González-Camacho F, et al. Clonal dynamics in osteosarcoma defined by RGB marking. *Nat Commun*. 2018;9(1). doi:10.1038/s41467-018-06401-z
5. Hotfilder M, Mallela N, Seggewiß J, Dirksen U, Korsching E. Defining a Characteristic Gene Expression Set Responsible for Cancer Stem Cell-Like Features in a Sub-Population of Ewing Sarcoma Cells CADO-ES1. *Int J Mol Sci* 2018, Vol 19, Page 3908. 2018;19(12):3908. doi:10.3390/IJMS19123908
6. Gibbs CP, Kukekov VG, Reith JD, et al. Stem-like cells in bone sarcomas: implications for tumorigenesis. *Neoplasia*. 2005;7(11):967-976. Accessed March 4, 2015. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1502023&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
7. Nandy SB, Lakshmanaswamy R. Cancer Stem Cells and Metastasis. In: *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Vol 151. Prog Mol Biol Transl Sci; 2017:137-176.

doi:10.1016/bs.pmbts.2017.07.007

8. Andrique C, Morardet L, Linares LK, et al. Calpain-6 controls the fate of sarcoma stem cells by promoting autophagy and preventing senescence. *JCI insight*. 2018;3(17). doi:10.1172/jci.insight.121225
9. Marion A, Dieudonné F-X, Patiño-Garcia A, Lecanda F, Marie PJ, Modrowski D. Calpain-6 is an endothelin-1 signaling dependent protective factor in chemoresistant osteosarcoma. *Int J cancer*. 2012;130(11):2514-2525. doi:10.1002/ijc.26246
10. Liu Y, Mei C, Sun L, et al. The PI3K-Akt pathway regulates calpain 6 expression, proliferation, and apoptosis. *Cell Signal*. 2011;23(5):827-836. doi:10.1016/j.cellsig.2011.01.005
11. Varelas X. The hippo pathway effectors TAZ and YAP in development, homeostasis and disease. *Dev*. 2014;141(8):1614-1626. doi:10.1242/DEV.102376
12. Heng BC, Zhang X, Aubeil D, et al. Role of YAP/TAZ in Cell Lineage Fate Determination and Related Signaling Pathways. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8. doi:10.3389/fcell.2020.00735
13. Cao X, Wang C, Liu J, Zhao B. Regulation and functions of the Hippo pathway in stemness and differentiation. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2021;52(7):736-748. doi:10.1093/ABBS/GMAA048
14. Li HL, Li QY, Jin MJ, et al. A review: hippo signaling pathway promotes tumor invasion and metastasis by regulating target gene expression. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2021;147(6):1569-1585. doi:10.1007/s00432-021-03604-8
15. Deel MD, Li JJ, Crose LES, Linardic CM. A review: Molecular aberrations within Hippo signaling in bone and soft-tissue sarcomas. *Front Oncol*. 2015;5(SEP). doi:10.3389/fonc.2015.00190
16. Zhang YH, Li B, Shen L, Shen Y, Chen XD. The role and clinical significance of yes-associated protein 1 in human osteosarcoma. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2013;26(1):157-167. doi:10.1177/039463201302600115
17. Bouvier C, Macagno N, Nguyen Q, et al. Prognostic value of the Hippo pathway transcriptional coactivators YAP/TAZ and β 1-integrin in conventional osteosarcoma. *Oncotarget*. 2016;7(40):64702-64710. doi:10.18632/oncotarget.11876
18. Rhodes DR, Kalyana-Sundaram S, Mahavisno V, et al. Oncomine 3.0: Genes, pathways, and networks in a collection of 18,000 cancer gene expression profiles. *Neoplasia*. 2007;9(2):166-180. doi:10.1593/neo.07112
19. Basu-Roy U, Sumru Bayin N, Rattanakorn K, et al. ARTICLE Sox2 antagonizes the Hippo pathway to maintain stemness in cancer cells. *Nat Commun*. Published online 2015.

doi:10.1038/ncomms7411

20. Taelman VF, Dobrowolski R, Plouhinec JL, et al. Wnt signaling requires sequestration of Glycogen Synthase Kinase 3 inside multivesicular endosomes. *Cell*. 2010;143(7):1136-1148.
doi:10.1016/j.cell.2010.11.034
21. Gargini R, Escoll M, García E, García-Escudero R, Wandosell F, Antón IM. WIP Drives Tumor Progression through YAP/TAZ-Dependent Autonomous Cell Growth. *Cell Rep*. 2016;17(8):1962-1977. doi:10.1016/j.celrep.2016.10.064
22. Tonami K, Kurihara Y, Aburatani H, Uchijima Y, Asano T, Kurihara H. Calpain 6 is involved in microtubule stabilization and cytoskeletal organization. *Mol Cell Biol*. 2007;27(7):2548-2561.
doi:10.1128/MCB.00992-06
23. Pattschull G, Walz S, Gründl M, et al. The Myb-MuvB Complex Is Required for YAP-Dependent Transcription of Mitotic Genes. *Cell Rep*. 2019;27(12):3533-3546.e7.
doi:10.1016/j.celrep.2019.05.071
24. Deng Y, Lu J, Li W, et al. Reciprocal inhibition of YAP/TAZ and NF- κ B regulates osteoarthritic cartilage degradation. *Nat Commun*. 2018;9(1). doi:10.1038/s41467-018-07022-2
25. Liu LY, Shan XQ, Zhang FK, et al. YAP activity protects against endotoxemic acute lung injury by activating multiple mechanisms. *Int J Mol Med*. 2020;46(6):2235-2250.
doi:10.3892/ijmm.2020.4759
26. LaCanna R, Liccardo D, Zhang P, et al. Yap/Taz regulate alveolar regeneration and resolution of lung inflammation. *J Clin Invest*. 2019;129(5):2107-2122. doi:10.1172/JCI125014
27. Couturier CP, Ayyadhury S, Le PU, et al. Single-cell RNA-seq reveals that glioblastoma recapitulates a normal neurodevelopmental hierarchy. *Nat Commun*. 2020;11(1).
doi:10.1038/s41467-020-17186-5
28. Pan XW, Zhang H, Xu D, et al. Identification of a novel cancer stem cell subpopulation that promotes progression of human fatal renal cell carcinoma by single-cell RNA-seq analysis. *Int J Biol Sci*. 2020;16(16):3149-3162. doi:10.7150/ijbs.46645
29. Liu Y, Feng W, Dai Y, et al. Single-Cell Transcriptomics Reveals the Complexity of the Tumor Microenvironment of Treatment-Naive Osteosarcoma. *Front Oncol*. 2021;11.
doi:10.3389/fonc.2021.709210
30. Zhou Y, Yang D, Yang Q, et al. Single-cell RNA landscape of intratumoral heterogeneity and immunosuppressive microenvironment in advanced osteosarcoma. *Nat Commun*. 2020;11(1).
doi:10.1038/s41467-020-20059-6

31. Nagasawa S, Kashima Y, Suzuki A, Suzuki Y. Single-cell and spatial analyses of cancer cells: toward elucidating the molecular mechanisms of clonal evolution and drug resistance acquisition. *Inflamm Regen*. 2021;41(1):22. doi:10.1186/S41232-021-00170-X
32. Tonami K, Kurihara Y, Arima S, et al. Calpain-6, a microtubule-stabilizing protein, regulates Rac1 activity and cell motility through interaction with GEF-H1. *J Cell Sci*. 2011;124(Pt 8):1214-1223. doi:10.1242/jcs.072561
33. Hong JM, Teitelbaum SL, Kim T-H, Ross FP, Kim S-Y, Kim H-J. Calpain-6, a target molecule of glucocorticoids, regulates osteoclastic bone resorption via cytoskeletal organization and microtubule acetylation. *J Bone Miner Res*. 2011;26(3):657-665. doi:10.1002/jbmr.241
34. Miyazaki T, Tonami K, Hata S, et al. Calpain-6 confers atherogenicity to macrophages by dysregulating pre-mRNA splicing. *J Clin Invest*. 2016;126(9):3417-3432. doi:10.1172/JCI85880
35. Er EE, Valiente M, Ganesh K, et al. Pericyte-like spreading by disseminated cancer cells activates YAP and MRTF for metastatic colonization. *Nat Cell Biol*. 2018;20(8):966-978. doi:10.1038/s41556-018-0138-8
36. Cai X, Wang KC, Meng Z. Mechanoregulation of YAP and TAZ in Cellular Homeostasis and Disease Progression. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9. doi:10.3389/FCCELL.2021.673599
37. M P, M R, SJ P, et al. Contact inhibition controls cell survival and proliferation via YAP/TAZ-autophagy axis. *Nat Commun*. 2018;9(1). doi:10.1038/S41467-018-05388-X
38. Varis A, Salmela AL, Kallio MJ. Cenp-F (mitosin) is more than a mitotic marker. *Chromosoma*. 2006;115(4):288-295. doi:10.1007/s00412-005-0046-0
39. Tao Q, Chen S, Liu J, et al. The roles of the cell division cycle-associated gene family in hepatocellular carcinoma. *J Gastrointest Oncol*. 2021;12(2):781-794. doi:10.21037/jgo-21-110
40. Huang Y, Chen X, Wang L, Wang T, Tang X, Su X. Centromere protein F (CENPF) serves as a potential prognostic biomarker and target for human hepatocellular carcinoma. *J Cancer*. 2021;12(10):2933-2951. doi:10.7150/jca.52187
41. Sun J, Huang J, Lan J, et al. Overexpression of CENPF correlates with poor prognosis and tumor bone metastasis in breast cancer. *Cancer Cell Int*. 2019;19(1). doi:10.1186/s12935-019-0986-8
42. Y S, X L, F W, X W, G C, C P. Identification of Metastasis-Associated Biomarkers in Synovial Sarcoma Using Bioinformatics Analysis. *Front Genet*. 2020;11. doi:10.3389/FGENE.2020.530892
43. Yu B, Chen L, Zhang W, et al. TOP2A and CENPF are synergistic master regulators activated in cervical cancer. *BMC Med Genomics*. 2020;13(1). doi:10.1186/s12920-020-00800-2
44. Liu D, Zhou R, Zhou A. Identification of key biomarkers and functional pathways in osteosarcomas

with lung metastasis: Evidence from bioinformatics analysis. *Medicine (Baltimore)*.

2021;100(6):e24471. doi:10.1097/MD.00000000000024471

45. Marion A, Dieudonné F-X, Patiño-Garcia A, Lecanda F, Marie PJ, Modrowski D. Calpain-6 is an endothelin-1 signaling dependent protective factor in chemoresistant osteosarcoma. *Int J Cancer*. 2012;130(11):2514-2525. doi:10.1002/ijc.26246
46. Hein AOuellete MYan Y. Radiation-induced signaling pathways that promote cancer cell survival (review). *Int J Oncol*. 2014;45(5):1813-1819. doi:10.3892/IJO.2014.2614
47. Abad E, Graifer D, Lyakhovich A. DNA damage response and resistance of cancer stem cells. *Cancer Lett*. 2020;474:106-117. doi:10.1016/j.canlet.2020.01.008
48. Akervall J, Nandalur S, Zhang J, et al. A novel panel of biomarkers predicts radioresistance in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Eur J Cancer*. 2014;50(3):570-581. doi:10.1016/j.ejca.2013.11.007
49. Ghiso E, Migliore C, Ciciriello V, et al. YAP-Dependent AXL Overexpression Mediates Resistance to EGFR Inhibitors in NSCLC. *Neoplasia (United States)*. 2017;19(12):1012-1021. doi:10.1016/J.NEO.2017.10.003
50. Zhang X, Abdelrahman A, Vollmar B, Zechner D. The ambivalent function of YAP in apoptosis and cancer. *Int J Mol Sci*. 2018;19(12). doi:10.3390/ijms19123770

Figure Legends

Figure 1: **Calpain-6 overexpression is associated with high YAP/TEAD activity in osteosarcoma cells.** **a**, Calpain-6 mRNA expression in calpain-6 overexpressing cells (Calp6+), Calp6-P-GFP+ cells (GFP+) and Calp6 shRNA expressing cells (Calp6 shRNA). TPM: Transcripts per kilobase million. **b, c**, Volcano plots from RNAseq analysis showing Hippo pathway genes differentially expressed in Calp6-P-GFP+ (**b**) or Calp6+ (**c**) vs Calp6 shRNA cells. Red and blue dots, $p < 0.05$, grey dots, $p > 0.05$. Dotted line indicates the threshold $-\log_2(0.05)$. The lists recapitulate the differentially expressed genes ranked from higher to lower $-\log_2(p\text{value})$. Common genes between Calp6+ and Calp6-P-GFP+ cells are in bold. **d**, Gene set enrichment analysis of a YAP target genes signature comparing Calp6+ to Calp6^{shRNA} cells. NES is normalized enrichment score. **e, f, g**, YAP/TEAD-dependent transcriptional activity in Calp6+ and Calp6^{shRNA} 143B (**e, g**) or U2OS (**f**) cells. The cells were plated on regular plastic (**e, f**) or on collagen-coated silicon (**g**) and transfected with GT11c and Renilla plasmids. Stiffness of the collagen-coated matrix in kPa was as indicated. Results are means \pm SEM of relative luminescence unit (RLU). Renilla activity served as transfection control. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

Figure 2: **Calpain-6 stabilizes YAP protein.** **a, b**, Proteins were extracted from Calp6+ and Calp6^{shRNA} cells and used for Calpain-6, YAP, phospho-YAP, LATS and Phospho-LATS immunoblots. Actin served as loading control. **c**, 143B cells were treated with medium conditioned on WNT3a-producing cells or control cells in the presence of DMSO or chloroquine. Protein extracts were prepared 3 or 20 hours after Wnt stimulation for β -catenin immunoblot. The graph shows means of relative grey intensity of β -catenin to actin from 3 independent blots \pm SEM. **d**, Proteinase K protection assay. The cells were lysed with triton X-100 to obtain whole protein extracts or with a soft detergent to prepare intact multi vesicular bodies (MBVs). The proteinase K (PK) was added to digest proteins that were not protected into the MBVs. Addition of Triton with PK served to control MBV-dependent protection. **e**, immunoblots for Axin and GSK3 in the 3 types of protein extracts.

Figure 3: **YAP accumulates in calpain-6-expressing cells and tumors.** **a**, Representative immunofluorescence of calpain-6 (green) and YAP (red) in cultured 143B cells. DAPI (blue) served for nuclei visualization. Green arrow indicates calpain-6 and corresponding YAP labeling in the same cell. **b**, Mean fluorescence intensity (MFI) of YAP labeling in cells without calpain-6 (Calpain-6-) and in calpain-6-expressing cells (Calpain-6+) \pm SEM. **c**, Representative 3D view of calpain-6 (green) and YAP (red) labeling in a section of 143B cells-derived bone tumor in mouse. **d, e**, Correlations between Calpain-6 and YAP (**d**) or DAPI (**e**) staining in cells of the mouse tumor section. **f, g**, Correlations between Calpain-6 and YAP (**f**)

or DAPI (g) staining in cells of tumor sections from paraffin-embedded lung metastases from osteosarcoma patients. The colors of the different dots distinguish cells of tissue sections from three different patients.

Figure 4: Calpain-6-dependent promotion of YAP protein is associated with the G2M phase. **a**, Analysis of the CORDENONSI_YAP_CONSERVED_ SIGNATURE in Calp6-P-GFP+ vs Calp6 shRNA cells. **b**, Heat map showing the CORDENONSI_YAP_CONSERVED_ SIGNATURE in calpain-6 overexpressing (Calp6+), Calp6-P-GFP+ (GFP+) and Calp6 shRNA expressing cells (Calp6 shRNA). **c-d**, Gene set enrichment analysis of G2M-positive and G2-Checkpoint gene signatures comparing Calp6-P-GFP+ and Calp6 shRNA cells. NES is normalized enrichment score. **e**, Expression of GFP in Calp6-P-GFP cells during the cell cycle. Analysis of DNA content and Edu incorporation to select cells in the different phases of the cycle and GFP fluorescence intensity in the different sorted cell populations. Color code for dots and histograms: Pink=G1, yellow = S, Green=G2M. Grey or blue histograms are negative controls. **f**, GFP fluorescence in Calp6-P-GFP cells that were blocked in G1 (10058 treated cells, green histograms), in G2 (R03306 treated cells, blue histograms) and in control cells (grey histograms). **g**, Calpain-6 and YAP labeling in control or G2M-blocked (R03306) cells. Results are expressed as mean fluorescence intensity (MFI) \pm SEM. 45000 cells were analyzed. **h**, Heat map of the differential expression of YAP-dependent mitotic genes in Calp6-P-GFP+ and Calp6 shRNA cells. **i**, Mitotic genes enrichment analysis comparing Calp6-P-GFP+ to Calp6 shRNA cells. **h, i**, From the left, the list of the genes, heat map of gene expression and enrichment curve.

Figure 5: Calpain-6 expression is associated with up-regulation of G2M and mitotic genes in sarcomas. Calpain-6-dependent gene set enrichment in sarcoma tissues. **a,b**, Enrichment of G2M-positive genes in soft-tissue sarcoma (TCGA-SARC) (a) and in osteosarcomas (Target-OS) (b). **c**, Enrichment of mitotic gene set up in soft-tissue sarcomas. **d**, Heat map of variation of mitotic genes (Entrez gene ID as indicated) according calpain-6 expression in osteosarcomas and soft tissue sarcomas.

Figure 6: Calpain-6/YAP axis is involved in bone tumor out-growth. **a**, Mitosis was observed in Calp6-P-GFP+ cells. DAPI staining (blue) shows the morphology of nuclei and immunofluorescent labeling of α -tubulin (red) shows mitotic spindle. Upper panel shows normal mitosis figures in control cells, lower panels show abnormal mitosis figures representative of mitotic catastrophes in verteporfin treated or calpain-6 shRNA expressing cells. **b, c**, The cells were blocked in G2 overnight. Fresh medium was then added to induce the entry into mitosis. The % of cells with abnormal mitosis was counted comparing control and Calp6 shRNA-expressing (b) and DMSO vs verteporfin-treated 143B Calp6-P-GFP+ cells (c). Results are means \pm SEM of the % of catastrophe mitotic in 3 different cultures. **d**, Tumor evolution in

bone at different times after the implantation of Calp6-P-GFP K7M2 cells. Upper panels show H&E staining of bone sections 7 and 14 days after cell implantation and large/mature bone tumor. Lower panels show GFP immunohistochemistry (brown staining) in corresponding adjacent sections. Dotted lines indicate the extend of the tumor. **e**, Mice with slowly developing tumors were treated with DMSO or verteporfin as indicated (arrows). The survival curves indicate the % of living mice. n=12 DMSO-treated mice, n= 11 verteporfin-treated mice. ** p<0.01. **f**, Quantification of lung metastases in these mice.

Figure 7: Calpain-6/YAP axis is involved in metastasis out-growth. a-c, Detection of tumor cells in lungs after intracardiac injection of PBS (a) or K7M2 cells (b,c). Lungs of injected mice were collected and paraffin imbedded 11 days or 5 weeks after cell injection. Tomato (red) and GFP (green) immunofluorescence shows tumor and Calp6-P-GFP+ cells respectively. **d**, Photos of lungs 34 days after IC-injection. Mice were treated with DMSO or Verteporfin as indicated. **e**, Representative photos of lung sections from DMSO vs verteporfin treated mice 5 weeks after IC injections of K7M2 cells (H&E staining) and quantification of the surfaces of lungs with tumor cells.

Figure 8: The effects of verteporfin on developed tumors is associated with inflammation. a, Mice with bone tumors were treated with DMSO or verteporfin as indicated (arrows). Survival curves indicating the % of living mice. n= 11 DMSO-treated mice, n=11 Verteporfin-treated mice. **b-d**, Quantification of lung metastases in these mice. **b**, Mean number of lung nodules per mm² of analyzed tissue ± SEM. **c**, Representative photos of lung tumor nodules in DMSO (upper panel) and verteporfin (lower panel) treated mice. **d**, Mean surface of lung nodules per mm² of analyzed tissue ± SEM. **e**, Representative photos of Ki67 immunostaining in lung metastases of DMSO and verteporfin-treated mice. **f**, Percentage of Ki67 positive cells in lung metastases of DMSO vs verteporfin-treated mice. Results indicate means ± SEM. Colored dots discriminate the 3 different mice that were analyzed. **e**, Representative photos of NF-KB (p65) labelling in cells around the metastases in lungs of DMSO vs verteporfin-treated mice. **h**, Detection of cathepsin activity in mice with fast-growing bone tumors treated with DMSO or verteporfin as indicated. Twenty four hours after NIR imaging the mice were injected with PBS (sham injected) or a pan-cathepsin probe. **i**, Quantification of the NIR signal in the lungs of control (DMSO) vs verteporfin-treated mice.

Methods

Osteosarcoma cell lines and cell culture

Human 143B, U2OS and murine K7M2 osteosarcoma cell lines were obtained from ATCC (Manassas, VA). The human and mouse cell lines were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Gibco) and RPMI medium 1640 (Gibco), respectively. Culture medium was supplemented with 10% of fetal calf serum (Sigma Aldrich) and 100 IU/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Gibco). The cells were treated to prevent mycoplasma contaminations. The reporter Calp6-P-GFP plasmid was previously described ¹. The 143B cells expressing GFP under the control of the calpain-6 regulatory sequence, were sorted using a BD FACS ARIA II (Beckton Dickinson). Only cells with a high GFP expression were selected. We transferred non-silencing or calpain-6 specific shRNA sequences that have been previously described ² into the lentiviral vector pLKO.1 puro that was a gift from Bob Weinberg (Addgene, # 8453) ³. Lentiviral particles were prepared in 293T cells using a packaging plasmid kit (Cellecta) and then mixed with medium containing 1µl/ml polybrene for transductions. The cells that stably expressed control non-silencing shRNA were transduced to overexpress calpain-6 as previously described ⁴. The murine Calp6-P-GFP K7M2 cells were transduced to express tomato under the EF1α promoter and luciferase with ready-to-use lentiviral particles (LV439, Amsbio). For stable genomic integration of exogenous DNA, transduced cells were selected with G418, blasticidin or puromycin (Invitrogen). To optimize calpain-6 and Calp6-P-GFP expression the cells were cultured in 3% O₂ for 24 hours before the analyses.

RNA extraction and RT-PCR analyses

Total RNAs were extracted from osteosarcoma cells using ISOLATE II RNA Mini Kit (Bioline). Reverse transcription was performed with random primers using High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Real time Quantitative PCR was then performed using primers listed below and SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit (Bioline) on LightCycler 480 (Roche Applied Science). ACTB and PPIA served as housekeeping genes. For a gene x, results are expressed as $(2^{\Delta\Delta CT}) * 100$, $\Delta CT = ((CT$

$\Delta T -$

$CT^{\Delta T} / 2) - CT^x$. The list of the primers can be found in supplemental

table 1.

TEAD transcriptional activity

To test the effect of calpain-6 on YAP-dependent transcriptional activity we used 8xGTIIC-luciferase construction that was a gift from Stefano Piccolo (Addgene plasmid # 34615;

<http://n2t.net/addgene:34615> ; RRID:Addgene_34615). The cells were cotransfected with 0.2 mg/well of GT11c or control empty plasmid and 10 ng/well of phRLSV40 (Renilla expression plasmid as internal

transfection control). Forty-eight hours after transfection, Firefly and Renilla luciferase activities were measured sequentially using Luciferase Reporter Assay Systems (Promega). Luciferase activity was normalized both to Renilla activity, as transfection control, and to values obtained with cells transfected with an empty plasmid. The cells were seeded on regular plastic plates or on collagen-coated silicon with controlled elastic modulus of 0.5, 2, 64 KPa (Cytosoft plates, Advanced BioMatrix).

RNA sequencing

RNA purity/quality ($RIN \geq 7$) was assessed with the 2100 Agilent Bioanalyzer using the Agilent small RNA kit. The RNAseq was performed by the Integrigen platform. Libraries were prepared with NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina protocol according supplier recommendations. Briefly the key stages of this protocol are successively, the purification of PolyA containing mRNA molecules using poly-T oligo attached magnetic beads from 1 μ g total RNA (with the Magnetic mRNA Isolation Kit from NEB), a fragmentation using divalent cations under elevated temperature to obtain approximately 300bp pieces, double strand cDNA synthesis and finally Illumina adapters ligation and cDNA library amplification by PCR for sequencing. Sequencing is then carried out on Paired End 100b reads of Illumina NovaSeq. Image analysis and base calling is performed using Illumina Real Time Analysis (3.4.4) with default parameters.

RNA-Seq data processing

A computational pipeline for RNA-Seq data was established for analyzing the identified experiments in a high-throughput manner. All datasets were analyzed using the same pipeline. Quality of raw sequencing reads was assessed by FastQC (Version 0.11.9) to estimate the proportions of reads of low quality. Reads were aligned on the reference genome using Kallisto (v0.46.1). Kallisto index was utilized for building up the reference genomes for reads mapping. The transcriptomic coordination of homo sapiens (GRCh38.p13) downloaded from Ensembl (release 99) was translated to filter out alignments carrying insertions or deletions or falling outside the identified transcriptome regions. To quantify the expression, abundance estimates of paired end samples were carried out by Kallisto in transcripts per million (TPM)⁵. Read count matrices for each cell sample were produced with Tximport (Version 1.14.2) ⁶. The abundance quantification carried out with Tximport identifies the expected counts for each gene. The per-gene counts were given as input to perform gene differential expression analysis using DESeq2 with default settings (Version 1.26.0) ⁷. Genes with log₂ fold changes > 1 and < -1 were identified as significantly up and down-regulated respectively. In an attempt to get insight into the potential functions

of differentially expressed genes, Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichments were obtained by ClusterProfiler (Version 3.14.3). GO analysis was carried out by enrichGO function in ClusterProfiler with settings (ont = "BP", pAdjustMethods = "BH", pvalueCutoff= 0.001, qvalueCutoff = 1). KEGG analysis was conducted by the enrichKEGG function in ClusterProfiler for pathway representations with settings (organism = "hsa", pvalueCutoff = 0.05, qvalueCutoff = 1). In order to investigate molecular details of specific biological pathways, Reactome Pathway Analysis (ReactomePA) function implemented in ClusterProfiler was used to explore the connections between experimental information and well-annotated established pathway data, focusing on intermediary metabolism. An adjusted P value below 0.05 was considered as significant and was calculated based on the Benjamini-Hochberg procedure ⁸.

Gene set enrichment analysis (GSEA)

Two datasets were downloaded from TCGA (<https://portal.gdc.cancer.gov>) to analyze the relationship between CAPN6 and YAP expression in bone (Target-OS) and soft tissue sarcomas (TCGA-Sarc) ⁹. The RNA-seq profiles of the tumors and of the 143B cells were analyzed with the GSEA software ¹⁰. The gene sets were listed in table 2. The enrichment scores were established based on a FDR < 0.25 after 1000 permutations.

Immunoblots

The cells were washed with cold phosphate buffered saline and then lysed on ice in 50mM TRIS buffer (pH 7.5) containing 150 mM NaCl, 1% NP-40, 10% glycerol and protease inhibitors. Proteins lysates were subjected to SDS-PAGE, electro transferred on a PVDF membrane, incubated with the primary antibodies and then with appropriate HRP-conjugated antibodies. The signals were visualized using a chemiluminescent detection system (Azure Spectra). Band quantifications were performed using image J software. The primary antibodies are listed in table 3.

Immunohistochemistry

Mouse bone tumors and lungs were fixed in 4% PFA in PBS and then paraffin-embedded. After dewaxing, 5 µm tissue sections were incubated at 70°C in citrate buffer pH6 for 4 hours. The tissues were then blocked for endogenous peroxidase activity using 3% H2O2 in PBS and for non-specific Ig coupling with PBS containing 0.02% Tween-20, 2.5% serum horse, 2.5% BSA. The tissue sections were incubated overnight at 4°C with primary antibodies and then with HRP-conjugated secondary Ig. The ImpRESS HRP

polymer detection kits (Vector) with DAB substrate was used to reveal specific staining. The tissue sections were counterstained with purified methyl green. The sections were then dehydrated with xylene and mounted using Entellan mounting (MERCK MILLIPORE). Goat, rabbit or mouse IgG replaced specific primary antibodies to serve as negative controls. The primary antibodies are listed in table 3.

Immunofluorescence Staining

We collected paraffin-embedded specimens of resected pulmonary metastases from 3 patients with well characterized osteosarcoma. Informed consent was obtained from each patient or the patient's guardian. Tissue sections from these tissues or 143B cells were used to analyze YAP and Calpain-6 expression. Saturation of non-specific Ig binding sites was performed with PBS containing 0.02% Triton-X100, 1% donkey serum, 1% BSA. The secondary antibodies consisted in DyLight-550 or -480 conjugated anti- IgG (Pierce). Nuclei were then counterstained with DAPI at 0.1 µg/ml (Life Technologies). To reduce autofluorescence in tissue sections we used the TRUEVIEW quenching kit (VECTOR).

Image acquisitions and processing

Image acquisitions were done using the ApoTome optical sectioning system (Zeiss) with inverted microscope (Zeiss Axio Observer Z1) for immunofluorescent images and with a Nikon microscope (type 120c) for chromogenic images. Zenpro (Zeiss) and Adobe Photoshop were used for image processing. For comparison of fluorescence images, contrast and brightness were adjusted identically. All other quantifications were performed using the ImageJ software.

Flow cytometry analyses

For intracellular staining the cells were fixed and permeabilized using Fix-Perm kit (eBiosciences) before incubation with the antibodies (Table 3). To assess cell division, PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit was used as membrane marker at the onset of the culture (Sigma Aldrich). Fluorescence analysis was performed in FACS CANTO II using Diva software (Becton Dickinson). Classical gating strategy using FSC-A vs SSC-A and FSC-A vs FSC-H was performed to select cells to be considered for the analysis.

Mouse osteosarcoma models

S/SPF BALB/cByJ mice were purchased from Charles River Breeding Laboratories. They were 6 weeks old males. Mice were kept in accordance with the institutional guidelines of the French Ethical Committee and under the supervision of authorized investigators. *In vivo* experiments were approved by the Local Ethical Committee (APAFIS #26491). K7M2 cells were cultured 24 hours in 3% O₂, collected and counted.

Fifty thousand cells in 5 μ l PBS were injected into the right tibia of the mice as previously described ¹¹. Briefly, the mice were anesthetized with a Ketamine/Xylazine mix (100/50 mg/kg) and received preventive analgesia with subcutaneous injections of 50 μ g/kg of buprenorphine. The right tibia was drilled and a needle was inserted to slowly inject the cell suspension. Verteporfin (Sigma Aldrich) was administered at 6mg/kg via intraperitoneal injections. Injections plan is in supplemental Fig. 7. Mice were treated twice a week for 8 weeks with no significant modification of weight. DMSO diluted in PBS was administered in control mice. Tumor growth was monitored longitudinally in live animals every week either by measuring the bone tumor with a Vernier caliper or using bioluminescence imaging. Animals were sacrificed when the tumor reached 1cm in diameter. The Perkin Elmer's ProSense-680 probe was used to assess inflammation in tumor-developing mice. It is a protease activatable NIR fluorescent probe that is optically silent in its intact state and become highly fluorescent following cathepsin-mediated cleavage.

Tumor growth monitoring by optical imaging

Mice were anesthetized by isoflurane inhalation (0,9mg per mouse) and positioned under a cooled intensified charge-coupled device (CCDi) camera (Biospace) with the injected tibia stretched out. Prior to the acquisition, 2 mg of luciferin potassium salt (D-luciferin, Interchim) diluted in PBS was injected through IP route. Bioluminescent signal was acquired for 10 minutes using the Photo Acquisition software (BiospaceLab). The bioluminescence intensity (BLI) was measured in the region of interest (2cm² ROI) corresponding to the tumor area using the M3Vision+ software (Biospace). BLI is the total radiant efficiency (photons/second/sr) of the tumor corrected with the radiant efficiency of an international positive control LED.

Statistics

Statistical analysis was performed with GraphPad Prism version 9.2.0. Differences between 2 groups were tested with two-tailed Student T tests. For multiple comparisons we used one-way ANOVA. The statistical tests have been performed on biological replicates. Excepted the RNAseq analysis, each experiment was repeated independently 2-3 times and results were pooled when possible. Correlations were tested using simple linear regressions.

1. Andrique C, Morardet L, Linares LK, et al. Calpain-6 controls the fate of sarcoma stem cells by

- promoting autophagy and preventing senescence. *JCI insight*. 2018;3(17). doi:10.1172/jci.insight.121225
2. Marion A, Dieudonné F-X, Patiño-Garcia A, Lecanda F, Marie PJ, Modrowski D. Calpain-6 is an endothelin-1 signaling dependent protective factor in chemoresistant osteosarcoma. *Int J Cancer*. 2012;130(11):2514-2525. doi:10.1002/ijc.26246
 3. Stewart SA, Dykxhoorn DM, Palliser D, et al. Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells. *RNA*. 2003;9(4):493-501. doi:10.1261/rna.2192803
 4. Marion A, Dieudonné F-X, Patiño-Garcia A, Lecanda F, Marie PJ, Modrowski D. Calpain-6 is an endothelin-1 signaling dependent protective factor in chemoresistant osteosarcoma. *Int J cancer*. 2012;130(11):2514-2525. doi:10.1002/ijc.26246
 5. Bray NL, Pimentel H, Melsted P, Pachter L. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat Biotechnol*. 2016;34(5):525-527. doi:10.1038/nbt.3519
 6. Sonesson C, Love MI, Robinson MD. Differential analyses for RNA-seq: Transcript-level estimates improve gene-level inferences. *F1000Research*. 2016;4. doi:10.12688/F1000RESEARCH.7563.2
 7. RC G, VJ C, DM B, et al. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol*. 2004;5(10). doi:10.1186/GB-2004-5-10-R80
 8. Boyle EI, Weng S, Gollub J, et al. GO::TermFinder - Open source software for accessing Gene Ontology information and finding significantly enriched Gene Ontology terms associated with a list of genes. *Bioinformatics*. 2004;20(18):3710-3715. doi:10.1093/bioinformatics/bth456
 9. Grossman RL, Heath AP, Ferretti V, et al. Toward a Shared Vision for Cancer Genomic Data. *N Engl J Med*. 2016;375(12):1109-1112. doi:10.1056/nejmp1607591
 10. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, et al. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(43):15545-15550. doi:10.1073/pnas.0506580102
 11. Dieudonné F-X, Marion A, Marie PJ, Modrowski D. Targeted inhibition of T-cell factor activity promotes syndecan-2 expression and sensitization to doxorubicin in osteosarcoma cells and bone tumors in mice. *J Bone Miner Res*. 2012;27(10). doi:10.1002/jbmr.1650

Supplementary information

Table 1: Primers

	Forward	Reverse	Supplier
ANKRD1	5'-AGTAGAGGAACTGGTCACTGGT-3'	5'-TGGGCTAGAAGTGTCTTCAGA-3'	Eurogentec
AXL	5'-CACCAGCAAGAGCGATGTGT	5'-CGGTCCTGGGGATTAGCTC-3'	Eurogentec
CTGF	5'-AGGAGTGGGTGTGTGACGA-3'	5'-CCAGGCAGTTGGCTCTAATC-3'	Eurogentec
Cyr61	5'-GCCAACCAGCATTCTGAGA-3'	5'-GAGCCCGCCTTTTATACGGG-3'	Eurogentec
YAP	5'-GCACCTCTGTGTTTTAAGGGTCT-3'	5'-CAACTTTTGCCTCCTCCAA-3'	Eurogentec
actine	5'-GAGAAGAGCTACGAGCTGCCTG-3'	5'-GGTAGTTTCGTGGATGCCACA-3'	Eurogentec
PPia	5'-GTCAACCCACCGTGTCTT-3'	5'-CTGCTGTCTTTGGGACCTTGT-3'	Eurogentec

Table 2: Gene sets

CORDENONSI_YAP_CONSERVED_SIGNATURE

GO:1902751, positive regulation of cell cycle G2/M phase transition

REACTOME_G2_M_CHECKPOINTS

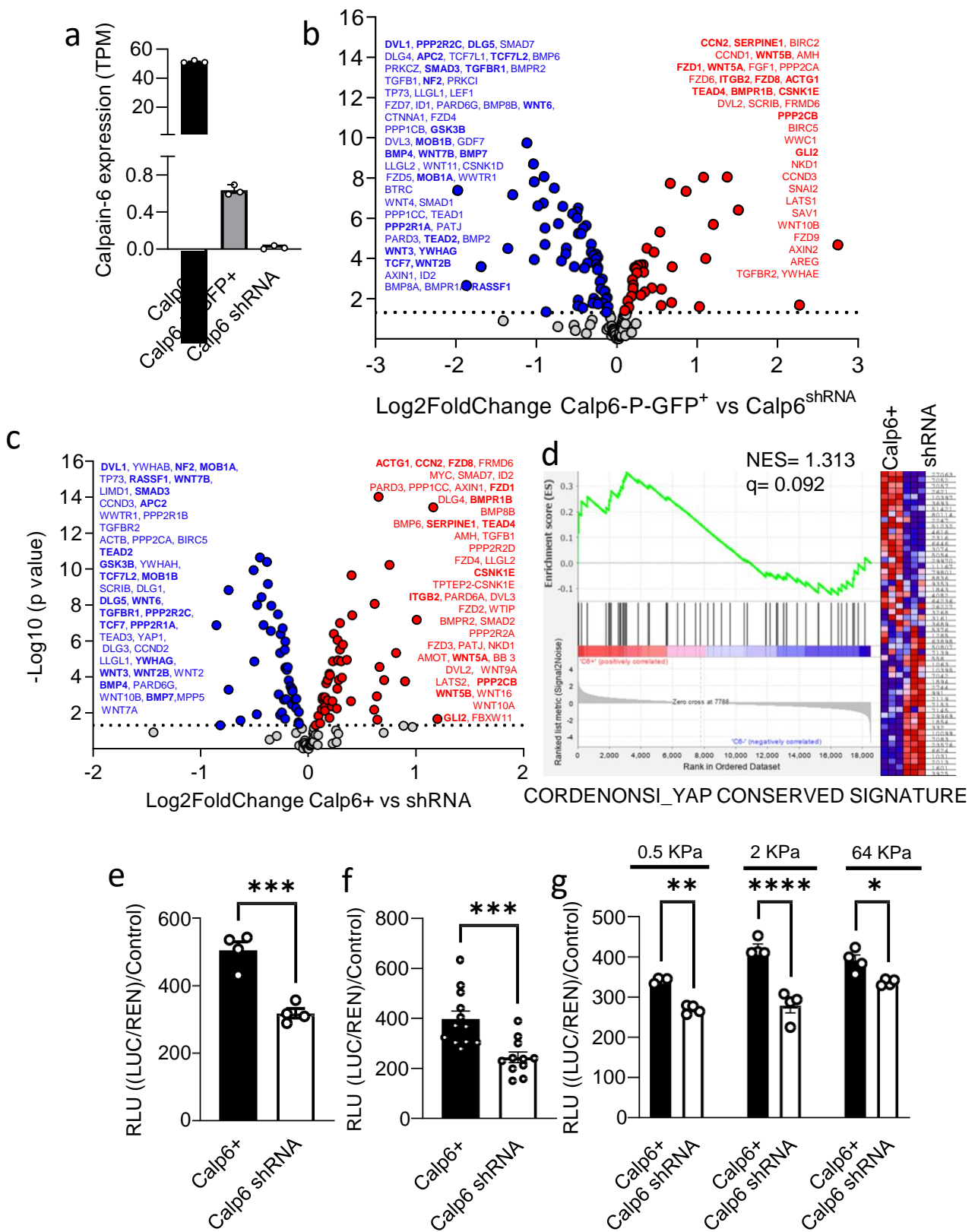
HALLMARK_DNA_REPAIR

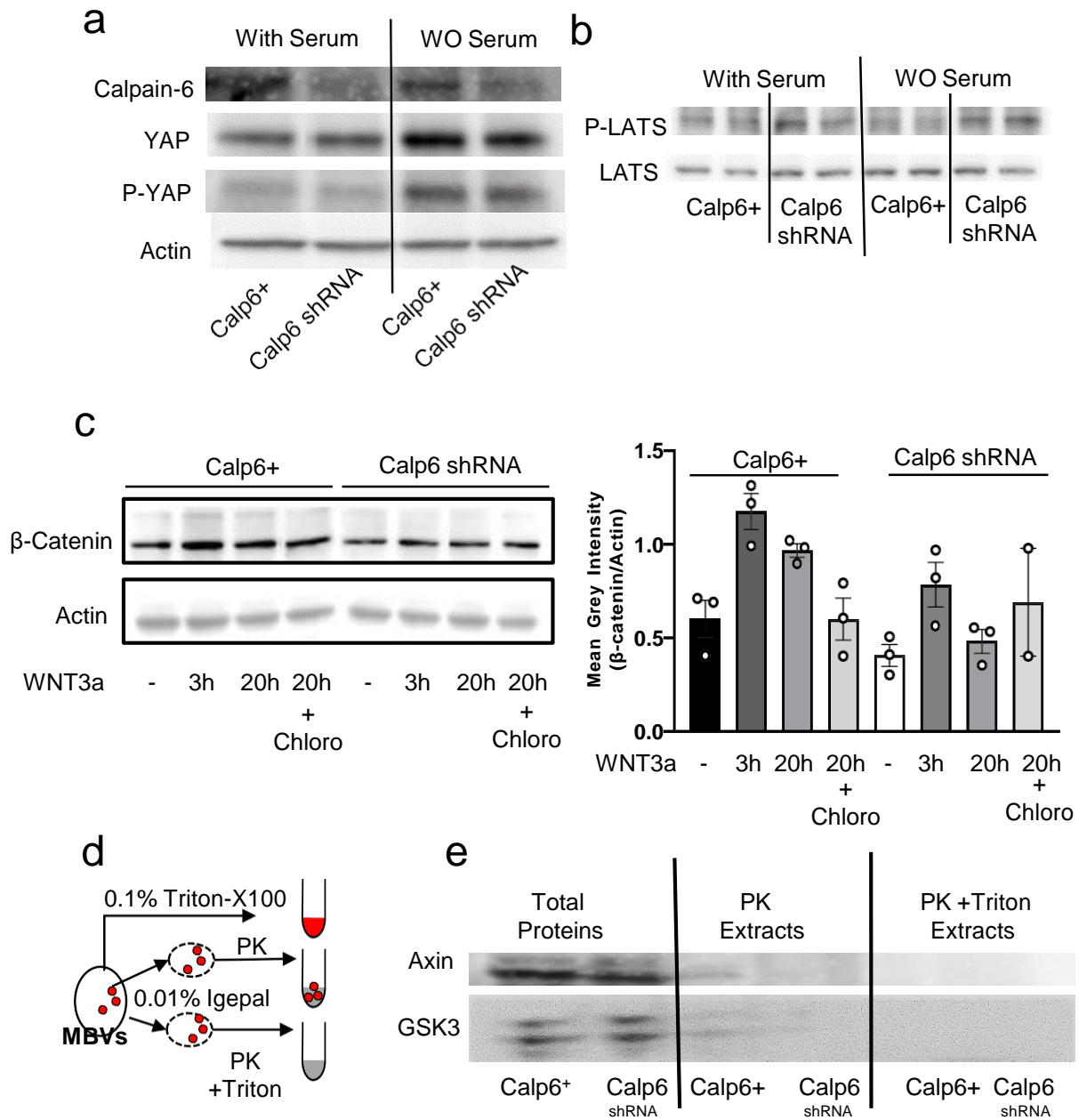
YAP-dependent mitotic gene signature from Pattschull et al., 2019: (Entrez ID) 259266, 991, 1063, 283431, 3161, 51203, 7153, 890, 6790, 1031, 2621, 7052, 5054, 7057, 332, 29969, 4082, 3925, 26227, 3268, 1894

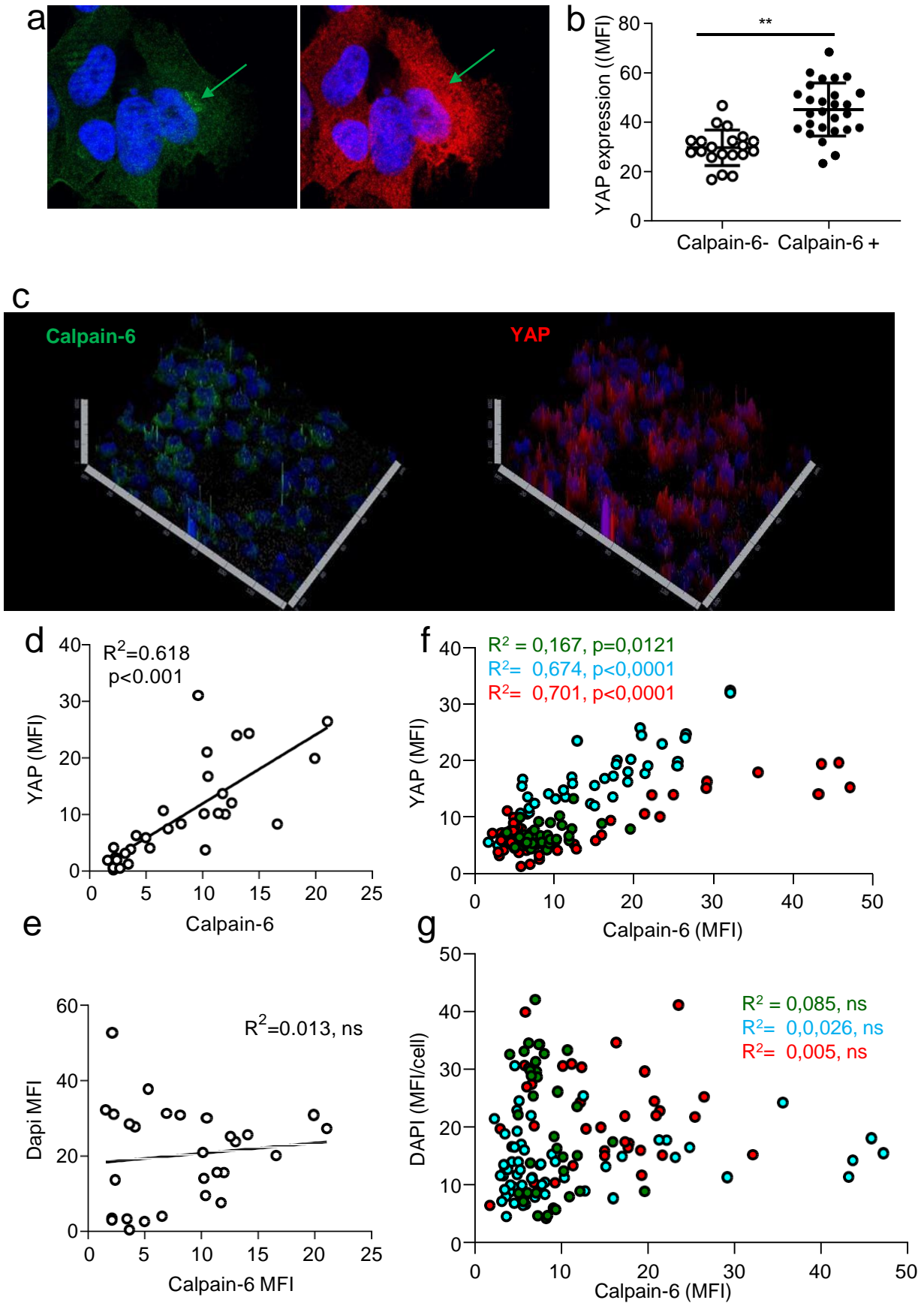
Table 3: Antibodies

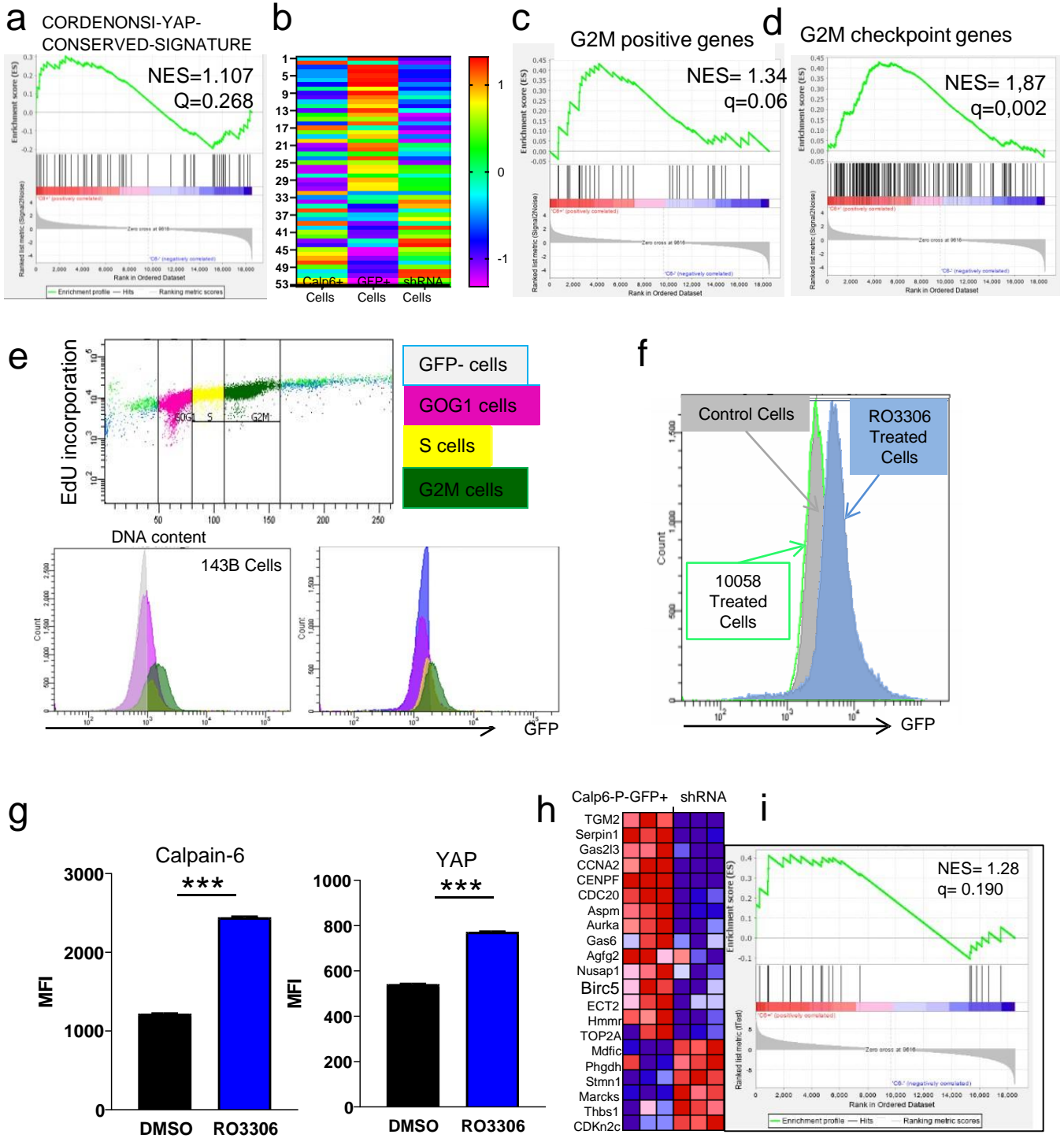
Antibodies				
Protein	host	Supplier	reference	Dilution
Calpain-6	Rabbit	Cusabio	CSB-PA897594LA01HV	1:10000 (WB)
				1:2500 (IF)
Actin	Rabbit	Sigma-Aldrich		1:1000 (WB)

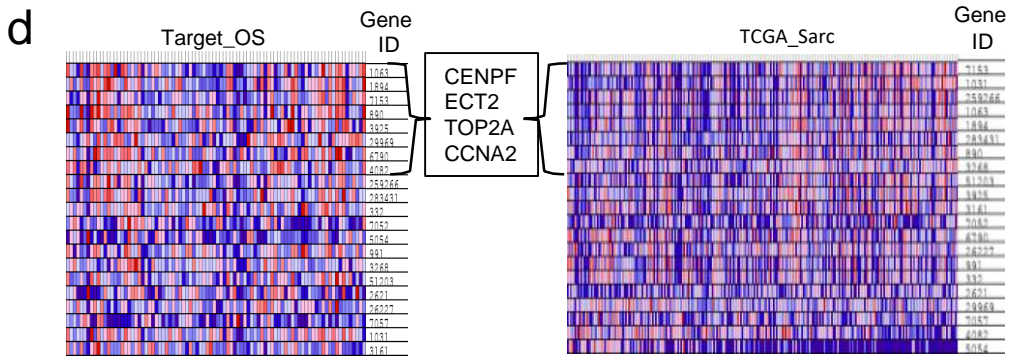
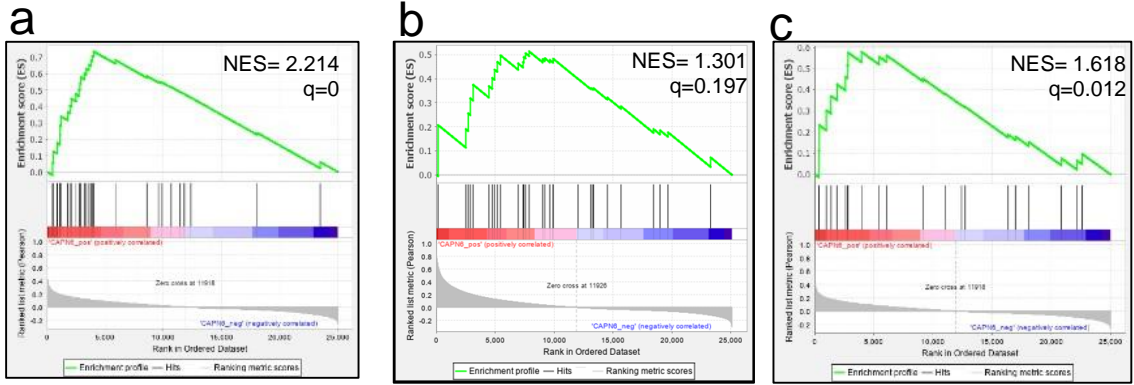
YAP	Mouse	Santa-Cruz	sc-101199	1:1000 (WB)
				1 :200 (IF)
TAZ	Mouse	BDBiosciences	560235	1:1000 (WB)
P-lats (serine 127)	Rabbit	Cell Signaling	9157S	1:1000 (WB)
Lats1 (N-term)	Rabbit	Sigma	SAB1300096	1:1000 (WB)
β -catenin	Mouse	Santa-Cruz	sc-7963	1:1000 (WB)
GSK3 α/β	Mouse	Santa-Cruz	sc-7291	1:1000 (WB)
AXIN	Rabbit	Invitrogen	34-5900	1:1000 (WB)
α -tubulin	Mouse	Santa-Cruz	sc-51500	1:1000 (IF)
GFP-FITC	GOAT	ABCAM	Ab6662	1 :1000 (IF)
P-YAP (serine127)	Rabbit	Cell Signaling	4911S	1:1000 (WB)
Ki-67 (clone SP6)	Rabbit	Zytomed Systems	Z2031RS	1 :100 (IHC)
NFKB p65 (G-8)	Mouse	Santa-Cruz	Sc-398442	1 : 100 (IHC)

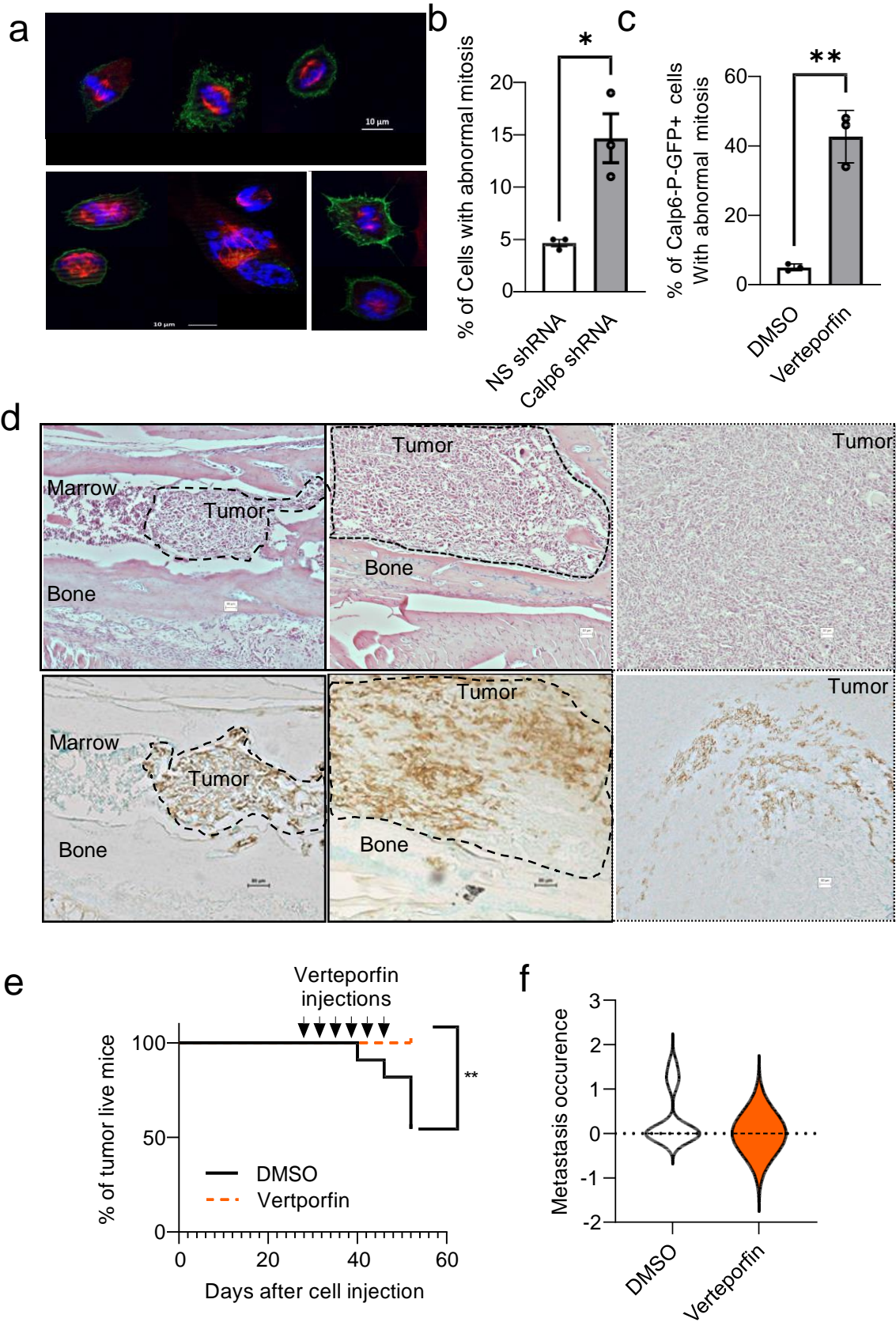


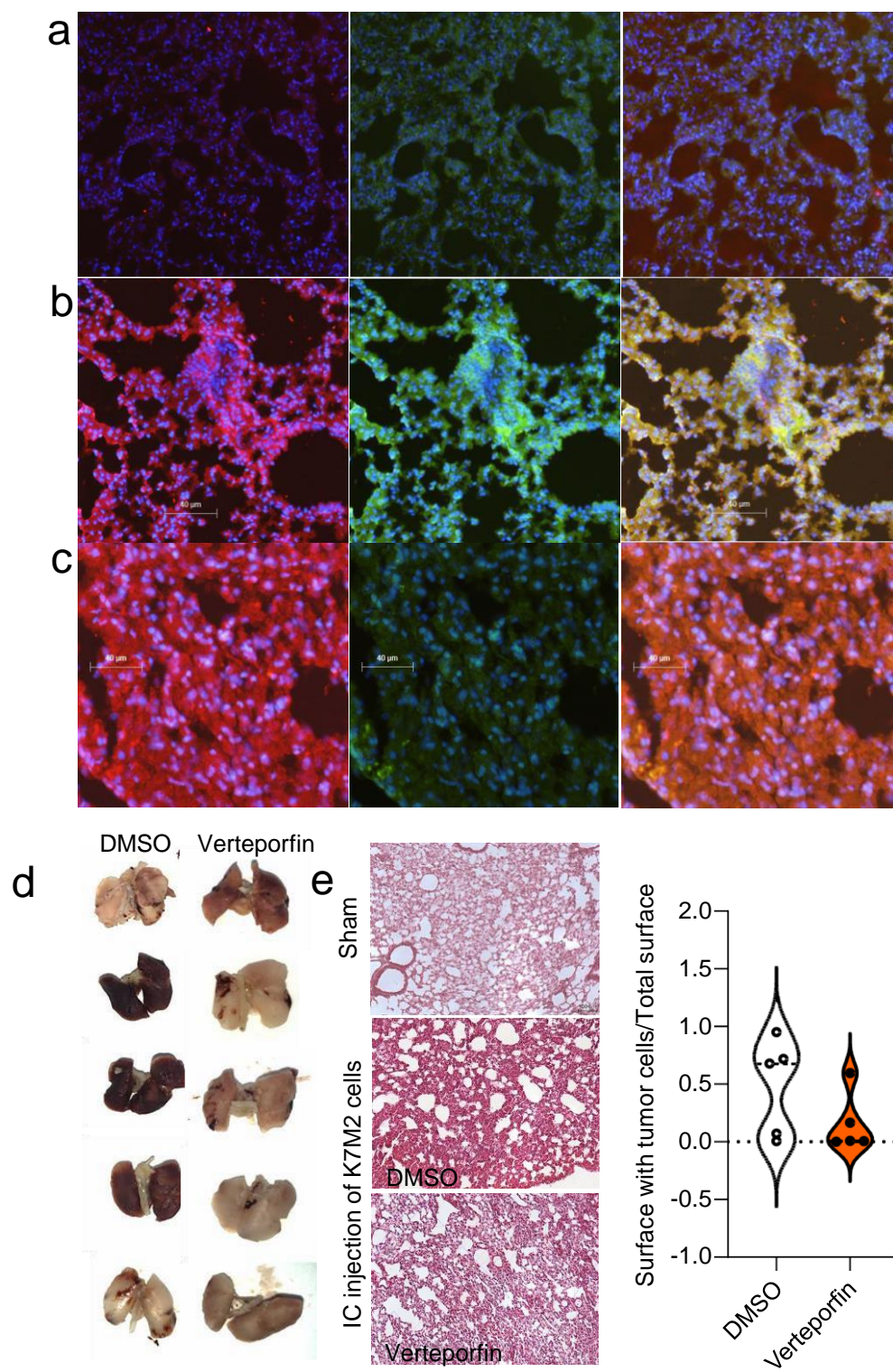


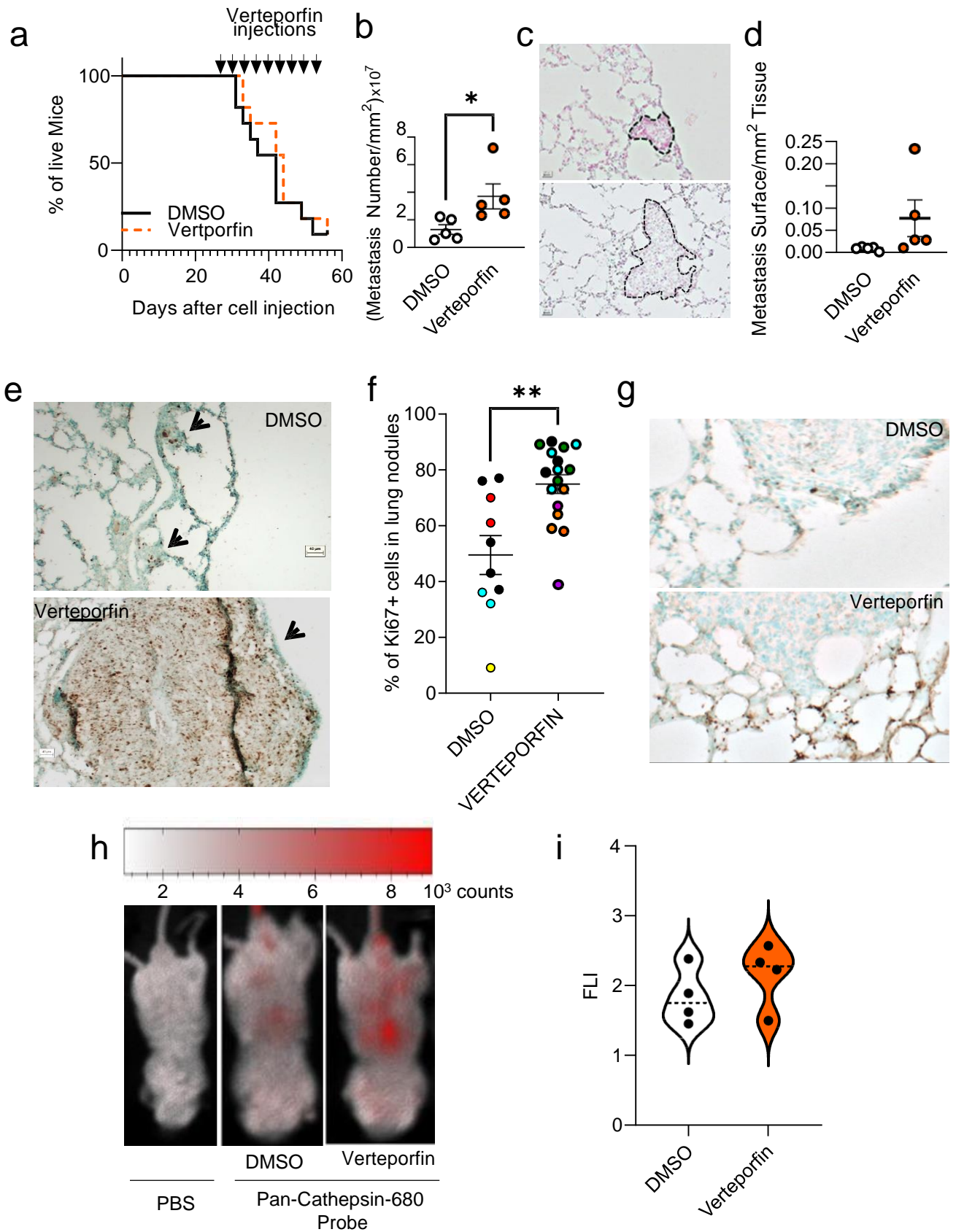


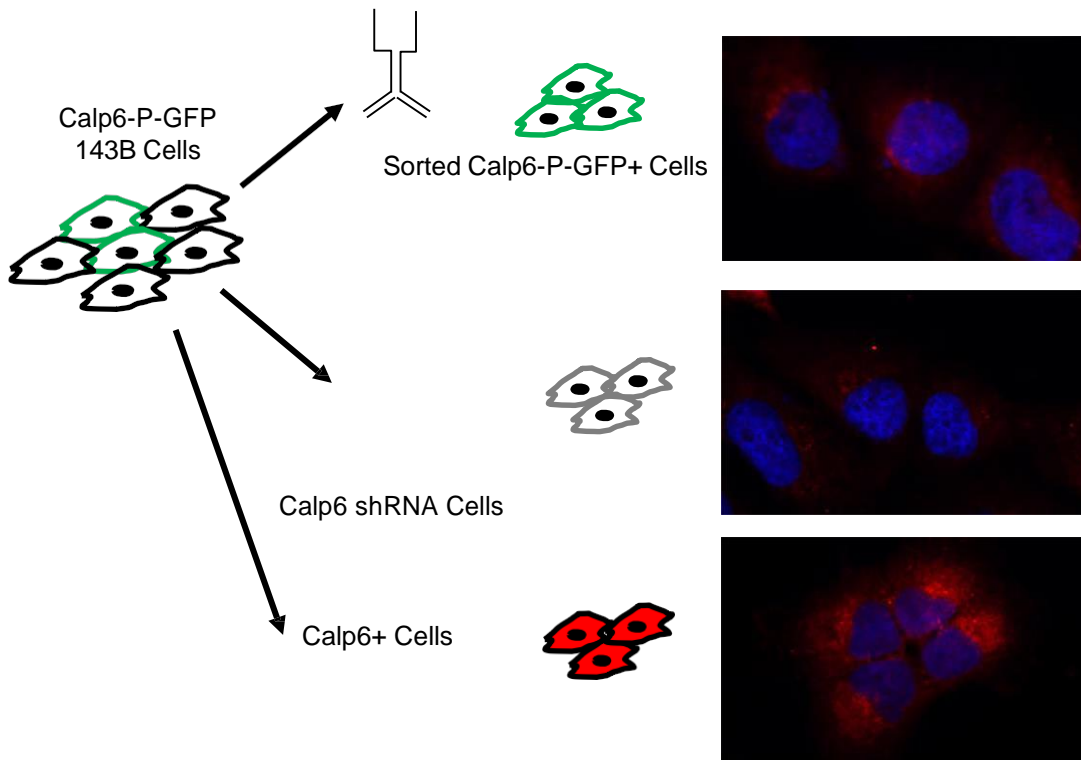




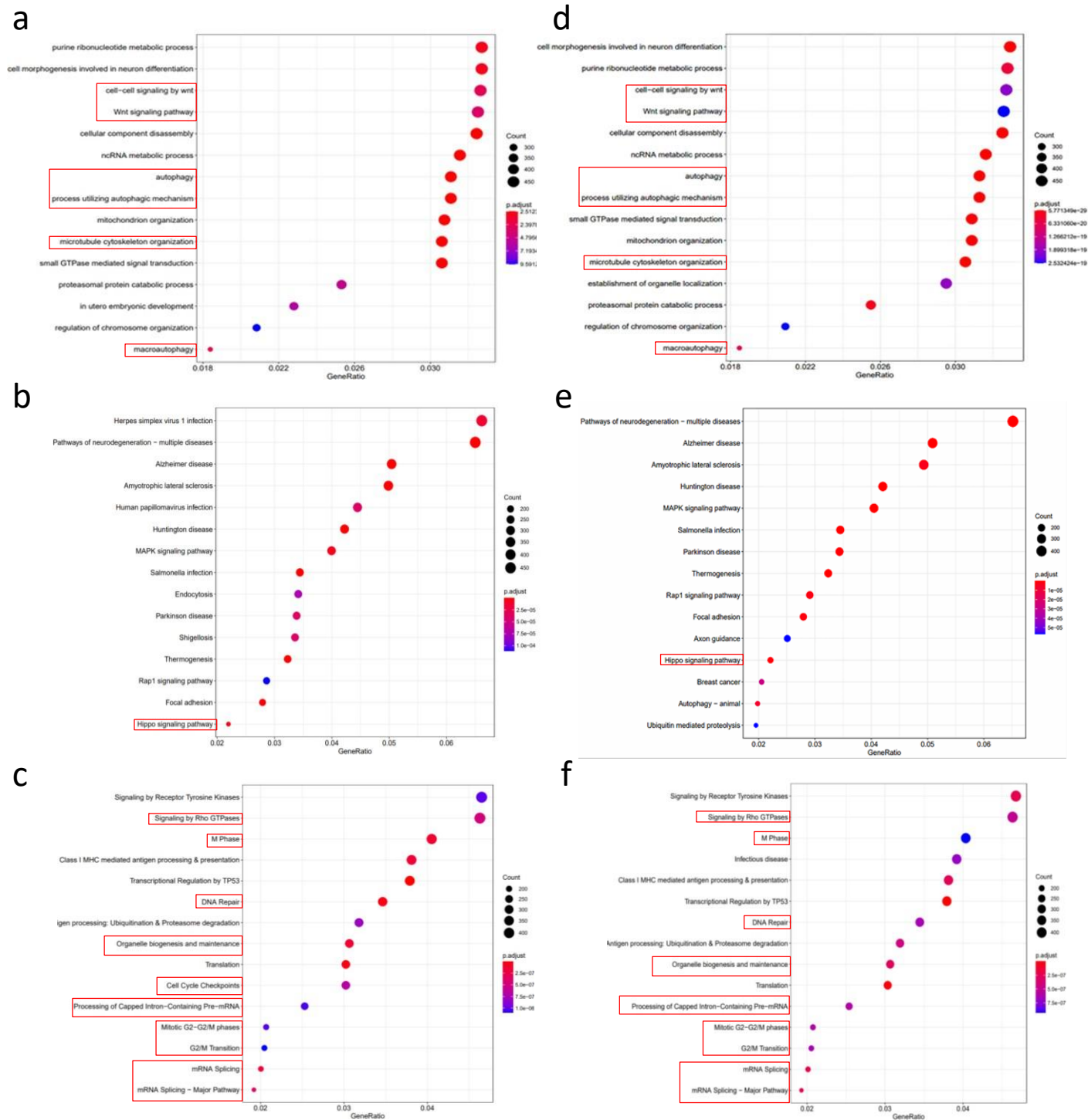




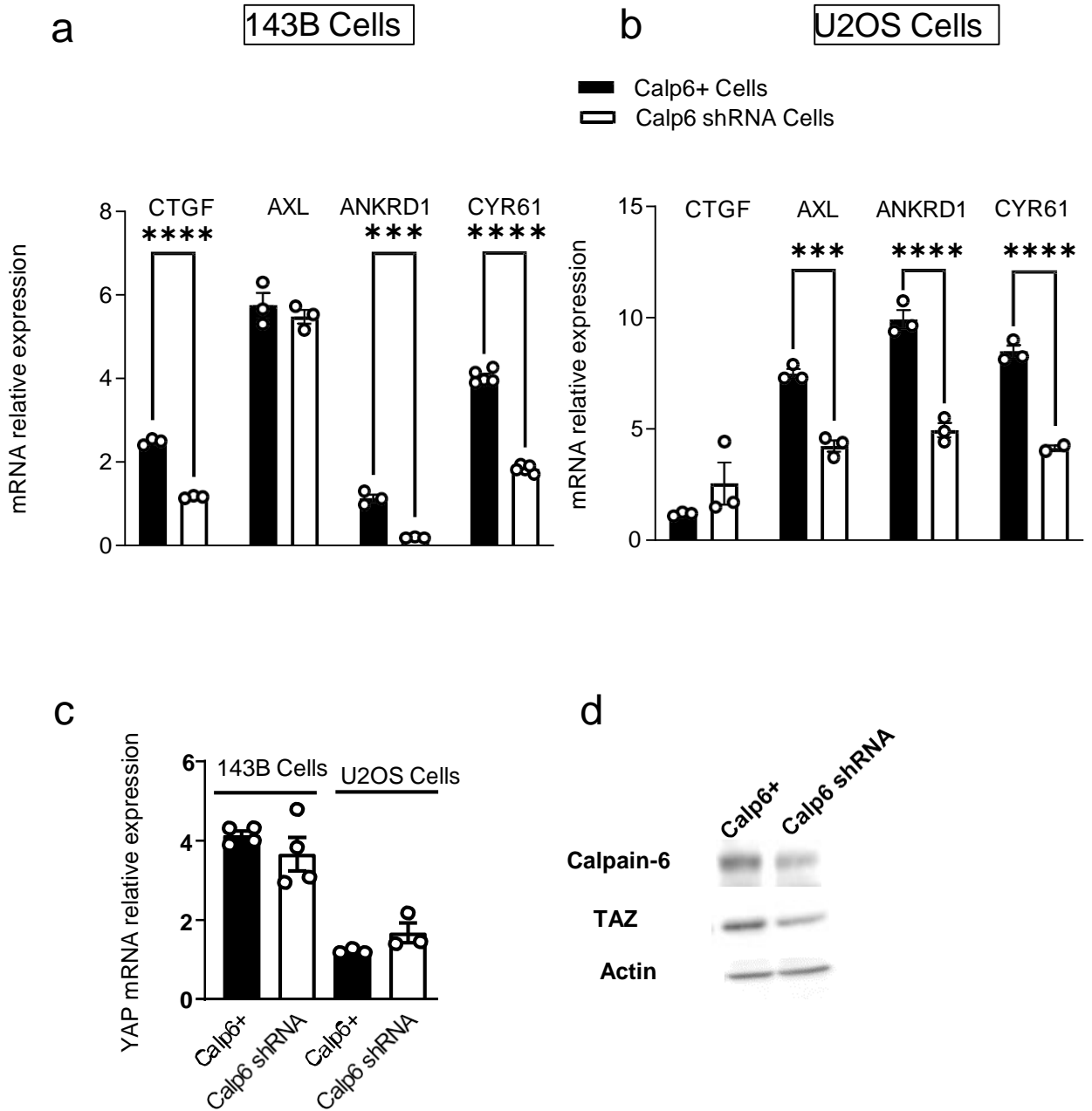




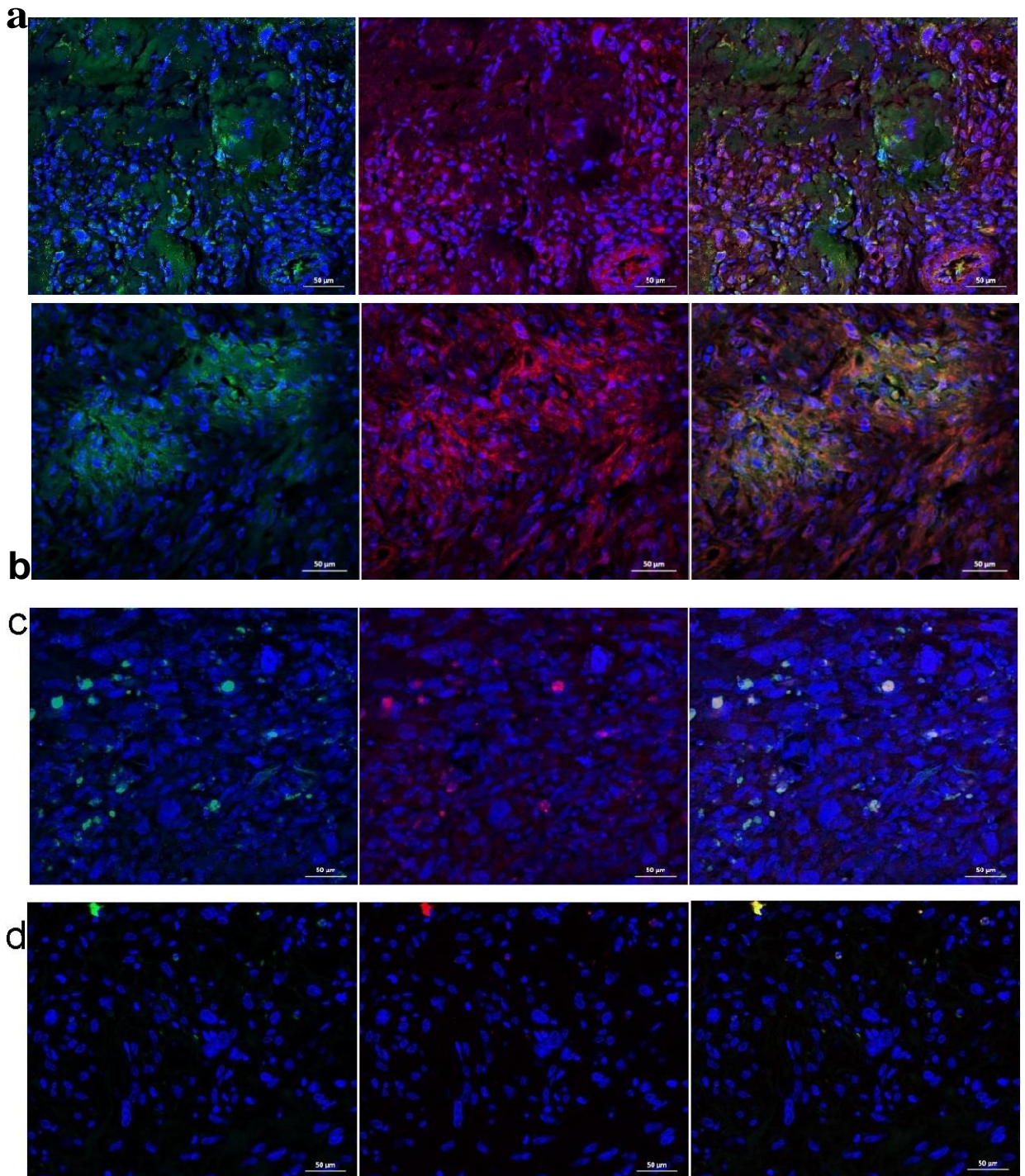
Supplementary Figure 1: 143B cells were modified to express GFP under the control of CAPN6 regulatory sequence (Calp6-P-GFP Cells). The Calp6-P-GFP+ cells were sorted to isolate cells that express basal levels of calpain-6. Calp6-P-GFP cells were transduced with PLKO-puro-shRNA to suppress calpain-6 expression (Calp6 shRNA Cells). Calp6-P-GFP cells expressing control non-silencing shRNA were transduced with a lentiviral vector to overexpress calpain-6 (Calp6+ Cells). RNA were extracted from these different cell populations to performed the transcriptomic analysis.



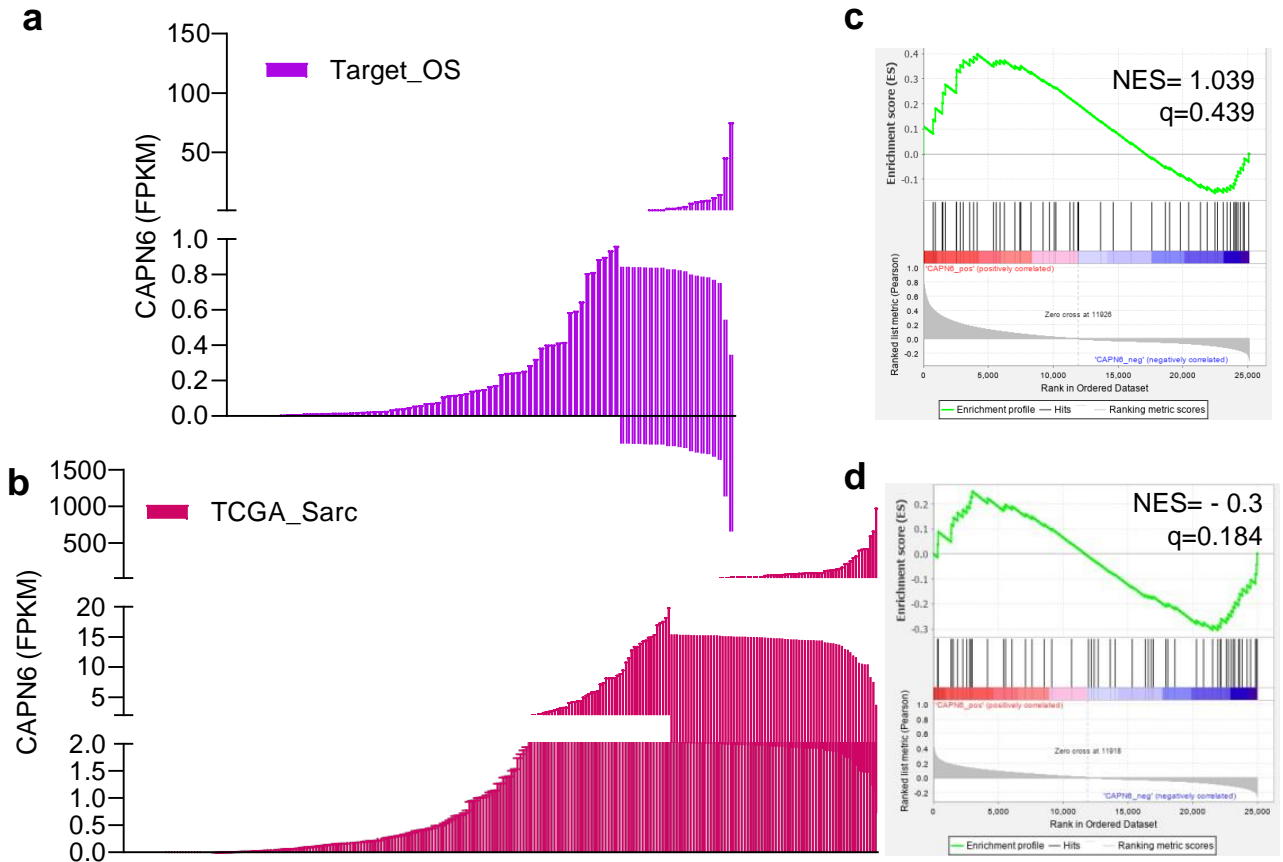
Supplementary Figure 2: **Analyses of the potential functions of differentially expressed genes** in Calp6-P-GFP+ vs Calp6 shRNA cells (a, b, c), and Calp6+ vs Calp6 shRNA cells (d, e, f) using Gene Ontology (a, d), Kyoto Encyclopedia of Genes (b,e) and Reactome Pathway Analysis (c, f). The size of the dots indicates the number of genes of the signature differentially expressed (count) and the p values are indicated with the color code (p. adjust). Red frames show pathways that are discussed in the text of the article.



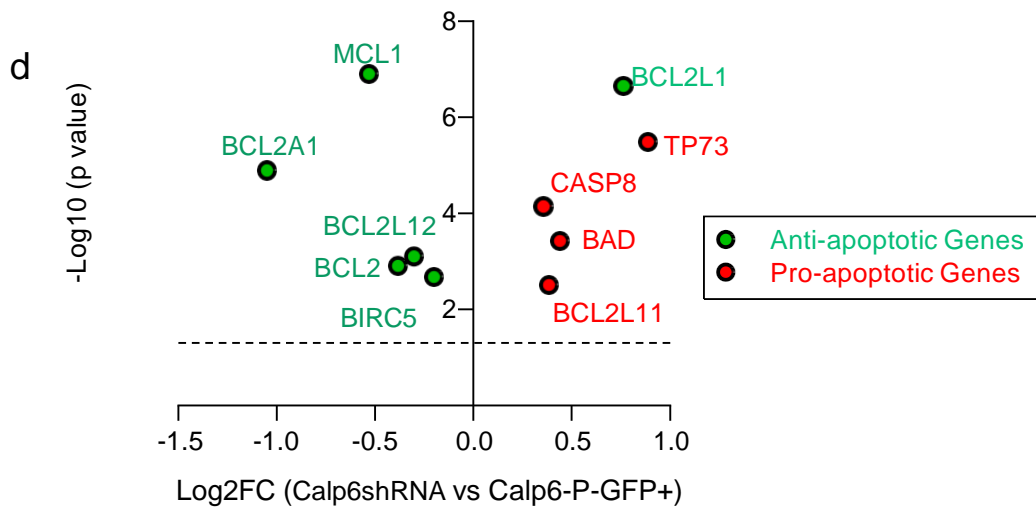
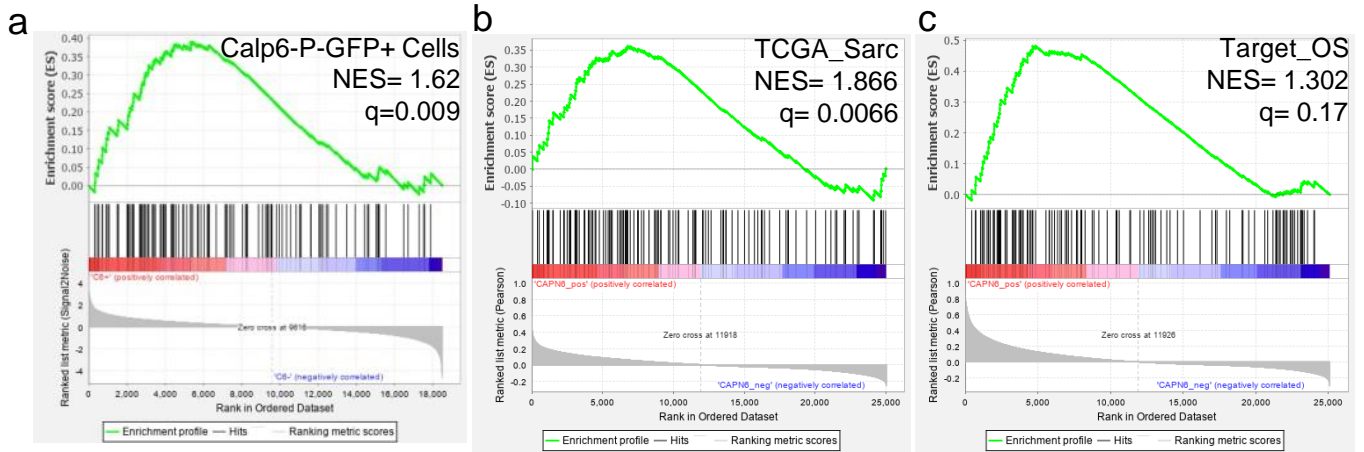
Supplementary Figure 3 : **Increased YAP activity was associated with YAP and TAZ protein accumulation.** Expression of YAP/TEAD targets as indicated in calpain-6 overexpressing (Calp6+) and calpain-6 shRNA expressing (Calp6 shRNA) 143B (a) or U2OS (b) cells. c, Expression of YAP mRNA in Calp6+ vs Calp6 shRNA 143B and U2OS cells. Results are expressed as mean % of ACT/PPIA expression \pm SEM. d, Western blot analysis of TAZ protein in Calp6+ and Calp6 shRNA 143B cells.



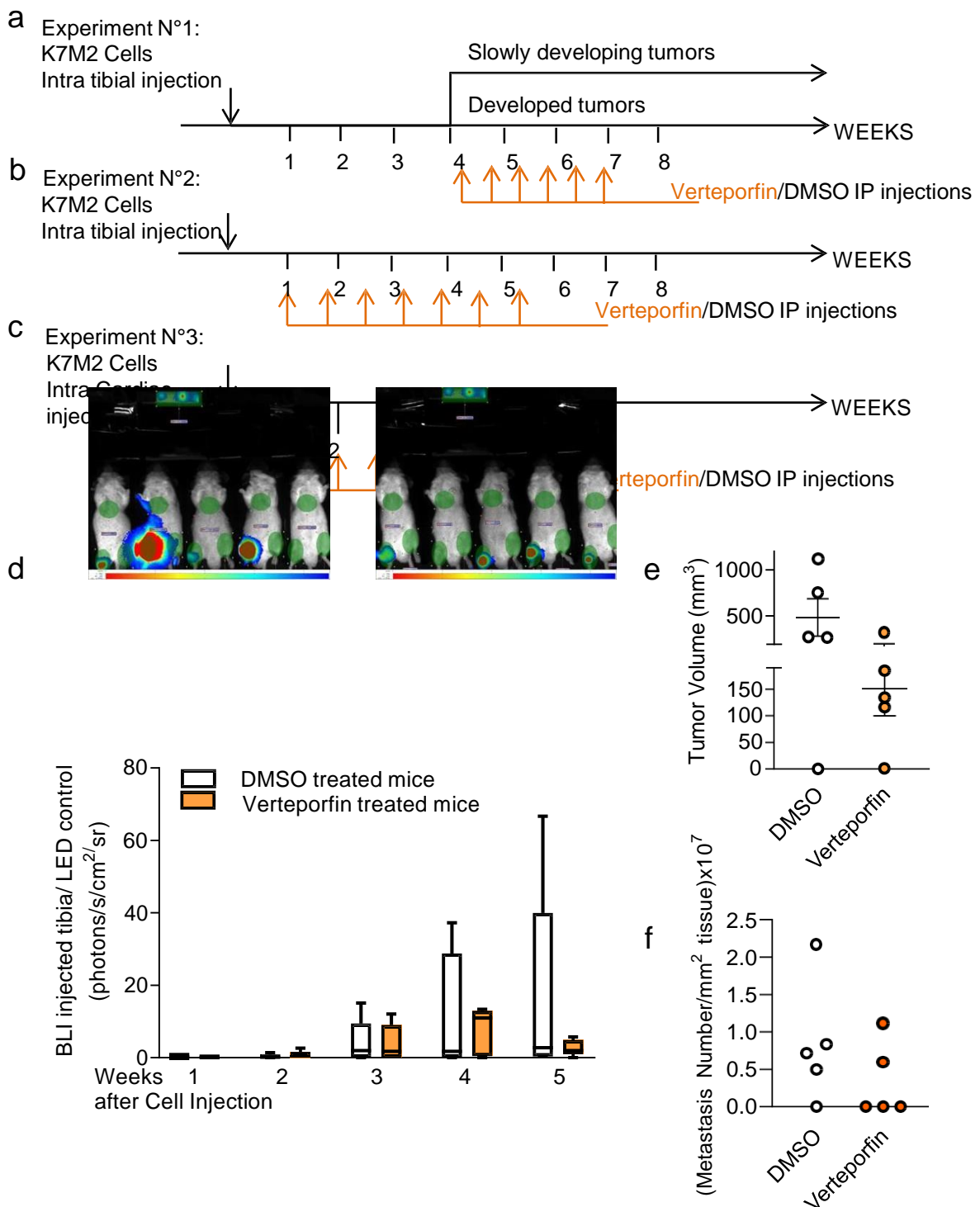
Supplementary Figure 4: **Calpain-6 was associated with YAP expression in metastases of osteosarcoma patients.** a, b, c, Immunofluorescence of Calpain-6 (green) and YAP (red) in sections of paraffin-embedded lung metastasis from 3 different patients. Dapi served to stain the nucleus of cells (blue).d, Rabbit and mouse Ig were used to control immunolabeling of calpain-6 and YAP. White bars indicate 50 μm.



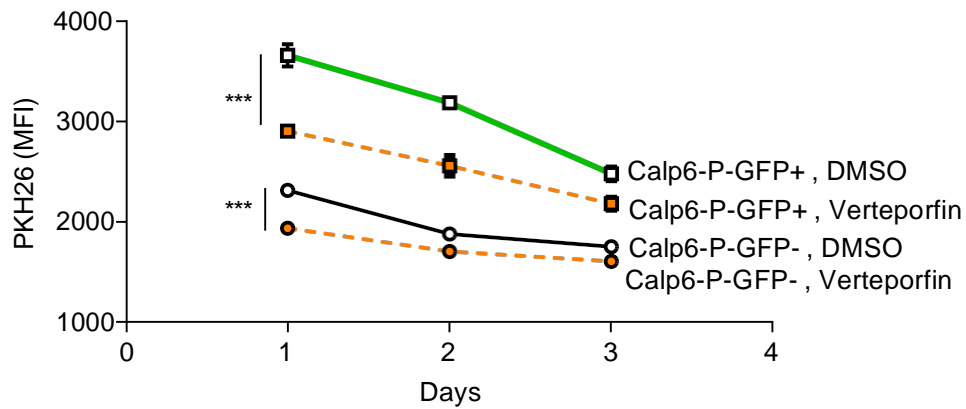
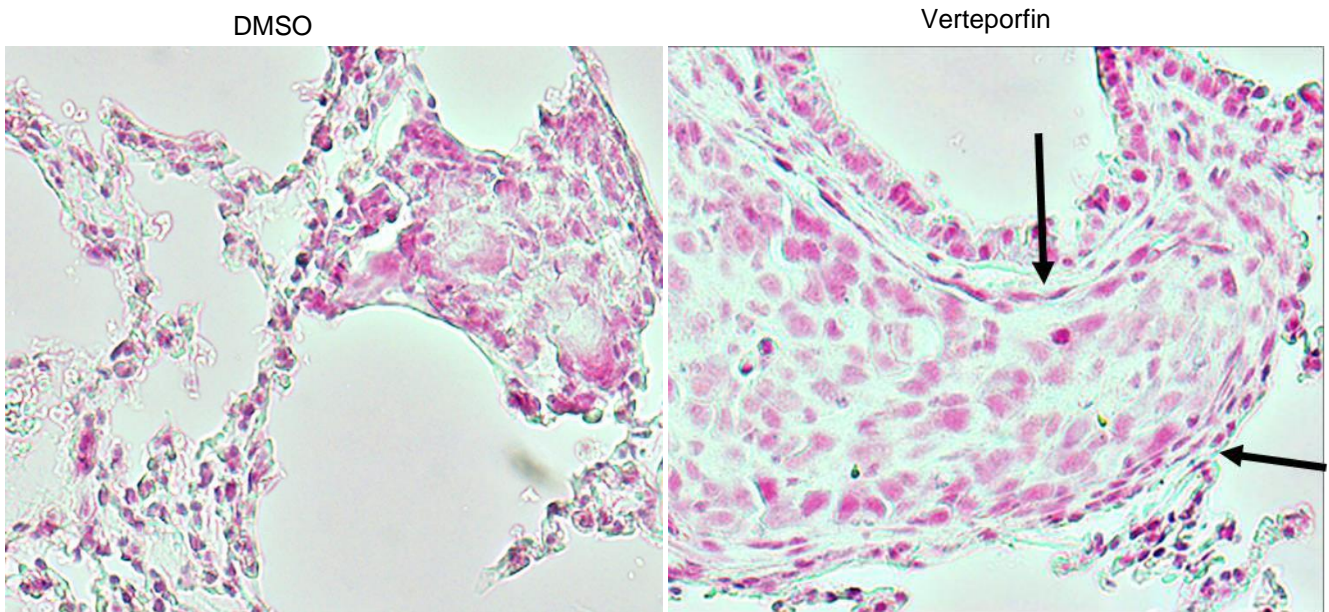
Supplementary Figure 5: **Calpain-6 was not associated with the Cordenonsi_YAP_Conserved_Signature in sarcoma tissues.** **a, b**, Expression of calpain-6 in 88 bone (Target_OS) and 265 soft tissue (TCGA_Sarc) sarcomas. Transcriptomic data were extracted from The Cancer Genome Atlas data base. The tumors were ranked according the expression of calpain-6 gene (CAPN6) expressed as FPKM (Fragments per kilobase of exon per million reads mapped). **c, d**, Gene set enrichment analyses of the Cordenonsi_YAP_Conserved_Signature in bone and soft tissue sarcomas.



Supplementary Figure 6: **Genes involved in DNA repair were up-regulated in calpain-6-expressing osteosarcoma cells and sarcoma tissues.** **a, b, c,** Gene set enrichment analyses using the HALLMARK_DNA_REPAIR gene set in Calp6-P-GFP+ compared to Calp6 shRNA 143B cells and in bone (Target_OS) and soft tissue (TCGA_Sarc) sarcomas that were sorted according calpain-6 expression. **d,** Differential expression of genes involved in apoptosis comparing Calp6 shRNA to Calp6-P-GFP+ 143B cells. The log₂ Fold Change (FC) of expression for each gene was plot against the $-\log_{10}$ of the p value. The dotted line indicates the threshold $-\log_{10}(p=0,05)$.



Supplementary Figure 7: **YAP inhibition using verteporfin resulted in the prevention of bone tumor outgrowth.** **a, b, c**, Different experiment designs to assess the effects of verteporfin at different steps of tumor growth. **a**, K7M2 cells were implanted into the tibia of mice and the treatment (orange arrows) was started at 4 weeks. The mice were split into 2 groups according to the development of the bone tumor at the onset of the treatment. **b**, K7M2 cells were implanted into the tibia of mice and the treatment (orange arrows) was started at 1 week. **c**, K7M2 cells were injected by intracardiac route and the treatment (orange arrows) was started at day 11. **d-f**, Tumor development in the 10 mice of the experience N°2. Bioluminescence detection 5 weeks after cell implantation. Quantification of the bioluminescence during tumor development. The results are expressed as bioluminescence intensity (BLI). **e**, The volume of the bone tumor 5 weeks after cell implantation. Results are mean tumor volume \pm SEM of 5 mice in each group. **f**, The number of metastatic nodules in lungs 5 weeks after cell implantation.

a**b**

Supplementary Figure 8: **Dual effects of verteporfin on cell and tumor growth.** **a**, Effects of verteporfin on the proliferation of osteosarcoma cell. Membrane of Calp6-P-GFP 143B cells were stained with PKH26 (Day 0). The cells were cultured in the presence of 1 μ M verteporfin or DMSO (eluant). After 1, 2 and 3 days the cells were collected and the residual PKH26 labelling was determined by flow cytometry. The Calp6-P-GFP - and GFP+ cells were sorted for PKH26 fluorescence intensity measurement (MFI). *** indicate significant differences between the slopes of PKH26 decrease in DMSO vs verteporfin treated cells $p < 0,001$. **b**, H&E staining of sections of metastases in lungs of DMSO vs verteporfin-treated mice. The arrows show inflammatory cells around the nodules.

1-3- Discussion

Au cours de cette étude, **nous nous sommes intéressés aux rôles des cellules souches d'ostéosarcome (OSCs) dans la progression des tumeurs et le développement métastatique.** Plusieurs études ont montré qu'elles sont impliquées dans la résistance aux traitements et dans les récurrences (Honoki 2010; Greco et al. 2014) ; cependant les mécanismes impliqués restent encore mal connus. Andrique et al, ont précédemment montré que la calpaïne-6 identifie des cellules d'ostéosarcome à la tête de la hiérarchie cellulaire et possédant des capacités d'initiation de tumeur (Andrique et al. 2018). **Nous avons confirmé dans notre modèle de tumeur osseuse, les capacités tumorigènes des cellules exprimant la calpaïne-6 (OSC^{calp6}).** En plus d'être un marqueur de cellules souches, la calpaïne-6 régule le destin des cellules et a des fonctions particulières dans la progression maligne des tumeurs (Andrique et al. 2018; Marion et al. 2012). La calpaïne-6 apparaît donc comme une cible thérapeutique potentielle.

Notre étude a permis de mettre en évidence dans les cellules souches d'OS, un nouvel axe calpaïne-6/YAP activé durant les étapes précoces des développements tumoral et métastatique.

Premièrement, nous avons effectué une **analyse transcriptomique par RNAseq** (Integrage, Ivry) pour comparer le transcriptome de cellules humaines d'ostéosarcome (143B) qui expriment ou non la calpaïne-6. Contrairement à l'analyse de tumeurs dans lesquels les cellules tumorales et spécifiquement les cellules souches se retrouvent « noyées » dans un tissu complexe, l'analyse des ARNs des cellules permet de déterminer des mécanismes intrinsèques aux cellules souches par rapport aux autres cellules cancéreuses. Ainsi, **l'analyse transcriptomique** a permis dans un premier temps de **valider notre modèle cellulaire** en confirmant les différentes associations de la calpaïne-6 précédemment mis en évidence dans divers types cellulaires. Il s'agit de la régulation du cytosquelette (Tonami et al. 2007), l'épissage des ARNs (Miyazaki et al. 2016) , l'endocytose et la localisation des organites (M. Oh et al. 2019) et l'autophagie (Andrique et al. 2018).

Concernant les mécanismes, nous avons montré que la calpaïne-6 stabilise YAP en modulant la signalisation HIPPO et le trafic du complexe de dégradation β -caténine. Cette régulation

par la calpaïne-6 passe par la régulation des processus précédemment cités (Tonami et al. 2007; Miyazaki et al. 2016; M. Oh et al. 2019; Andrique et al. 2018). Ainsi **notre étude a révélé une nouvelle fonction de la calpaïne-6 comme un biomarqueur « clé » dans le contrôle des signalisations dépendantes du cytosquelette** comme les voies de signalisation Rho GTPase, Wnt et Hippo. En utilisant des shARNs, nous avons montré que l'inhibition de la calpaïne-6 impacte l'expression de gènes codant pour des cadhérines comme CDH2 et CDH11 ; ce qui suggère que **la calpaïne-6 pourrait aussi réguler la signalisation HIPPO et l'activité transcriptionnelle de YAP en modulant l'interaction cellule-cellules des OSCs comme cela a été montré dans les carcinomes** (Er et al. 2018). D'autre part, nos résultats ont montré que la calpaïne-6 augmente l'activité de YAP indépendamment des propriétés physiques de l'environnement. Par rapport aux autres cellules tumorales, les OSCs ont donc des avantages intrinsèques pour promouvoir les activités de YAP quel que soit l'environnement physique.

Les données transcriptomiques ont montré que la régulation de YAP par la calpaïne-6 était restreinte aux phases G2M du cycle cellulaire. Ainsi, l'axe calpaïne-6/YAP contrôle l'expression de gènes mitotiques impliqués dans la progression tumorale et les métastases tels que CENPF, TOP2A and ECT2 (Q. Tao et al. 2021; Huang et al. 2021). Cependant, dans les cohortes de patients avec des sarcomes moux ou osseux, nous n'avons pas pu mettre en évidence de corrélation entre la calpaïne-6, les gènes mitotiques et le devenir des patients. Ce résultat n'est pas surprenant car nous avons montré que les OSC^{calp6} sont essentiellement présentes aux étapes précoces des développements tumoral et métastatique. Dans les tumeurs déjà formées et les métastases développées (ce que nous retrouvons dans les cohortes), la population tumorale est majoritairement composée de cellules sans calpaïne-6. **Nous avons donc mis en évidence un axe Calpaïne-6/YAP restreint à la phase G2M du cycle cellulaire qui promeut la transcription de gène mitotiques et impliqué dans l'initiation des tumeurs, des métastases et potentiellement dans le « réveil » des récidives.**

Des études précédentes ont montré que la calpaïne-6 est associée à la chimiorésistance dans les OS (Marion et al. 2012). Notre analyse transcriptionnelle a révélé une association entre la calpaïne-6 et les gènes de réparation de l'ADN ; indiquant ainsi un mécanisme d'action potentiel par lequel la calpaïne-6 serait impliquée dans la résistance des OS aux différents traitements.

Enfin, **notre modèle métastatique** consistant en l'injection intracardiaque de cellules tumorales a **permis de mettre en évidence l'implication des OSC^{calp6} dans les étapes précoces du développement métastatique**. D'autre part, l'utilisation de la verteporfine comme agent inhibiteur de l'axe calpaïne-6/YAP a permis de mettre en évidence **un rôle double de YAP durant la progression de la maladie**. Dans les étapes initiales du développement tumoral, l'inhibition de YAP par la verteporfine a entraîné la mort des cellules tumorales notamment des CSs. A ce stade, la verteporfine a eu un effet anti-tumoral. Dans les tumeurs déjà formées, le traitement par la verteporfine a augmenté la taille et le nombre des métastases. Nos résultats confirment donc le fait que YAP agit différemment entre des cellules souches et des cellules plus différenciées (X. Cao et al. 2020; X. Zhang et al. 2018). D'autre part, nos résultats ont montré que la verteporfine peut agir directement sur le tissu hôte. X et al, ont montré que YAP contrôle la résolution de l'inflammation dans les poumons(L. Liu et al. 2020). Ainsi, nous avons montré que **dans un contexte inflammatoire (tumeurs et métastases développées), la verteporfine stimule l'inflammation associée à la tumeur promouvant ainsi la prolifération des cellules tumorales. Au vu de nos résultats, l'axe calpaïne-6/YAP pourrait être impliqué dans l'excroissance des métastases et dans le « réveil » des récidives.**

2- Discussion Générale Et Résultats Complémentaires



Discussion Générale et Résultats Complémentaires

La progression des ostéosarcomes est associée à un développement métastatique le plus souvent au niveau des poumons (PosthumaDeBoer et al. 2011). 1 patient sur 5 présente au diagnostic des métastases « détectables » tandis que la majorité rechute à plus ou moins long terme, probablement à la suite d'un traitement. La présence des métastases ou d'une maladie résiduelle diminuent fortement la survie des patients (Lindsey, Markel, et Kleinerman 2017) avec un taux de survie à 5 ans inférieur à 30% depuis des décennies et un nombre de cas qui ne diminue pas à ce jour. Les métastases sont résistantes aux traitements actuels (Z. Liu et al. 2020; Macherey et al. 2017) ; il est donc impératif de mieux comprendre la biologie des métastases pour les cibler de manière efficace et améliorer le devenir des patients.

Des analyses histologiques ont montré que la plupart des métastases des OS partagent le même paysage ostéoblastique ou chondroblastique avec les tumeurs correspondantes tandis qu'une minorité présente un paysage cellulaire totalement différent (Jambhekar et al. 2011). Cela indique que les métastases des OS peuvent se former précocement ou tardivement au cours de l'évolution de la tumeur primaire ; avec une augmentation des mutations et des modifications de la chromatine. Il est établi que les cellules souches des sarcomes osseux participent à la malignité des tumeurs, à l'établissement des métastases et à leur chimiorésistance (Andrique et al. 2018; Schiavone et al. 2019). Toutefois, les conditions permettant l'acquisition du caractère malin des cellules des OS et la colonisation d'un site secondaire sont mal connues.

Des résultats précédents du laboratoire ont montré que les cellules souches d'OS exprimant la calpaïne-6 (OSC^{Calp6}) avaient des capacités initiatrices de tumeurs et qu'elles pourraient participer à la formation des métastases pulmonaires. Le but de notre étude était de mieux caractériser les OSCs et de comprendre leur implication dans le processus métastatique et les mécanismes impliqués en utilisant la calpaïne-6 comme biomarqueur. Le système rapporteur Calp6-P-GFP décrit précédemment, nous a permis de suivre les OSCs au cours du développement métastatique chez la souris. Nos études précédentes ont montré que la l'inhibition de la calpaïne-6 dans les cellules d'ostéosarcome suffisait à abolir les capacités tumorigéniques de différentes lignées humaines et murine (Andrique et al. 2018). Nous avons

donc comparé les transcriptomes de cellules exprimant un niveau de base de calpaïne-6 ou une surexpression de la calpaïne-6 avec celui de cellules dans lesquelles l'expression de la calpaïne-6 est inhibée grâce à des shARNs spécifiques.

2-1- Les OSCs qui expriment la calpaïne-6 sont des cellules initiatrices de métastases

Au cours d'une étude précédente du laboratoire les stades très précoces du développement tumoral avaient été mimés en injectant une petite quantité de cellules d'ostéosarcome murin K7M2 dans le tibia de souris immunocompétentes. Trois mois après l'injection, seulement les souris ayant reçu des OSC^{Calp6} avaient dans les poumons des cellules tumorales que l'on pouvait faire croître en les remettant en culture. Ici, pour déterminer à quelles étapes de la formation des métastases les OSC^{Calp6} sont impliquées, nous avons utilisé un modèle de développement métastatique consistant à injecter des cellules d'ostéosarcome dans la circulation. Dans le modèle d'implantation orthotopique, toutes les souris injectées ne développent pas de nodule pulmonaire et le rythme de développement est extrêmement variable d'une souris à l'autre. En revanche, l'injection de cellules tumorales dans la circulation résulte en un envahissement massif des poumons dans 90% des souris en 5 à 6 semaines. **Ce modèle de dissémination permet donc plus facilement de suivre les différentes étapes du développement métastatique.** Grâce à ce système nous avons montré que les micro-métastases pulmonaires étaient essentiellement composées de cellules exprimant la calpaïne-6. **Ainsi l'ensemble des résultats suggère que les OSC^{Calp6} sont des cellules initiatrices de métastases.** Mais les données présentées ne permettent pas de déterminer si seules les OSC^{Calp6} ont la capacité de sortir de la tumeur et/ou de survivre dans la circulation et/ou de coloniser les poumons. Tonami a montré que la calpaïne-6 pouvait moduler la mobilité de fibroblastes immortalisés en régulant des petites GTPases Rac1 et RhoA (Tonami et al., 2011). Pour déterminer si la calpaïne-6 pouvait également contrôler la migration des cellules d'ostéosarcome nous avons examiné les capacités migratoires de lignées de cellules humaines d'ostéosarcome surexprimant la calpaïne-6 (Calp6+), des cellules Calp6-P-GFP+ et GFP-, nous

avons également déterminer les effets de la suppression de la calpaïne-6 par des shRNA (Calp6 shRNA). Pour cela nous avons utilisé le système de « wound scratch healing » et du « time-laps » (Figure 21).

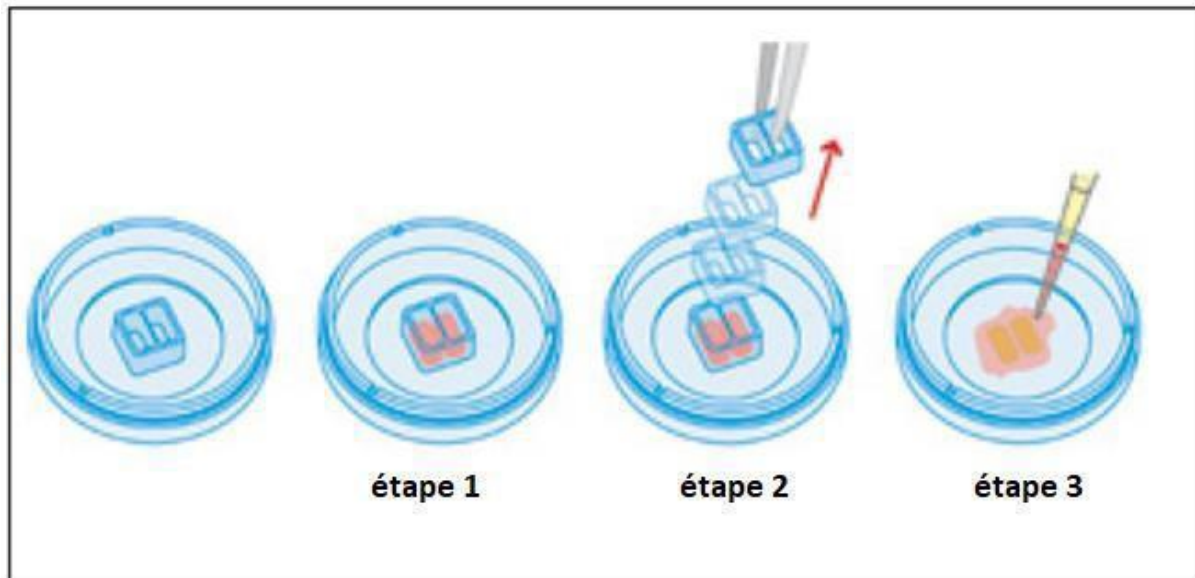


Figure 21 : Schématisation du dispositif d'inserts

Etape 1 : les cellules sont ensemencées dans chacune des chambres de l'insert à confluence optimale la veille et cultivées overnight. Etape 2 : le lendemain, les inserts sont enlevés et le milieu est changé. Etape 3 : les cellules migrent dans l'espace inter-chambre pendant 6 à 8 heures dans un milieu de culture adéquat.

Contrairement à l'équipe de Tonami, nous avons observé que les cellules 143B Calp6-P-GFP+ triées avaient une efficacité de migration plus importante que les cellules GFP- (Figure 22).

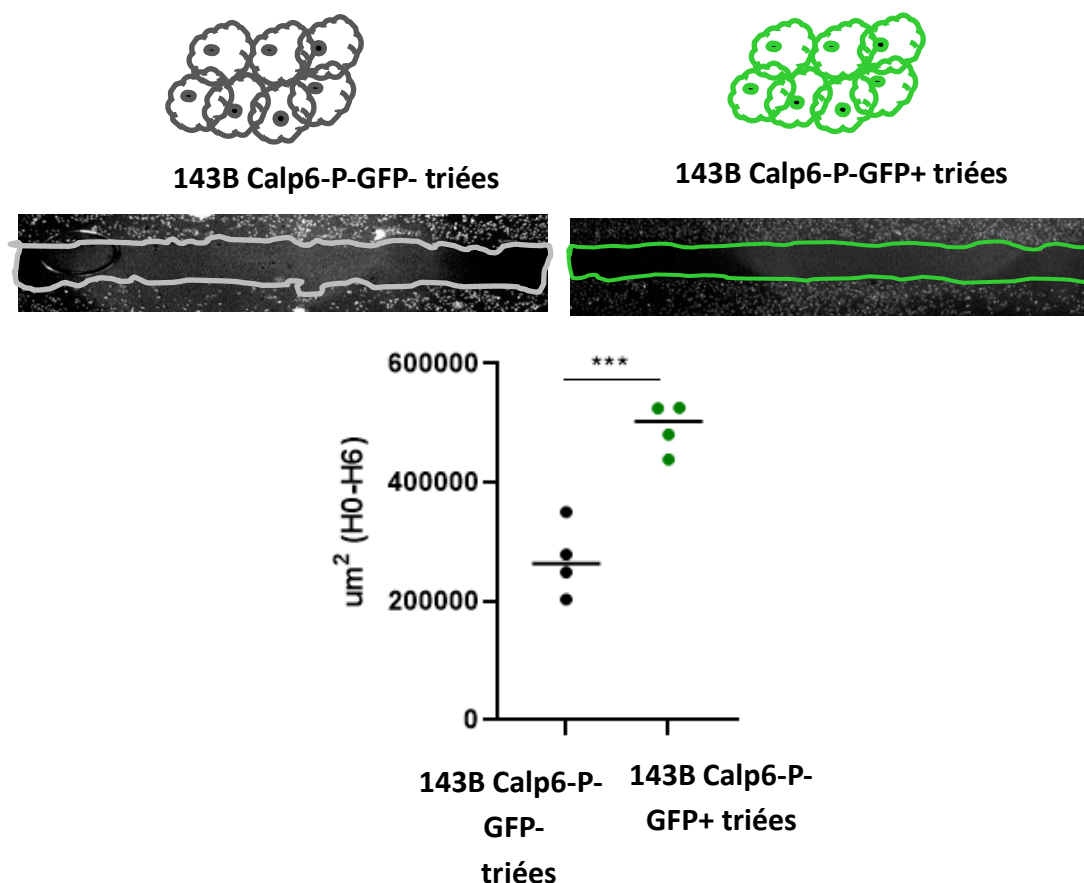


Figure 22 : les cellules Calp6-P-GFP+ ont des capacités migratoires accrues par rapport aux cellules GFP-

Les cellules de la lignée humaine d'OS 143B ont été transfectées avec un système rapporteur dans lequel la GFP membranaire est sous le contrôle du promoteur de la calpaïne-6 (Andrique et al. 2018). Ensuite, les OSC^{calp6} ont été isolées des autres cellules tumorales par cytométrie en flux. Le noyau des cellules a été marqué avec du DAPI. Les surfaces de migration ont été mesurées avant et après 6H de migration grâce au logiciel ImageJ. La surface de migration correspond à la surface de l'espace inter-chambre (cadres gris et vert) au moment du retrait de l'insert (H0) moins la surface inter-chambre après 6 heures de migration cellulaire. Les données sont exprimées en μm^2 . *** $p < 0.001$

Précédemment il avait été montré que la calpaïne-6 est impliquée dans l'organisation du cytosquelette d'actine et dans la stabilité des microtubules (Tonami et al. 2007). Nous avons également observé que le réseau de microtubules est organisé très différemment dans les cellules 143B qui expriment la calpaïne-6 par rapport aux cellules sans calpaïne-6 (Figure 23). L'expression de calpaïne-6 est également associée à une organisation en fibres épaisses de la vimentine suggérant une polymérisation accrue des filaments intermédiaires (Figure 24).

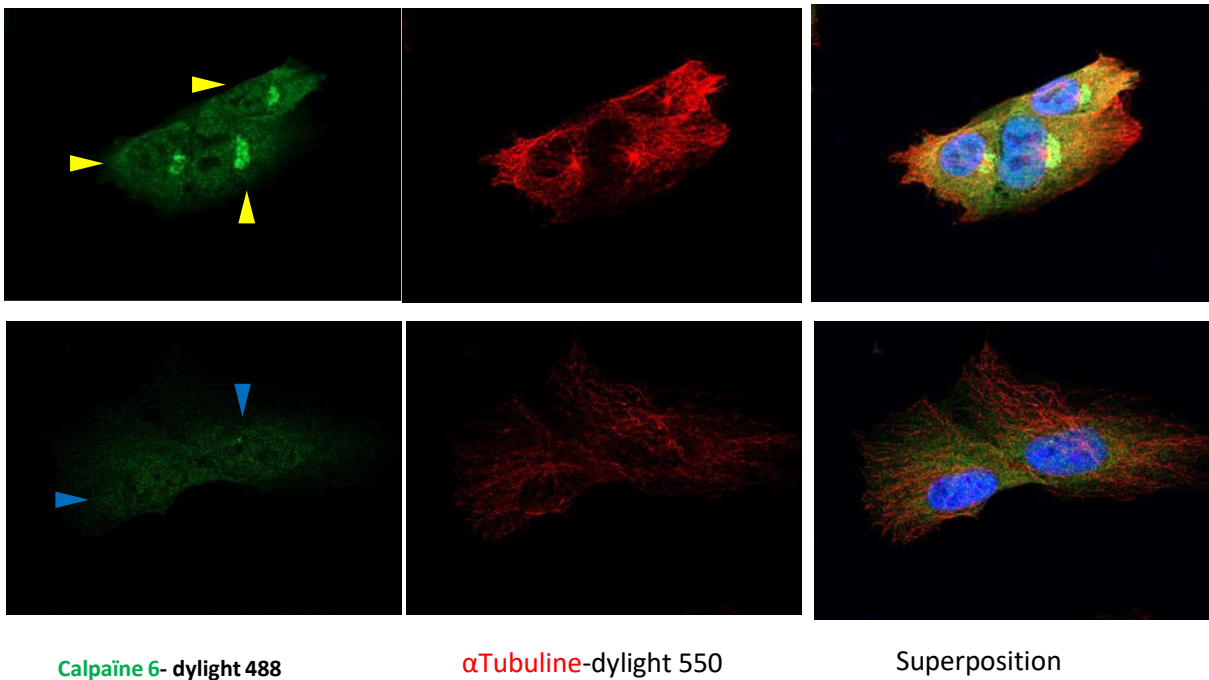


Figure 23: La calpaïne-6 stabilise le réseau de microtubules

Co-marquage par immunofluorescence de la calpaïne-6 et de l'α-tubuline dans une population mixte de 143B. Les cellules qui expriment la calpaïne-6 (flèches jaunes) ont une organisation des microtubules en fibres comparée aux cellules sans calpaïne-6 (flèches bleues).

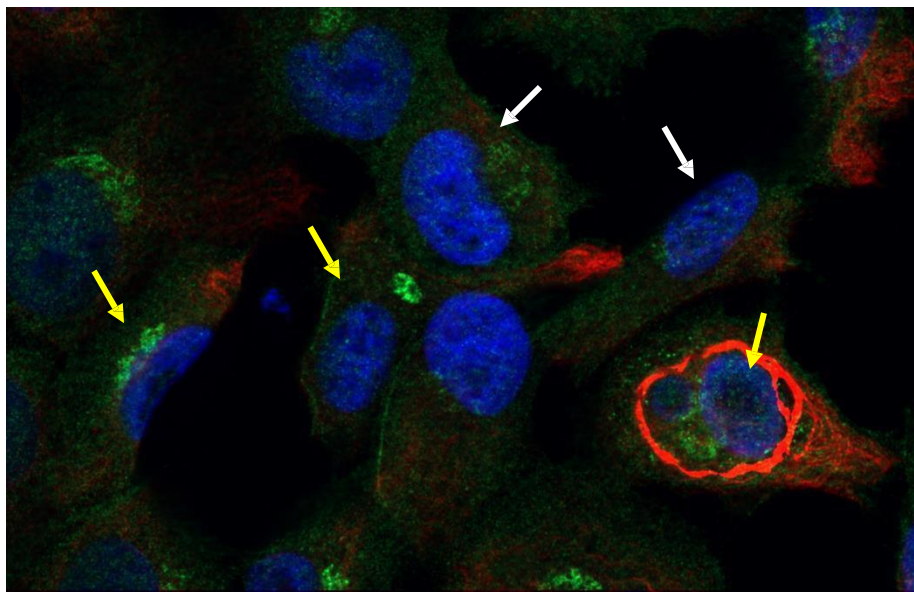


Figure 24 : La calpaïne-6 contrôle l'organisation du réseau de vimentine

Co-marquage par immunofluorescence de la calpaïne-6 et de la vimentine dans une population mixte de 143B. Les cellules qui expriment la calpaïne-6 (flèches jaunes) ont une organisation de la vimentine au niveau des pseudopodes comparé aux cellules sans calpaïne-6 (flèches blanches).

Enfin, La surexpression de la calpaïne-6 dans les cellules d'ostéosarcome a induit des modifications importantes du cytosquelette d'actine. Nous avons observé une absence de fibre de stress (filaments d'actine reliés entre eux par des filaments de myosine et pouvant se contracter) dans ces cellules (Figure 25). Le rôle du cytosquelette dans la mobilité des cellules a été largement décrit par Tang et Gerlach (Tang et Gerlach 2017). Ainsi la calpaïne-6 pourrait contribuer au gain de mobilité des cellules d'ostéosarcome grâce à une action sur différentes composantes du cytosquelette. Il est maintenant admis que les cellules cancéreuses peuvent adopter d'autres modes de migration grâce au phénotype amiboïde qui est associé à une activation de RhoA et qui implique la vimentine (Usman et al. 2021).

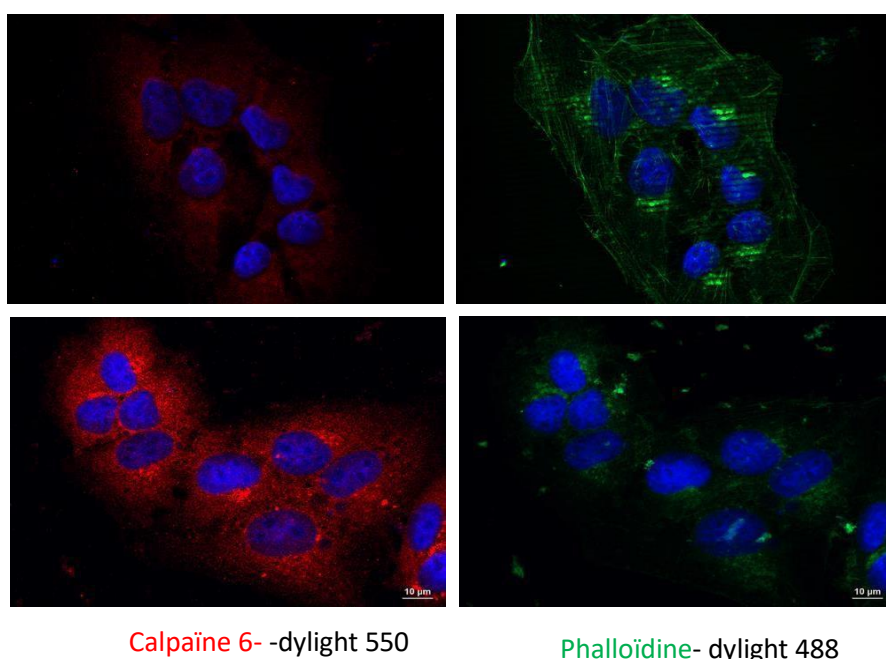


Figure 25 : La calpaïne-6 contrôle l'organisation du réseau d'actine

Co-marquage par immunofluorescence de la calpaïne-6 et de la phalloïdine dans une population sans calpaïne-6 (haut) et une population surexprimant la calpaïne-6 (bas). La surexpression de la calpaïne-6 a supprimé l'organisation de l'actine en fibres de stress.

Par ailleurs, nous avons montré que des cellules qui surexprimaient la calpaïne-6 (143B Calp6+) migraient plus vite que les cellules sans calpaïne-6 (143B shARN calp6) (Figure 26A). De façon intéressante, non seulement la vitesse de migration mais la trajectoire des cellules étaient affectées par la suppression de la calpaïne-6 (Figure 26B).

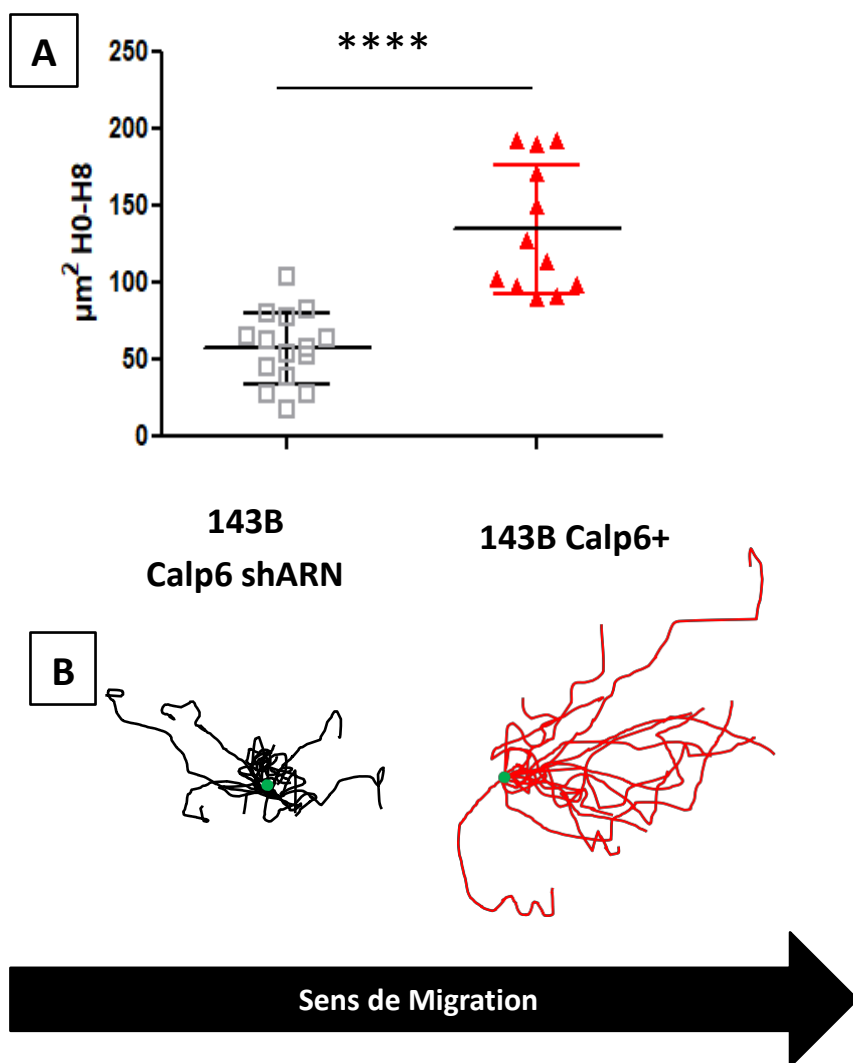


Figure 26 : Les cellules qui surexpriment la calpaïne-6 migrent plus vite et de manière ordonnée par rapport aux cellules sans calpaïne-6

Pour étudier les fonctions de la calpaïne-6, les cellules ont été infectées avec un lentivirus pour surexprimer de façon stable la calpaïne-6 (143B calp6+) ou avec un shARN pour inhiber l'expression de la calpaïne-6 (143B calp6 shARN). **A** : Mesure de la surface de migration. La surface de migration correspond à la surface de l'espace inter-chambre au moment du retrait de l'insert (HO) moins la surface inter-chambre après 8 heures de migration cellulaire. Les données sont exprimées en μm^2 . **** $p < 0.0001$ **B** : Le trajet des cellules a été suivi par vidéomicroscopie. Chaque trait correspond au trajet d'une cellule parcouru pendant 8H. Les points de départ des différentes cellules ont été superposés (point vert).

Pourtant la distance parcourue et la trajectoire des cellules GFP+ et GFP- au sein d'une même population étaient identiques (Figure 27).

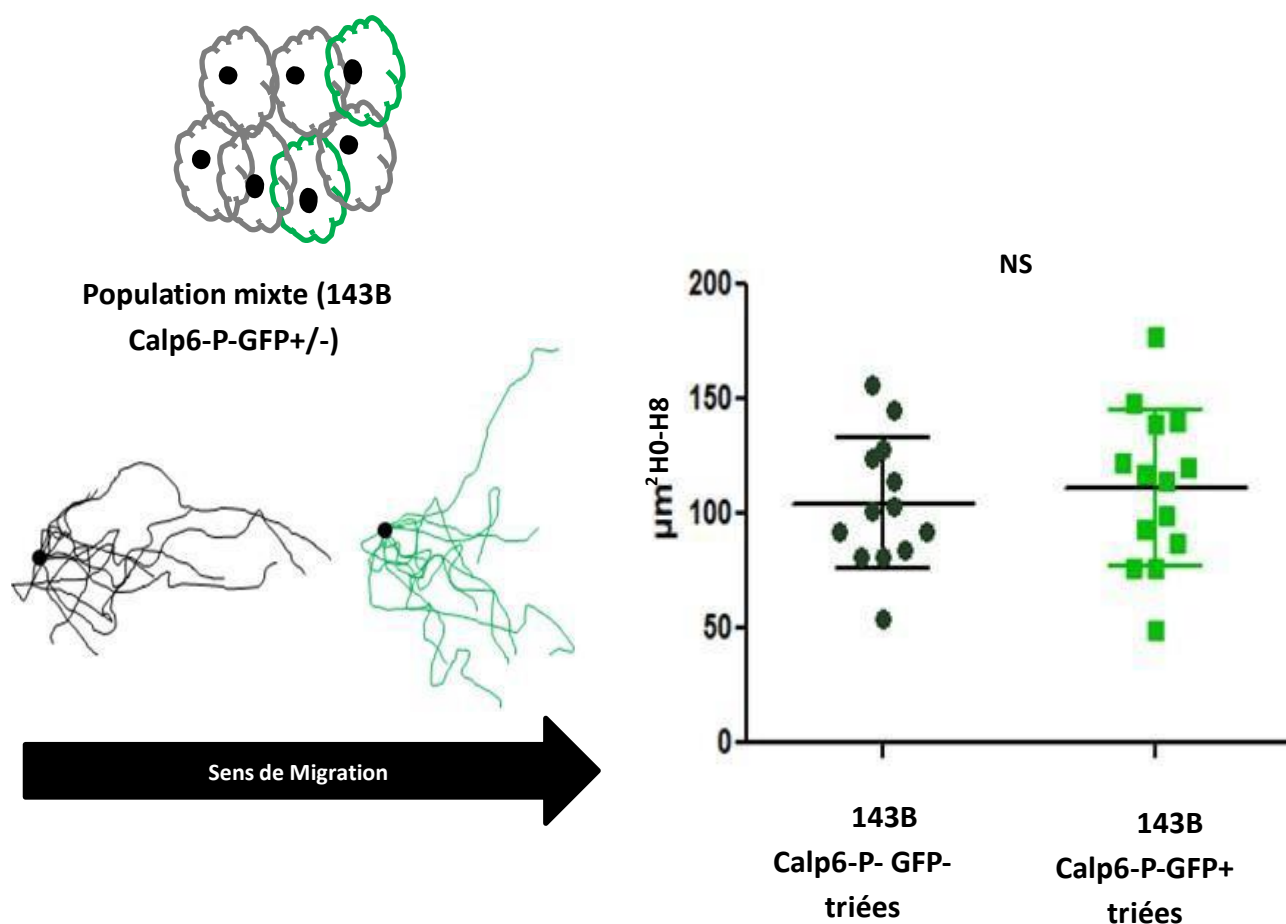


Figure 27 : La co-culture des cellules avec ou sans la calpaïne-6 abolit le défaut de migration des cellules GFP-

La migration de cellules GFP+ (n=14) ou GFP- (n=13) a été suivie au sein d'une population mixte par vidéomicroscopie. Chaque trait correspond au trajet d'une cellule parcouru pendant 8H (gauche). Les points de départ des différentes cellules ont été superposés (point noire). La migration a été mesurée (droite). La surface de migration correspond à la surface de l'espace inter-chambre au moment du retrait de l'insert (H0) moins la surface inter-chambre après 8 heures de migration cellulaire. Les données sont exprimées en μm^2 . NS : résultats non significatifs

D'autres expériences ont confirmé que la capacité migratoire de populations cellulaires mixtes (143B et U2OS) était réduite quand l'expression de la calpaïne-6 avait été supprimée (Figure 28). Cela suggèrait que les OSC^{Calp6} peuvent promouvoir la migration d'autres populations tumorales.

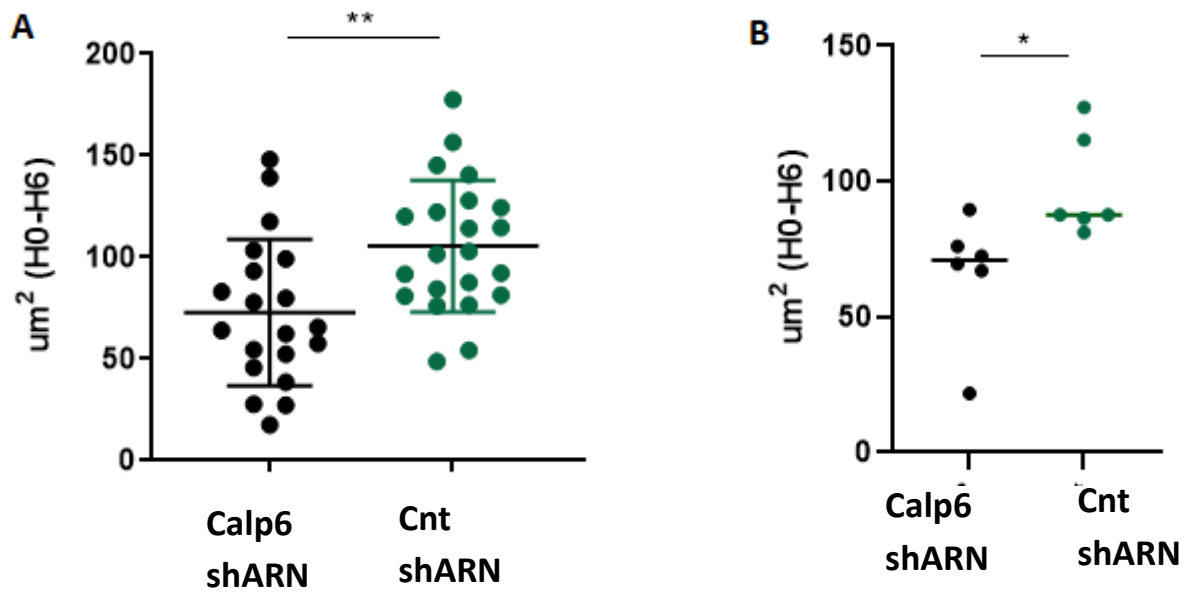


Figure 28 : les populations cellulaires dépourvues de cellules qui expriment la calpaïne-6 ont des capacités migratoires réduites

Les capacités des populations mixtes 143B (A) et U2OS (B) ont été comparées avec des populations sans cellules qui expriment la calpaïne-6. Les surfaces de migration ont été mesurées avant et après 6H de migration grâce au logiciel ImageJ. Les données sont exprimées en μm^2 et représentent la différence entre la surface de l'inter-chambre à H0 et H6. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

Nous avons donc déterminé les effets de milieux conditionnés sur une population cellulaire mixte sur la migration de cellules Calp6 shRNA. Ces surnageants étaient capables d'augmenter les capacités migratoires des cellules Calp6 shRNA (Figure 29). **Cela confirme que les OSCs jouent un rôle paracrine pour contrôler la migration de l'ensemble des cellules tumorales.**

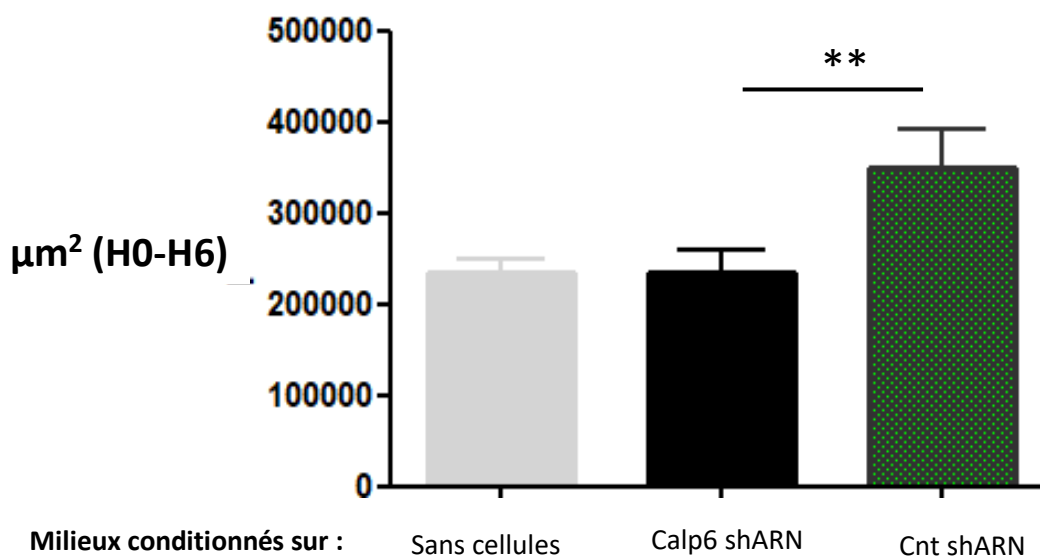


Figure 29 : Les capacités migratoires des cellules sans calpaïne-6 sont améliorées par des facteurs produits par les cellules exprimant la calpaïne-6.

Les cellules 143B Calp6 shARN ont été ensemencées dans du milieu DMEM 10% SVF et cultivées overnight. Une fois les inserts retirés, les cellules ont migré pendant 6 heures soit dans un milieu DMEM 0% FCS conditionné sur le plastique sans cellule, soit dans un milieu DMEM 0% FCS conditionné sur des cellules 143B calp6 shARN, soit dans un milieu DMEM 0% FCS conditionné sur une population mixte (143B). Les données sont exprimées en μm^2 . ** $p < 0.01$

La chloroquine un agent qui bloque le trafic vésiculaire et donc la production de micro-vésicules a permis de réduire les effets positifs du milieu conditionné sur une population mixte sur la migration des cellules Calp6 shRNA (Figure 29). **La calpaïne-6 dans les OSCs régule donc la communication avec les autres cellules tumorales par l'intermédiaire de micro-vésicules** et les OSC sont ainsi responsables de la promotion et la coordination de la migration des autres cellules tumorales. **Les OSC^{Calp6} pourraient donc influencer les capacités métastatiques des cellules d'une tumeur.**

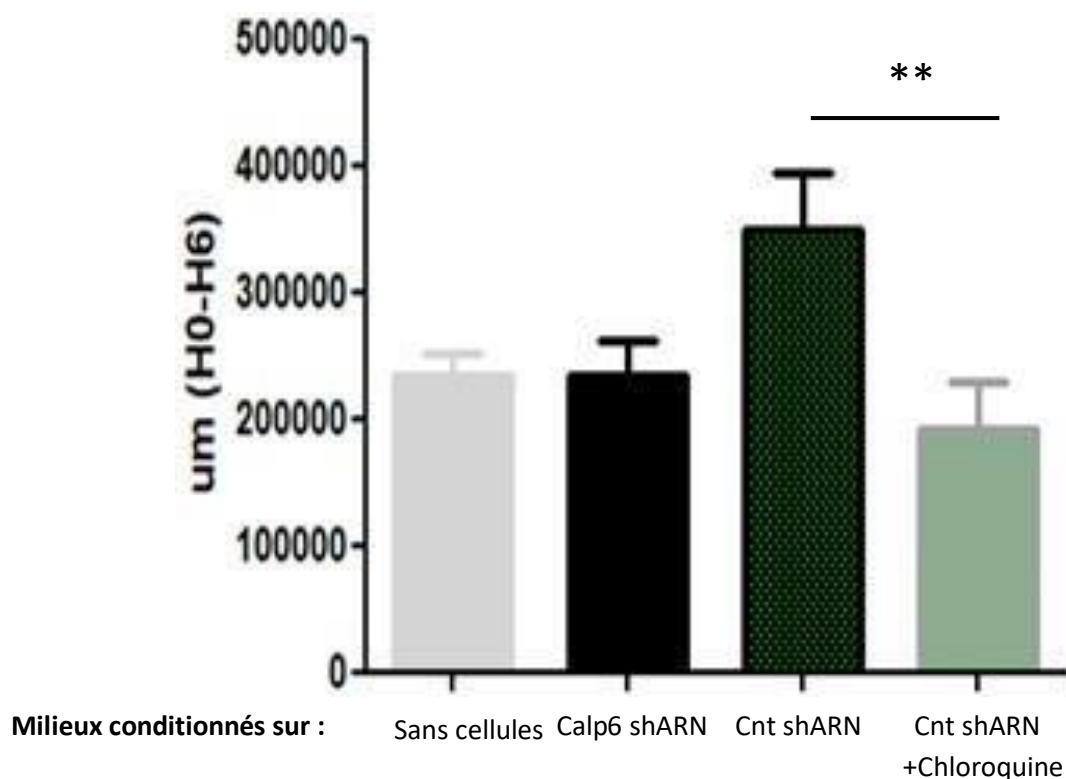


Figure 30 : La calpaïne-6 promeut la migration des cellules sans calpaïne-6 en régulant la communication cellulaire par l'intermédiaire de micro-vésicules

Les cellules 143B Calp6 shARN ont été ensemencées dans du milieu DMEM 10% SVF overnight. Une fois les inserts retirés, les cellules ont migré pendant 6 heures dans 1 : un milieu DMEM 0% sans cellule ; 2 : un milieu DMEM 0% conditionné sur des cellules 143B calp6 shARN ; 3 : un milieu DMEM 0% conditionné sur une population mixte (143B) et 4 : un milieu DMEM 0% conditionné sur une population mixte + chloroquine à 1µM. Les données sont exprimées en μm^2 . ** $p < 0.01$

Cependant, l'expression de la calpaïne-6 ne semble pas être indispensable à la colonisation des poumons. En effet, nous avons injecté des cellules triées Calp6-P-GFP+ ou GFP- dans la veine de la queue de la souris (IV) et nous avons observé que des cellules GFP- pouvaient s'installer dans les poumons. Pourtant, les cellules tumorales dans les lésions formées à partir des cellules GFP-, exprimaient de nouveau la GFP dans le poumon. **L'expression de la calpaïne-6 pourrait donc être nécessaire pour promouvoir la sortie des cellules de la tumeur primaire et pour la croissance des lésions pulmonaires.** D'autre part, ces résultats suggèrent que **les cellules Calp6-P-GFP- peuvent à un moment de leur cycle, exprimer la calpaïne-6.**

Il existe peu de données transcriptomiques qui pourraient nous apporter des informations sur l'expression de la calpaïne-6 au cours du développement métastatique chez les patients. Nous avons récupéré les données de l'étude GSE87686 sur le site Gene Expression omnibus (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>). Il s'agit d'un profilage par séquençage d'ARN purifiés à

partir de tumeurs osseuses ou de tissus métastatiques. Quatre sur 9 tissus métastatiques expriment de la calpaïne-6 soit 44% alors que seulement 17% des tumeurs osseuses ont une valeur de FPKM>1.5 (limite considérée au-dessus du bruit de fond) (Figure 31).

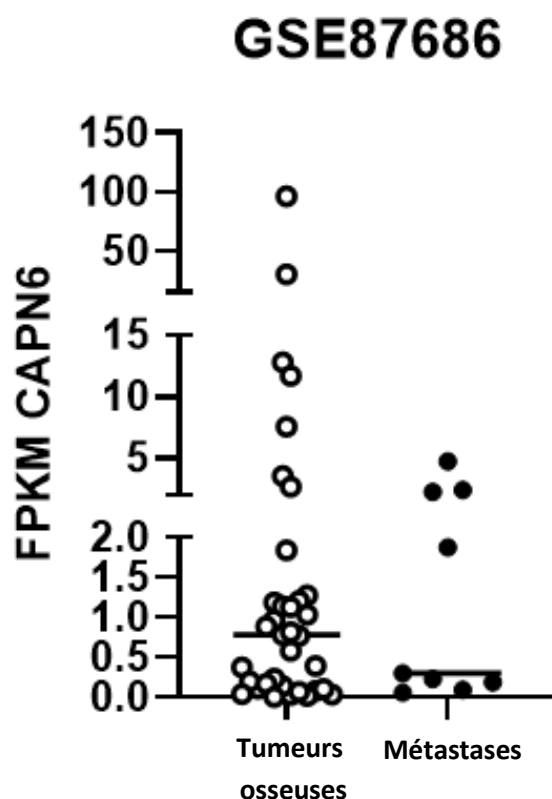


Figure 31 : Expression transcriptomique de la Calpaïne-6 dans des tumeurs osseuses et des tissus métastatiques de patients

Profilage par séquençage d'ARN purifiés à partir de tumeurs osseuses ou de tissus métastatiques de la cohorte GSE87686. Les données ont été prises sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>. Les résultats sont exprimés en Fragment per kilobase of exon per million reads mapped (FPKM).

Etant donné les faibles effectifs il est difficile de conclure à une vraie différence d'expression de la calpaïne-6 dans les métastases et les tumeurs. Il faudrait également avoir des renseignements plus précis sur l'état d'évolution des métastases dont sont issus les ARNs utilisés pour le séquençage.

Pour notre étude in vivo, nous avons utilisé la lignée de cellules K7M2 qui a été sélectionnée à partir de métastases pulmonaires d'une souris Balb/c qui avait développé un ostéosarcome spontané (Khanna et al. 2000; 2001). On peut donc s'interroger sur le fait que cette population

ne représente qu'un clône de cellules particulièrement agressives alors que d'autres travaux ont montré un ensemencement polyclonal des poumons dans un modèle différent d'ostéosarcome chez la souris et aussi chez les patients (Gambera et al. 2018; D. Wang et al. 2019; Y. Zhou et al. 2020). Nous ne pouvons pas exclure que l'initiation de métastases dépendante des OSC^{Calp6} soit propre au clône de cellules K7M2. Pour déterminer s'il s'agit un mécanisme commun à différents clônes métastatiques, il faudrait utiliser d'autres modèles syngéniques d'ostéosarcome ou avoir accès à des prélèvements de micro-métastases issus de patients. En revanche, le lien entre la calpaïne-6 et l'activité du facteur YAP a été mis en évidence à la fois dans les cellules et dans diverses tumeurs humaines.

2-2- La calpaïne-6 module la voie hippo et stabilise YAP

L'analyse transcriptomique des cellules 143B a montré que la suppression de la calpaïne-6 induit des altérations importantes des gènes impliqués dans la voie Hippo, notamment une diminution de NF2 et MOB1A. NF2 code pour la protéine Merlin qui est un régulateur de la prolifération cellulaire par contact cellule-cellule et un gène suppresseur de tumeur dans de nombreux cancers (Mota et Shevde 2020; Morrow et al. 2011; Shah et al. 2014) via l'activation de la voie canonique WNT/ β -caténine (Morrow et al. 2016). Dans les cancers, les protéines MOB stimulent la mitose et la progression des cellules dans le cycle cellulaire (Gundogdu et Hergovich 2019). Les protéines MOB sont aussi impliquées dans l'activation des voies de réponses aux dommages à l'ADN et dans la coordination de l'autophagie sélective. Au contraire, L'expression de calpaïne-6 est associée à une augmentation des gènes cibles de YAP comme la Serpine1 et CCN2. Cela suggère que les altérations de la voie Hippo induisent une augmentation de l'activité transcriptionnelle de YAP. La Serpine est surexprimée dans de nombreux cancers et son expression est associée à un mauvais pronostic vital (Kwon et al. 2014; Peltier et al. 2016; Calabrese et al. 2012). Dans les OS, il a été montré que CTGCF augmente la résistance au Paclitaxel en stimule l'expression de la survivine (Tsai et al. 2014). De plus, CTGF est impliqué dans la néoangiogenèse et le développement des métastases d'OS (Hou, Yang, et Tsao 2018; L.-H. Wang et al. 2017). Différents mécanismes peuvent influencer la voie Hippo et l'activité des facteurs YAP/TAZ notamment la rigidité de la matrice (Zanconato, Cordenosi, et Piccolo 2019). Cependant, il semble que la calpaïne-6 régule la

voie Hippo indépendamment des propriétés physiques de l'environnement dans les cellules d'ostéosarcome.

2-3- La calpaïne-6 contrôle l'arrêt des cellules en phase G2M

Nos résultats lient clairement l'axe calpaïne-6/YAP à la phase G2/M du cycle cellulaire. Précédemment, Andrique et al, ont montré que les cellules Calp6-P-GFP+ semblaient ralenties en G2/M (Andrique et al. 2018). Ici nous montrons également que l'expression de la calpaïne-6 dans les cellules et les tumeurs est associée à des signatures géniques de réparation de l'ADN. L'arrêt avant la mitose des cellules avec un ADN très altéré et la réparation de cet ADN protège les cellules tumorales de l'apoptose. Il a été montré qu'un des « points de contrôle » de la phase G2, WEE1 permet de stopper le cycle cellulaire jusqu'à ce que l'ADN endommagé soit réparé (Figure 32). Ce facteur est fortement exprimé dans différents cancers et prédit une progression du cancer et un mauvais pronostic (Matheson, Backos, et Reigan 2016).

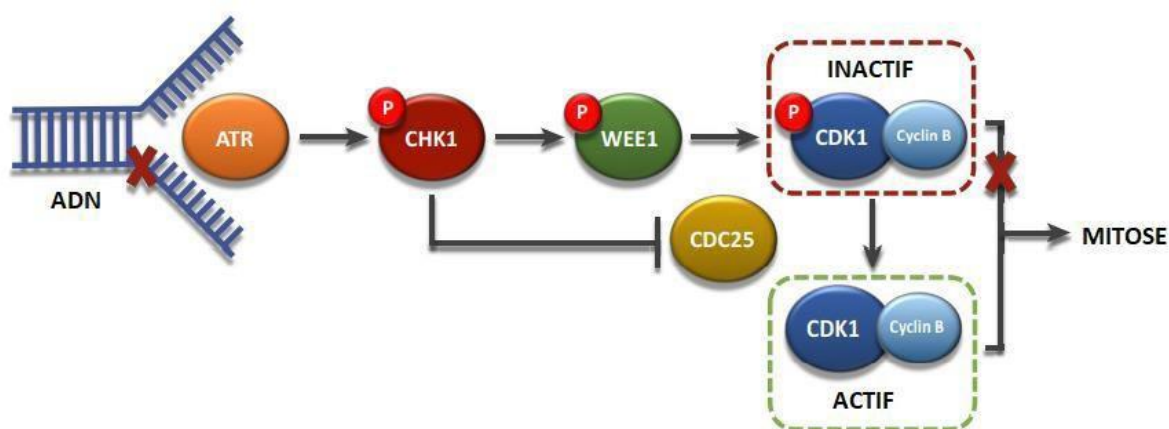


Figure 32 : Représentation schématique du rôle de WEE1 dans le contrôle de la transition G2/M

Les tumeurs dépendent donc souvent du point de contrôle G2/M pour empêcher les cellules d'entrer en mitose avec des dommages excessifs à l'ADN, ce qui peut conduire à l'apoptose par catastrophe mitotique. Au point de contrôle G2-M, les dommages à l'ADN sont détectés par ATR, entraînant l'activation de CHK1, puis de WEE1. WEE1 actif phosphoryle (P) CDK1-cycline B à la tyrosine 15, maintenant le complexe sous une forme inactive et empêchant l'entrée en mitose. Suite à la réparation des dommages à l'ADN, l'activité WEE1 est diminuée, empêchant la phosphorylation inhibitrice de CDK1, et l'effet inhibiteur de CHK1 sur la phosphatase CDC25 est perdu. CDC25 déphosphoryle CDK1-cycline B, générant la forme active du complexe, et la cellule peut alors entrer en mitose. L'abrogation du point de contrôle G2-M est une stratégie anticancéreuse viable en combinaison avec des thérapies endommageant l'ADN. D'après (Matheson, Backos, et Reigan 2016)

WEE1 est l'un des gènes dont l'expression est diminuée dans les cellules Calp6 shRNA par rapport aux cellules Calp6-P-GFP+ (Log2FC = -0.439, $q = 1.1 \cdot 10^{-5}$). Cette protection contre la mort cellulaire liée à la division rapide des cellules tumorales est probablement une caractéristique importante qui différencie les OSC^{Calp6} des autres cellules tumorales et pourraient donner un avantage lors de l'initiation de la métastase. Ces propriétés contribuent aussi certainement aux capacités de chimiorésistance des OSC^{Calp6} qui ont été décrites précédemment (Marion et al. 2012). Différentes études cliniques sont en cours dans lesquelles un inhibiteur de Wee1 est associé à des agents génotoxiques (van Bijsterveldt et al. 2021). Le but est de lever la résistance des cellules tumorales.

2-4- Régulation réciproque de la calpaïne-6 et de l'activité TEAD/YAP

Nous avons montré précédemment que l'expression de la calpaïne-6 était stimulée sous hypoxie dans les cellules d'OS en culture. De plus, la calpaïne-6 est exprimée dans des zones hypoxiques des tumeurs (Andrique et al. 2018). En effet, l'hypoxie stimule l'expression des facteurs de cellules souches comme OCT4 et Nanog qui sont nécessaires à l'expression de la calpaïne-6. Par ailleurs, certaines études suggèrent que l'hypoxie induit une relocalisation de YAP dans le cytoplasme des cellules et peut donc moduler l'activité TEAD (L. Xiang et al. 2015; Kietzmann 2019). Nous avons observé que l'hypoxie réduisait l'activité TEAD dans les cellules 143B (Figure 33A). L'hypoxie diminuait également la stimulation de cette activité par Wnt3a (Figure 33B). Quand les cellules étaient cultivées avec 21% d'O₂, la verteporfine avait tendance à augmenter l'expression de Oct4 et de Nanog (Figures 33D/E) mais l'hypoxie inhibait cet effet inducteur (Figure 33F). Ces résultats suggèrent **qu'il existe une boucle de régulation négative : l'hypoxie induisant l'expression des facteurs de cellules souches et la calpaïne-6 qui à son tour permet la stabilisation de YAP/TAZ et l'augmentation de l'activité TEAD.**

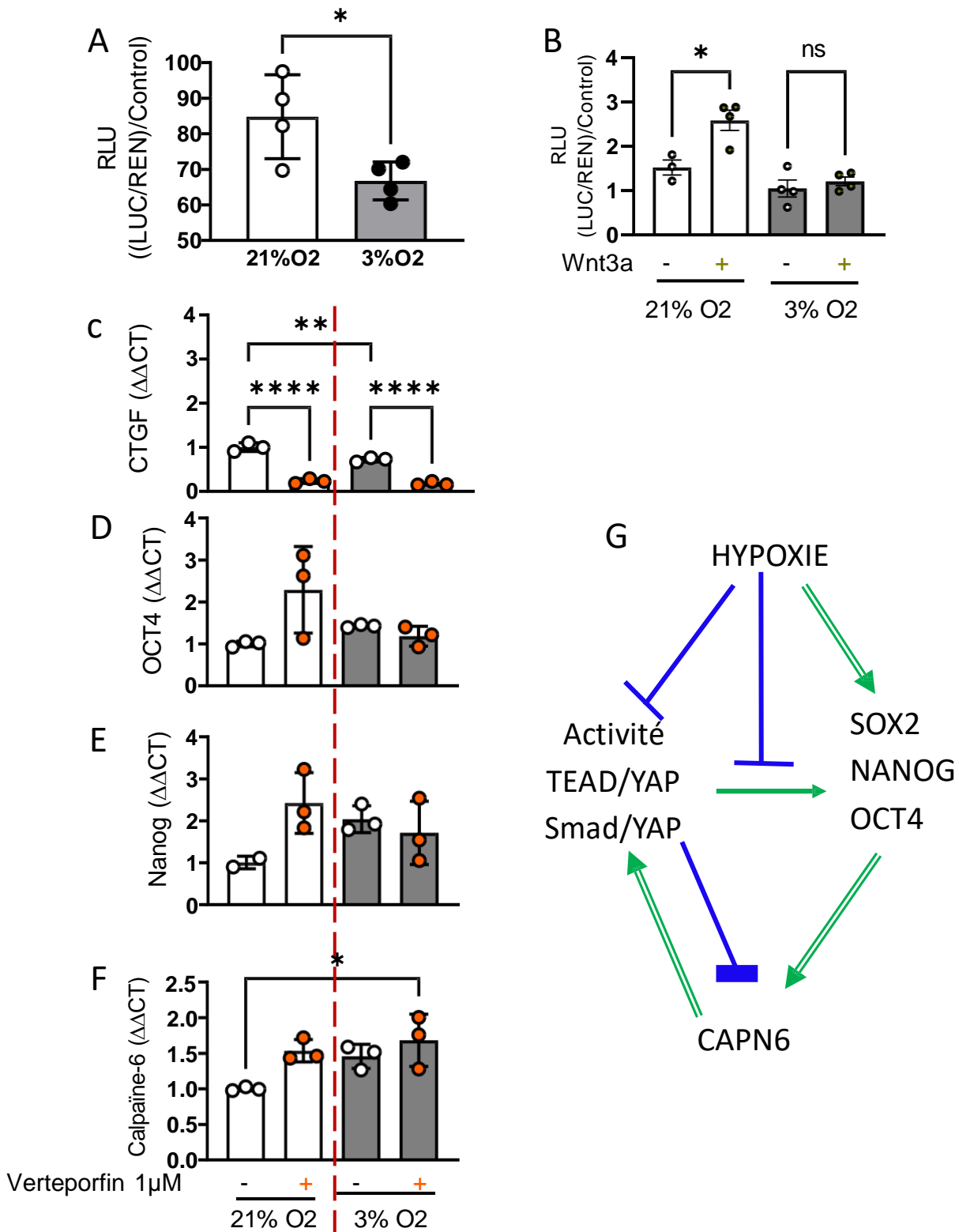


Figure 33 : La régulation réciproque de la calpaïne-6 et de YAP dans les OSCs

A/B: Les 143B ont été transfectées avec un plasmide synthétique GT11C pour mesurer l'activité TEAD en conditions hypoxiques ou non et sous stimulation WNT3a. Les résultats sont exprimés en \pm SEM RLU ratio luciférase/renilla. * $p < 0.05$ C: RT-PCR du gène cible de YAP : CTGF dans les 143B en conditions hypoxiques ou non en présence de verteporfine ou non . D/E : RT-PCR des gènes NANOG et OCT4 dans les 143B en conditions hypoxiques ou non en présence de verteporfine ou non. F : RT-PCR de la calpaïne-6 dans des 143B en conditions hypoxiques ou non en présence de verteporfine ou non. G : Schéma de la régulation réciproque de la calpaïne-6 en conditions hypoxiques. Le trait rouge sépare les deux conditions : 21% O2 (blanc) et 3%O2 (gris). Dans une même condition l'absence de verteporfine est à droite et le traitement de 24h de verteporfine à gauche. Les données sont exprimées en \pm SEM % des gènes de ménage PPIa et Actine. ** $p < 0.01$ **** $p < 0.0001$

Il a été montré que YAP peut former des complexes répresseurs en s’associant à smad3 et Oct4 pour réguler la différenciation de cellules souches embryonnaires (X. Sun et al. 2020). Or la séquence régulatrice de CAPN6 comprend un site consensus TEAD et de nombreux sites Smad (Figure 34).

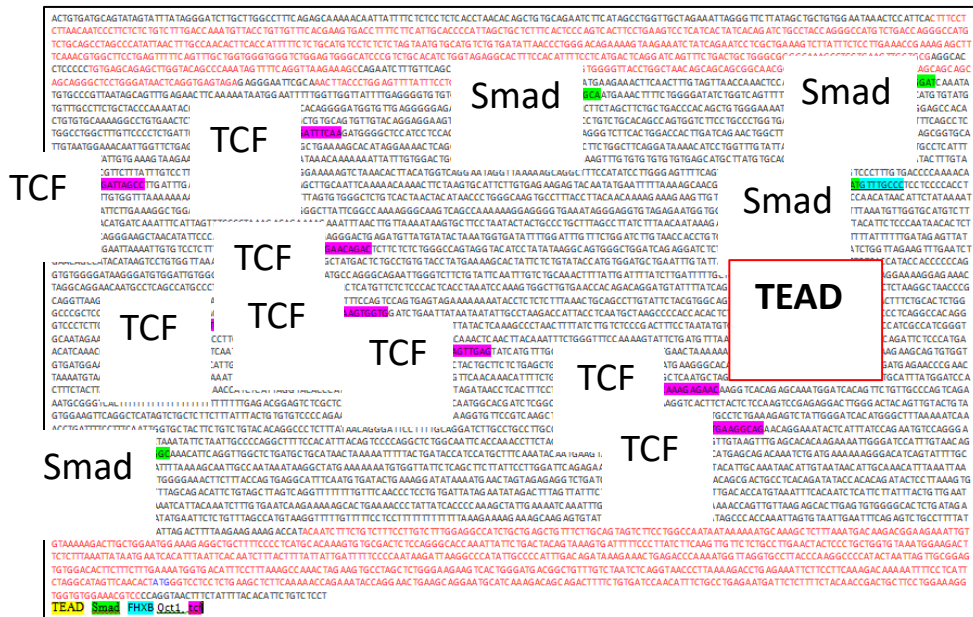


Figure 34 : Sites consensus capables de fixer YAP/TAZ dans la séquence régulatrice de la calpaïne-6
La séquence régulatrice de la calpaïne-6 comprend des sites consensus, capables de fixer YAP/TAZ

YAP/TAZ pourraient donc réprimer l’expression de la calpaïne-6 après la mitose pour permettre au cycle cellulaire de progresser. Tonami et al., ont été les premiers à montrer que la calpaïne-6 stabilise le réseau de microtubules pendant la cytotérière tandis que sa surexpression dans des fibroblastes empêche la mitose de se dérouler normalement induisant ainsi des anomalies nucléaires et donc que l’expression de la calpaïne-6 doit donc être finement régulée au cours du cycle cellulaire (Tonami et al. 2007).

2-5- Les effets de la verteporfine in vivo

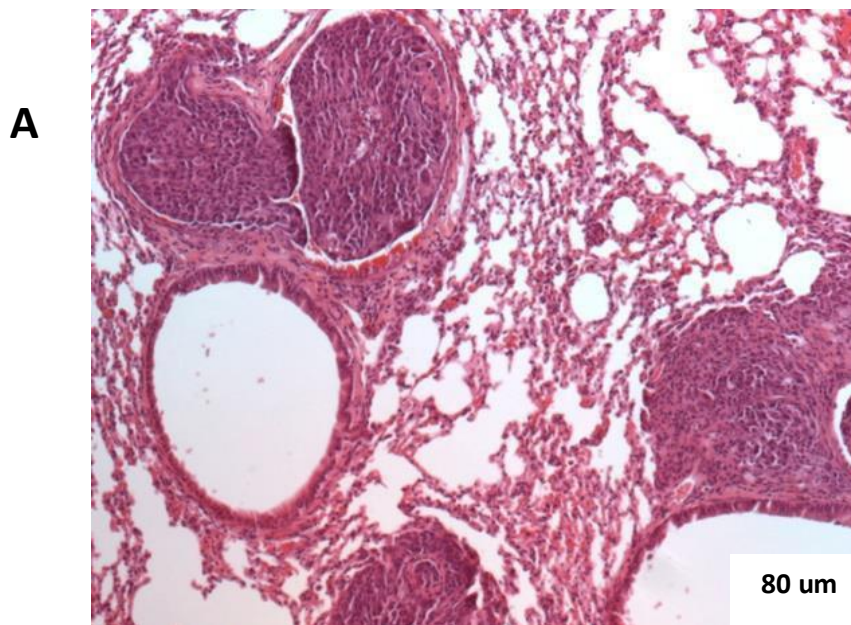
Pour étudier le rôle de l’axe calpaïne-6/YAP dans le développement tumoral et dans l’établissement des métastases, nous avons utilisé un inhibiteur pharmacologique connu de YAP, la verteporfine. Plusieurs études ont montré que la verteporfine bloque la formation du complexe YAP/TEAD en promouvant sa séquestration avec 14-3-3 dans le cytoplasme (C. Wang et al. 2016; Brodowska et al. 2014). Nous avons montré dans des modèles de tumeurs

osseuses et dans des modèles de tumeurs disséminées que le traitement par la verteporfine empêchait la croissance tumorale s'il était administré dès les étapes précoces du développement tumoral. De même, l'utilisation de la verteporfine tôt dans l'établissement des métastases a empêché la formation de métastases pulmonaires. Cependant dans les grosses tumeurs avec probablement des métastases déjà formées, l'inhibition de YAP par la verteporfine a stimulé le développement métastatique. **YAP aurait donc des effets différents selon l'état de développement de la tumeur.** A ce stade, nous ne pouvons pas exclure un effet de la verteporfine indépendant de l'inhibition de YAP. Dans le cancer de l'endomètre, il a été montré que la verteporfine avait des effets cytotoxiques et anti-prolifératifs indépendants de YAP (Dasari et al. 2017). D'autre part, bien que quelques études aient montré une inhibition spécifique de TAZ par la verteporfine, cela se discute (Takashi et al. 2021). En effet en inhibant YAP, on pourrait assister à des phénomènes de redondance /compensation par TAZ. D'autre part, inhiber YAP pourrait entraîner une accumulation de TAZ (Finch-Edmondson et al. 2015) ; ce qui aurait pour conséquence d'aggraver la maladie. On aurait le même problème en utilisant des shARN spécifiques YAP ou TAZ. Pour confirmer les résultats obtenus il faut utiliser un shARN double knockout YAP et TAZ. Toutefois, étant donné les effets délétères de la suppression des deux effecteurs de la voie HIPPO, il sera important d'utiliser un système inductible.

2-6- Le rôle de la Calpaïne-6 dans l'inflammation liée aux cancers

Il est intéressant de noter que les métastases qui se forment après une implantation locale osseuse sont très différentes des lésions pulmonaires qui suivent une injection de cellules K7M2 dans la circulation (Figure 34). Dans le premier cas on observe des nodules assez bien ou très bien délimités souvent isolés du tissu environnant par une sorte de membrane (Figure 35A). Les nodules pulmonaires ne surviennent pas dans toutes les souris injectées et en général ont le même rythme de croissance que la tumeur osseuse. Il y a plus de chance de voir des métastases chez les souris qui ont développé une tumeur osseuse dans les 4 premières semaines après l'implantation que chez les souris dans lesquelles la tumeur se développe après 6 semaines. En revanche, l'injection de cellules tumorales dans la circulation résulte en un envahissement massif des poumons dans 90% des souris en 5 à 6 semaines (Figure 35B).

Nodules pulmonaires dans un modèle de tumeur osseuse souris



Envahissement des poumons à la suite de l'injection des cellules tumorales dans la circulation

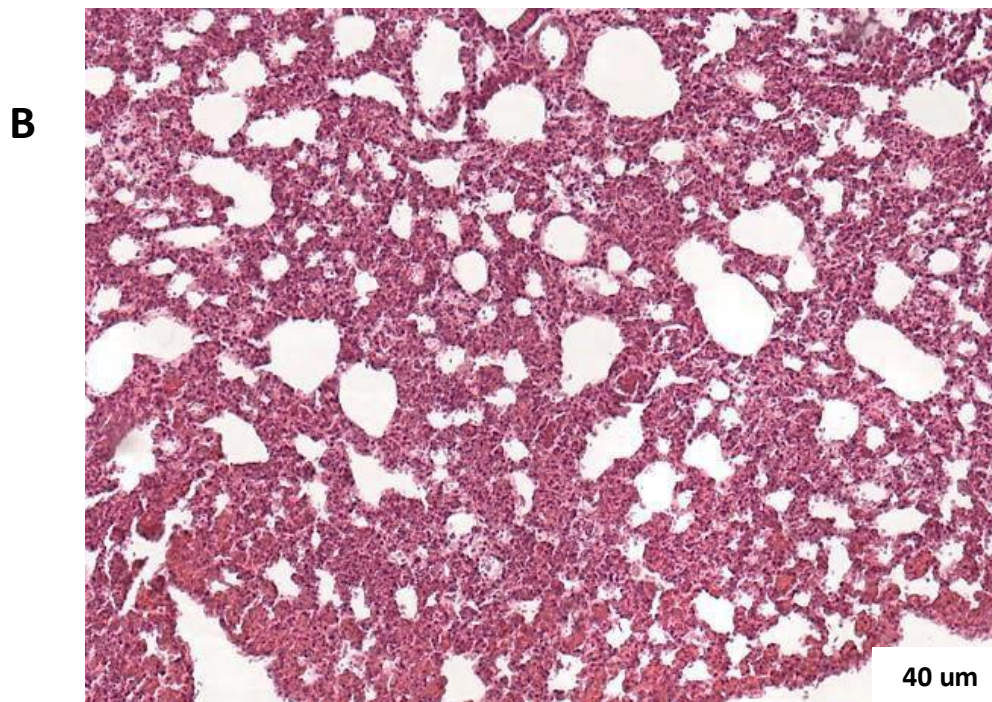


Figure 35 : Coupes de métastases pulmonaires provenant d'un modèle de tumeur osseuse et d'un modèle de tumeur disséminée

Coloration à l'hématoxyline et à l'éosine de coupes de poumons de souris. Il s'agit soit d'un modèle de tumeur osseuse avec injection orthotopique de cellules murines d'OS : K7M2 ou d'un modèle de tumeur disséminée avec injection en IV des cellules tumorales. A : les nodules métastatiques formés à partir d'un modèle de tumeur osseuse sont organisés dans des « niches » limitées par une membrane Et irriguées par des vaisseaux. B : Dans les modèles de tumeurs disséminées on observe un envahissement des poumons par les cellules tumorales. Ces dernières ne s'organisent pas en nodules.

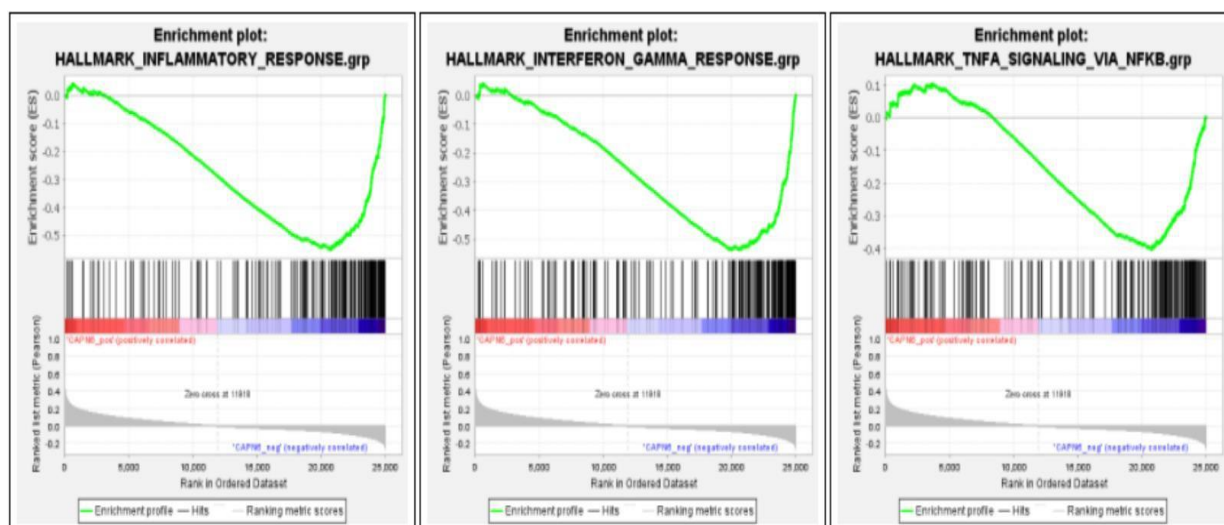
Il a été montré qu'il existe un dialogue entre la tumeur et les poumons qui permet de contrôler la niche métastatique (Bonner et Willms 2021b; Macklin et al. 2016b; Zhong et al. 2021). Castano et al. ont montré que certaines tumeurs mammaires induisent une réponse inflammatoire systémique et l'installation de cellules immunes produisant de l'IL-1 β dans des niches métastatiques. Dans ces sites l'IL-1 β bloque les cellules tumorales dans un phénotype mésenchymateux et empêche la plasticité vers un phénotype épithélial nécessaire au développement des métastases (Lawson et al. 2015; Castaño et al. 2018). Dans notre étude le dialogue entre la tumeur osseuse et les niches métastatiques dans les poumons semble également freiner la formation et l'expansion des métastases. Il serait intéressant de déterminer si le phénotype des cellules métastatiques est différent dans les deux modèles. Notamment, il faudrait s'intéresser aux marqueurs de l'EMT.

De façon contradictoire de nombreuses études ont associé la présence de marqueurs inflammatoires circulants à une progression tumorale et un mauvais pronostic chez les patients notamment ceux ayant développé un ostéosarcome (T. Liu et al. 2015). Dans nos modèles chez la souris, les effets pro-prolifératifs de la vertéporfine chez certaines souris étaient liés à une inflammation autour des nodules pulmonaires. Mais cette inflammation était restreinte en périphérie des nodules pulmonaires. Les cellules tumorales semblaient donc bénéficier de facteurs pro-prolifératifs produits par le tissu hôte tout en étant protégées d'une activation de la réponse immune associée. Nous nous sommes interrogés aux mécanismes qui pouvaient empêcher l'inflammation de gagner le tissu tumoral. L'analyse comparative des transcriptomes des cellules 143B a confirmé que la calpaïne-6 est associée à une diminution drastique de l'expression de l'IL1 (Log2FC= -1.22, q=4.7 10⁻⁷). Cela est cohérent avec le fait que l'entrée en sénescence et la production des facteurs du SASP sont inhibées dans les cellules qui expriment la calpaïne-6 (Andrique et al. 2018). Nous n'avons pas retrouvé cette corrélation inverse dans les sarcomes en analysant les données de transcriptome des cohortes Target_OS et TCGA_Sarc. En revanche, nous avons trouvé un enrichissement négatif significatif des signatures de gènes de l'inflammation (HALLMARK_INFLAMMATORY_RESPONSE et BIOCARTA_INFLAM_PATHWAY), des gènes dépendants de l'interféron- γ (HALLMARK_INTERFERON_GAMMA_RESPONSE) et de gènes dépendants de TNF α via NF-kB (HALLMARK_TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB) (Figures 36 et 37).

TGCA_Sarc

Table: Gene sets enriched in phenotype negative correlation with profile [plain text format]

GS follow link to MSigDB	GS DETAILS	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
HALLMARK_INFLAMMATORY_RESPONSE.grp	Details ...	199	-0.55	-1.75	0.014	0.044	0.021	4237	tags=56%, list=17%, signal=67%
HALLMARK_INTERFERON_GAMMA_RESPONSE.grp	Details ...	200	-0.54	-1.48	0.120	0.112	0.081	4955	tags=58%, list=20%, signal=71%
HALLMARK_TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB.grp	Details ...	200	-0.40	-1.36	0.154	0.128	0.134	4237	tags=47%, list=17%, signal=56%



TargetOS

Table: Gene sets enriched in phenotype negative correlation with profile [plain text format]

GS follow link to MSigDB	GS DETAILS	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
HALLMARK_INFLAMMATORY_RESPONSE.grp	Details ...	199	-0.25	-1.47	0.155	0.155	0.082	4203	tags=41%, list=17%, signal=49%
HALLMARK_INTERFERON_GAMMA_RESPONSE.grp	Details ...	198	-0.33	-1.61	0.134	0.134	0.071	6903	tags=61%, list=27%, signal=83%
HALLMARK_TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB.grp	Details ...	200	-0.15	-0.89	0.525	0.525	0.275	5861	tags=39%, list=23%, signal=50%

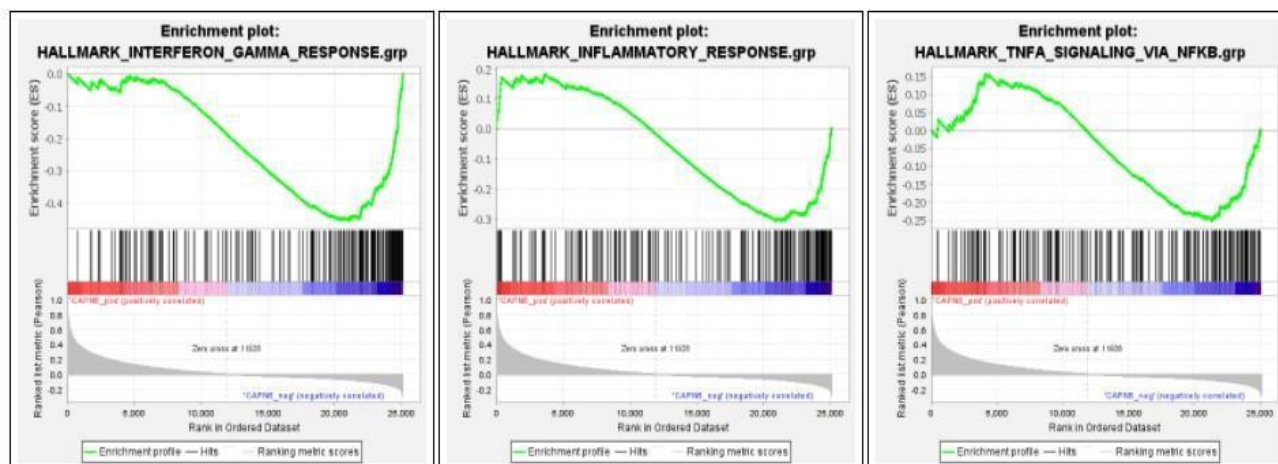


Figure 36: GSEA de différentes signatures de l'inflammation en fonction de l'expression de la calpaïne-6 dans les sarcomes mou et osseux

Analyse d'enrichissement de gènes liés à l'inflammation en fonction de l'expression de la calpaïne-6 dans les sarcomes osseux (TargetOS) et les sarcomes mou (TGCA_sarc). HALLMARK_INFLAMMATORY_RESPONSE : (M5932) 200 gènes définissant la réponse inflammatoire. HALLMARK_INTERFERON_GAMMA_RESPONSE : (M5913) 200 gènes dépendants de l'interféron- γ . HALLMARK_TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB : (M5890) 200 gènes dépendants de TNF α via NF- κ B. Le score d'enrichissement normalisé est significatif quand FDR q-value < 25% .

BIOCARTA_INFLAM_PATHWAY

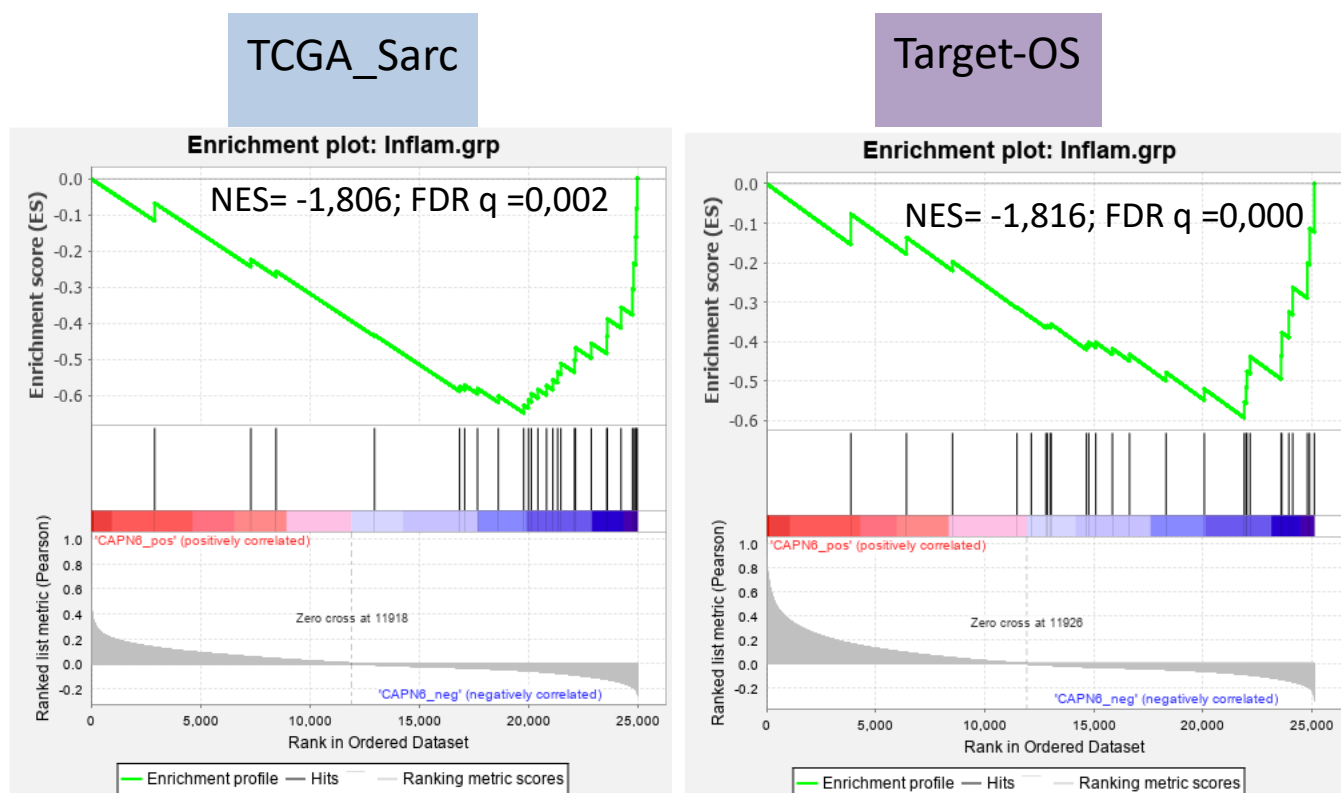


Figure 37: GSEA de la signature génique BIOCARTA en fonction de l'expression de la calpaïne-6 dans des sarcomes moux et osseux par rapport

Analyse d'enrichissement de gènes liés à l'inflammation en fonction de l'expression de la calpaïne-6 dans les sarcomes osseux (TargetOS) et les sarcomes moux (TGCA_sarc). BIOCARTA_INFLAM_PATHWAY : (M6910) 29 gènes associés à la réponse inflammatoire. Le score d'enrichissement normalisé est significatif quand FDR q-value <25%.

Cela signifie que l'expression des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire est diminuée dans les tumeurs avec des niveaux élevés de calpaïne-6 par rapport aux tumeurs sans calpaïne-6. Ces données apportent un nouvel éclairage sur le rôle potentiel des OSC^{calp6} dans le développement tumoral et métastatique. **Ces cellules pourraient moduler le microenvironnement immun en contrôlant l'expression des médiateurs inflammatoires.** Pour étayer cette hypothèse nous avons co-cultivé des cellules 143B exprimant des shRNA contrôles ou des shRNA ciblant la calpaïne-6 avec des cellules THP1 qui sont des cellules de type monocyte que l'on a induites dans la voie macrophagique en les traitant avec du phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA). Les cellules étaient séparées physiquement dans un système d'insert permettant la circulation des facteurs. La figure 38 montre que la population de cellules tumorales contenant des cellules exprimant la calpaïne-6 a réduit l'expression du

TNF α dans les cellules THP1. Cet effet a été réduit quand l'expression de la calpaïne-6 a été supprimée. Ainsi la population de cellules cancéreuses contenant des OSC^{calp6} pourrait influencer le phénotype des macrophages vers un phénotype M2 (anti-inflammatoire/pro-tumoral) et jouer ainsi un rôle important pour échapper à la surveillance par le système immunitaire.

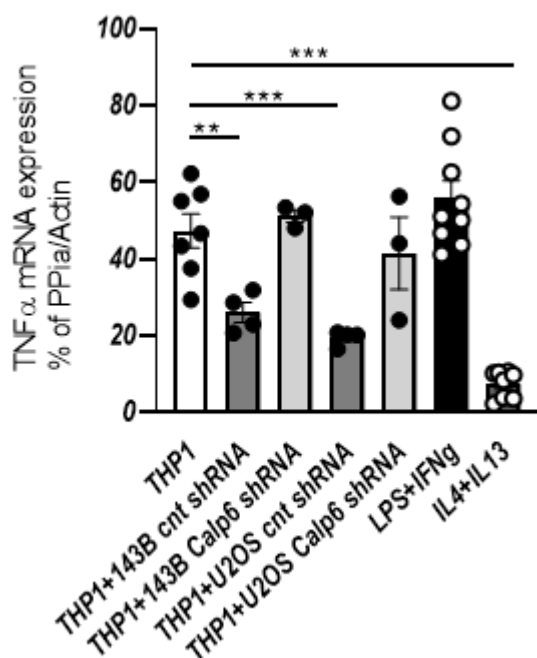


Figure 38 : Les cellules exprimant la calpaïne-6 induisent la différenciation des macrophages vers un phénotype M2.

Les cellules THP1 ont été traitées avec les éluants (DMSO) ou des cytokines pour induire la différenciation vers un phénotype M1 (LPS+ IFN γ) ou M2 (IL-4+IL-13) ou en présence d'inserts contenant des cellules 143B exprimant des shRNA contrôles (cnt shRNA) ou ciblant la calpaïne-6 (Calp6 shRNA). Après une nuit les ARNs ont été extraits des cellules THP1 et l'expression de TNF α a été évaluée par RT-PCR. ** p<0.01, *** p<0.001. Les résultats sont les moyennes de l'expression du TNF α \pm SEM en % des gènes de ménage PPIa et Actine.

Ces résultats renforcent l'idée que **la calpaïne-6 dans des OSCs pourrait moduler le microenvironnement immun dans les tumeurs et les métastases.**

3- Conclusion Générale

En conclusion, notre étude a montré que les OSC^{calp6} sont impliquées dans l'initiation des tumeurs et des métastases. Mécaniquement, la calpaïne-6 promeut une activité spécifique YAP liée aux phases G2M ; ce qui protège les OSC^{calp6} de l'apoptose et permet la croissance tumorale et métastatique. La calpaïne-6 apparaît donc comme une cible thérapeutique potentielle. De plus, inhiber l'axe calpaïne-6/YAP pourrait prévenir l'apparition de métastases et/ou de récives. Toutefois, il sera important de déterminer le contexte inflammatoire avant tout traitement (Figure 39).

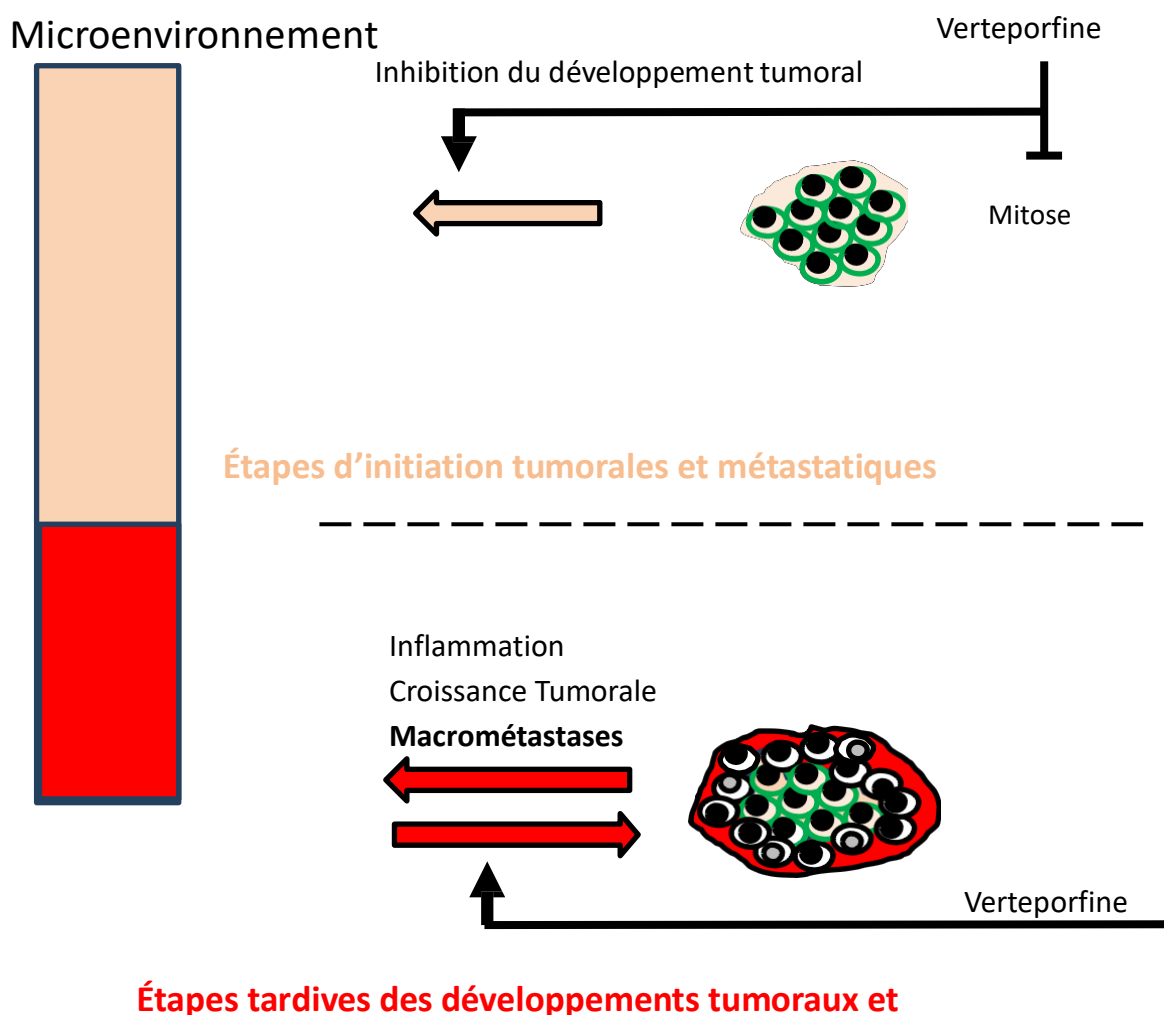


Figure 39 : Rôle de l'axe calpaïne-6/YAP dans le développement tumoral et métastatique des OSC

Les OSC^{calp6} sont essentiellement présentes durant les étapes d'initiation tumorale et métastatique. L'axe calpaïne-6/YAP protège ces cellules de l'apoptose et permet la croissance tumorale et le développement métastatique. Aux étapes précoces, l'environnement tumoral est essentiellement non inflammatoire. Traiter la tumeur avec la vertéporfine freine la croissance tumorale en entraînant la mort massive des cellules. Les tumeurs et les métastases développées sont hautement inflammatoires. Dans ce contexte, la vertéporfine stimule l'inflammation et soutient le développement métastatique.

4- Perspectives

Nos travaux ouvrent différentes perspectives d'études qui auront pour but de mieux comprendre les fonctions de la calpaïne-6 et de mettre en évidence des outils pour cibler cette protéine ou son activité et réduire ainsi la population de CSC au sein des tumeurs.

En plus des données transcriptomiques issues d'ostéosarcomes nous avons utilisé des données issues de différents types de sarcomes (TCGA_Sarc) qui confirment la corrélation inverse entre la calpaïne-6 et les marqueurs inflammatoires mais aussi avec le score immun qui caractérise la richesse en cellules immune dans les tumeurs grâce aux données de transcriptomique. La calpaïne-6 pourrait être une cible thérapeutique dans un groupe plus large de tumeurs.

Pour continuer à caractériser les fonctions possibles de ce biomarqueur, des études in silico ont été réalisées et seront poursuivies pour y associer des gènes et des mécanismes. Nous avons montré que les OSC^{calp6} sont capables d'influencer les autres cellules de la tumeur et leur microenvironnement. Les données de single cell RNA-seq seront donc très utiles pour connaître les caractéristiques propres de ces cellules.

Il sera particulièrement intéressant de mieux caractériser les actions des OSCs sur le microenvironnement immun. Nous allons pour cela compléter notre étude basée sur les co-cultures de cellules cancéreuses avec les cellules monocytaires en utilisant des lignées et des cellules dérivées de sang (donneurs humains) ou de moelle osseuse (souris). L'objectif sera d'identifier des médiateurs impliqués dans la communication entre les cellules.

Un autre projet consistera à réaliser une étude en immunohistologie multiplexe pour caractériser le paysage immun dans différentes zones de la tumeur pour déterminer si la présence de OSC^{calp6} modifie ce paysage.

Enfin nous voudrions mettre en place un système de poche à air chez la souris qui permettrait de créer un environnement que l'on pourrait manipuler avant ou après l'implantation des cellules tumorales pour étudier le recrutement des cellules immunes au

cours du développement tumoral et les interactions entre les cellules tumorales et les autres cellules.

Nous pouvons émettre l'hypothèse que si les OSC^{calp6} influencent le microenvironnement immun elles pourraient également jouer un rôle dans la réponse des patients aux immunothérapies. Nous utiliserons des données transcriptomiques de patients et notre modèle chez la souris pour comprendre s'il existe une relation entre la présence d'OSC^{calp6} dans des tumeurs et la réponse aux immunothérapies et si on peut améliorer cette réponse en supprimant la calpaïne-6.

Bibliographie

- Aceto, Nicola, Mehmet Toner, Shyamala Maheswaran, et Daniel A. Haber. 2015. « En Route to Metastasis: Circulating Tumor Cell Clusters and Epithelial-to-Mesenchymal Transition ». *Trends in Cancer* 1 (1): 44-52. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2015.07.006>.
- Acharyya, Swarnali, Thordur Oskarsson, Sakari Vanharanta, Srinivas Malladi, Juliet Kim, Patrick G. Morris, Katia Manova-Todorova, et al. 2012. « A CXCL1 Paracrine Network Links Cancer Chemoresistance and Metastasis ». *Cell* 150 (1): 165-78. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.04.042>.
- Adamowicz, Marek, Jelena Vermezovic, et Fabrizio d'Adda di Fagagna. 2016. « NOTCH1 Inhibits Activation of ATM by Impairing the Formation of an ATM-FOXO3a-KAT5/Tip60 Complex ». *Cell Reports* 16 (8): 2068-76. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.07.038>.
- Adams, E. F., N. G. Coldham, et V. H. T. James. 1988. « Steroidal regulation of oestradiol-17 β dehydrogenase activity of the human breast cancer cell line MCF-7 ». *Journal of Endocrinology* 118 (1): 149-54. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1180149>.
- Adhikari, Amit S., Neeraj Agarwal, Byron M. Wood, Constance Porretta, Bernardo Ruiz, Radhika R. Pochampally, et Tomoo Iwakuma. 2010. « CD117 and Stro-1 Identify Osteosarcoma Tumor-Initiating Cells Associated with Metastasis and Drug Resistance ». *Cancer Research* 70 (11): 4602-12. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3463>.
- Aguirre-Ghiso, Julio A, Paloma Bragado, et Maria Soledad Sosa. 2013. « Metastasis Awakening: Targeting Dormant Cancer ». *Nature Medicine* 19 (3): 276-77. <https://doi.org/10.1038/nm.3120>.
- Albini, Adriana, Valentina Mirisola, et Ulrich Pfeffer. 2008. « Metastasis Signatures: Genes Regulating Tumor–Microenvironment Interactions Predict Metastatic Behavior ». *Cancer and Metastasis Reviews* 27 (1): 75-83. <https://doi.org/10.1007/s10555-007-9111-x>.
- Alexander, Stephanie, Gudrun E. Koehl, Markus Hirschberg, Edward K. Geissler, et Peter Friedl. 2008. « Dynamic Imaging of Cancer Growth and Invasion: A Modified Skin-Fold Chamber Model ». *Histochemistry and Cell Biology* 130 (6): 1147-54. <https://doi.org/10.1007/s00418-008-0529-1>.
- Allemani, Claudia, Hannah K Weir, Helena Carreira, Rhea Harewood, Devon Spika, Xiao-Si Wang, Finian Bannon, et al. 2015. « Global Surveillance of Cancer Survival 1995–2009: Analysis of Individual Data for 25 676 887 Patients from 279 Population-Based Registries in 67 Countries (CONCORD-2) ». *The Lancet* 385 (9972): 977-1010. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)62038-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)62038-9).
- Ando, Kosei, Marie-Françoise Heymann, Verena Stresing, Kanji Mori, Françoise Rédini, et Dominique Heymann. 2013. « Current Therapeutic Strategies and Novel Approaches in Osteosarcoma ». *Cancers* 5 (4): 591-616. <https://doi.org/10.3390/cancers5020591>.
- Ando, Kosei, Kanji Mori, Nedège Corradini, Françoise Redini, et Dominique Heymann. 2011. « Mifamurtide for the Treatment of Nonmetastatic Osteosarcoma ». *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 12 (2): 285-92. <https://doi.org/10.1517/14656566.2011.543129>.

Andrique, Caroline, Laetitia Morardet, Laetitia K. Linares, Madi Y. Cissé, Candice Merle, Frédéric Chibon, Sylvain Provot, et al. 2018. « Calpain-6 Controls the Fate of Sarcoma Stem Cells by Promoting Autophagy and Preventing Senescence ». *JCI Insight* 3 (17): e121225. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.121225>.

Anninga, Jakob K., Hans Gelderblom, Marta Fiocco, Judith R. Kroep, Antoni H.M. Taminiu, Pancras C.W. Hogendoorn, et R. Maarten Egeler. 2011. « Chemotherapeutic Adjuvant Treatment for Osteosarcoma: Where Do We Stand? » *European Journal of Cancer* 47 (16): 2431-45. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2011.05.030>.

Aragona, Mariaceleste, Tito Panciera, Andrea Manfrin, Stefano Giullitti, Federica Michielin, Nicola Elvassore, Sirio Dupont, et Stefano Piccolo. 2013. « A Mechanical Checkpoint Controls Multicellular Growth through YAP/TAZ Regulation by Actin-Processing Factors ». *Cell* 154 (5): 1047-59. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.042>.

Avnet, Sofia, Gemma Di Pompo, Tokuhiko Chano, Costantino Errani, Arig Ibrahim-Hashim, Robert J. Gillies, Davide Maria Donati, et Nicola Baldini. 2017. « Cancer-Associated Mesenchymal Stroma Fosters the Stemness of Osteosarcoma Cells in Response to Intratumoral Acidosis via NF-KB Activation: Tumor Acidic Microenvironment Fosters Osteosarcoma Stemness via Mesenchymal Stroma ». *International Journal of Cancer* 140 (6): 1331-45. <https://doi.org/10.1002/ijc.30540>.

Avnet, Sofia, Silvia Lemma, Margherita Cortini, Paola Pellegrini, Francesca Perut, Nicoletta Zini, Katsuyuki Kusuzaki, et al. 2016. « Altered PH Gradient at the Plasma Membrane of Osteosarcoma Cells Is a Key Mechanism of Drug Resistance ». *Oncotarget* 7 (39): 63408-23. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11503>.

Avnet, Sofia, Alessandra Longhi, Manuela Salerno, Jussi M. Halleen, Francesca Perut, Donatella Granchi, Stefano Ferrari, Franco Bertoni, Armando Giunti, et Nicola Baldini. 2008. « Increased Osteoclast Activity Is Associated with Aggressiveness of Osteosarcoma ». *International Journal of Oncology* 33 (6): 1231-38.

Azzolin, Luca, Tito Panciera, Sandra Soligo, Elena Enzo, Silvio Bicciato, Sirio Dupont, Silvia Bresolin, et al. 2014. « YAP/TAZ Incorporation in the β -Catenin Destruction Complex Orchestrates the Wnt Response ». *Cell* 158 (1): 157-70. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.06.013>.

Bacci, Gaetano, Alessandra Longhi, Franco Bertoni, Antonio Briccoli, Michela Versari, Elettra Pignotti, et Piero Picci. 2006. « Bone Metastases in Osteosarcoma Patients Treated with Neoadjuvant or Adjuvant Chemotherapy The Rizzoli Experience in 52 Patients ». *Acta Orthopaedica* 77 (6): 938-43. <https://doi.org/10.1080/17453670610013268>.

Badal, Vinay, Sergio Ménendez, David Coomber, et David P. Lane. 2008. « Regulation of the P14ARF Promoter by DNA Methylation ». *Cell Cycle* 7 (1): 112-19. <https://doi.org/10.4161/cc.7.1.5137>.

Bakir, Basil, Anna M. Chiarella, Jason R. Pitarresi, et Anil K. Rustgi. 2020. « EMT, MET, Plasticity, and Tumor Metastasis ». *Trends in Cell Biology* 30 (10): 764-76. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.07.003>.

Barry, Evan R., Teppei Morikawa, Brian L. Butler, Kriti Shrestha, Rosemarie de la Rosa, Kelley S. Yan, Charles S. Fuchs, et al. 2013. « Restriction of Intestinal Stem Cell Expansion and the Regenerative Response by YAP ». *Nature* 493 (7430): 106-10. <https://doi.org/10.1038/nature11693>.

Basu-Roy, Upal, N. Sumru Bayin, Kirk Rattanakorn, Eugenia Han, Dimitris G. Placantonakis, Alka Mansukhani, et Claudio Basilico. 2015. « Sox2 Antagonizes the Hippo Pathway to Maintain Stemness in Cancer Cells ». *Nature Communications* 6 (1): 6411. <https://doi.org/10.1038/ncomms7411>.

Berman, S. D., E. Calo, A. S. Landman, P. S. Danielian, E. S. Miller, J. C. West, B. D. Fonhoue, et al. 2008. « Metastatic Osteosarcoma Induced by Inactivation of Rb and P53 in the Osteoblast Lineage ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (33): 11851-56. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805462105>.

Bertrand, Todd E., Alex Cruz, Odion Binitie, David Cheong, et G. Douglas Letson. 2016. « Do Surgical Margins Affect Local Recurrence and Survival in Extremity, Nonmetastatic, High-Grade Osteosarcoma? » *Clinical Orthopaedics and Related Research*® 474 (3): 677-83. <https://doi.org/10.1007/s11999-015-4359-x>.

Bijsterveldt, Linda van, Samuel C. Durley, Tim S. Maughan, et Timothy C. Humphrey. 2021. « The Challenge of Combining Chemo- and Radiotherapy with Checkpoint Kinase Inhibitors ». *Clinical Cancer Research* 27 (4): 937-62. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-3358>.

Bommareddy, Praveen K., Megha Shettigar, et Howard L. Kaufman. 2018. « Integrating Oncolytic Viruses in Combination Cancer Immunotherapy ». *Nature Reviews Immunology* 18 (8): 498-513. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0014-6>.

« Bone Sarcomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up ». 2012. *Annals of Oncology* 23 (octobre): vii100-109. <https://doi.org/10.1093/annonc/mds254>.

Bonner, Scott E., et Eduard Willms. 2021a. « Intercellular Communication through Extracellular Vesicles in Cancer and Evolutionary Biology ». *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 165 (octobre): 80-87. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2021.08.006>.

———. 2021b. « Intercellular Communication through Extracellular Vesicles in Cancer and Evolutionary Biology ». *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 165 (octobre): 80-87. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2021.08.006>.

Bonnet, Dominique, et John E. Dick. 1997. « Human Acute Myeloid Leukemia Is Organized as a Hierarchy That Originates from a Primitive Hematopoietic Cell ». *Nature Medicine* 3 (7): 730-37. <https://doi.org/10.1038/nm0797-730>.

Bonuccelli, Gloria, Sofia Avnet, Giulia Grisendi, Manuela Salerno, Donatella Granchi, Massimo Dominici, Katsuyuki Kusuzaki, et Nicola Baldini. 2014. « Role of Mesenchymal Stem Cells in Osteosarcoma and Metabolic Reprogramming of Tumor Cells ». *Oncotarget* 5 (17): 7575-88. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2243>.

Brahimi-Horn, M. Christiane, et Jacques Pouyssegur. 2007. « Oxygen, a Source of Life and Stress ». *FEBS Letters* 581 (19): 3582-91. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.06.018>.

Braun, Stephan, Florian D. Vogl, Bjørn Naume, Wolfgang Janni, Michael P. Osborne, R. Charles Coombes, Günter Schlimok, et al. 2005. « A Pooled Analysis of Bone Marrow Micrometastasis in Breast Cancer ». *New England Journal of Medicine* 353 (8): 793-802. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa050434>.

Briccoli, Antonio, Michele Rocca, Mariacristina Salone, Gaetano Bacci, Stefano Ferrari, Alba Balladelli, et Mario Mercuri. 2005. « Resection of Recurrent Pulmonary Metastases in Patients with Osteosarcoma ». *Cancer* 104 (8): 1721-25. <https://doi.org/10.1002/cncr.21369>.

Brodowska, Katarzyna, Ahmad Al-Moujahed, Anna Marmalidou, Melissa Meyer zu Horste, Joanna Cichy, Joan W. Miller, Evangelos Gragoudas, et Demetrios G. Vavvas. 2014. « The Clinically Used

TCHICAYA BOUANGA Joëlle-Thèse de Doctorat-2021
Photosensitizer Verteporfin (VP) Inhibits YAP-TEAD and Human Retinoblastoma Cell Growth in Vitro without Light Activation ». *Experimental Eye Research* 124 (juillet): 67-73.
<https://doi.org/10.1016/j.exer.2014.04.011>.

Brooks, Susan A., Hannah J. Lomax-Browne, Tracey M. Carter, Chloe E. Kinch, et Debbie M. S. Hall. 2010. « Molecular Interactions in Cancer Cell Metastasis ». *Acta Histochemica* 112 (1): 3-25.
<https://doi.org/10.1016/j.acthis.2008.11.022>.

Brown, Hannah K., Kristina Schiavone, François Gouin, Marie-Françoise Heymann, et Dominique Heymann. 2018. « Biology of Bone Sarcomas and New Therapeutic Developments ». *Calcified Tissue International* 102 (2): 174-95. <https://doi.org/10.1007/s00223-017-0372-2>.

Cackowski, Frank C., Judith L. Anderson, Kenneth D. Patrene, Rushir J. Choksi, Steven D. Shapiro, Jolene J. Windle, Harry C. Blair, et G. David Roodman. 2010. « Osteoclasts Are Important for Bone Angiogenesis ». *Blood* 115 (1): 140-49. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-08-237628>.

Cai, Wei, Yong Xu, Jian Yin, Wenshan Zuo, et Zhen Su. 2019. « miR-552-5p facilitates osteosarcoma cell proliferation and metastasis by targeting WIF1 ». *Experimental and Therapeutic Medicine*, mars. <https://doi.org/10.3892/etm.2019.7361>.

Calabrese, Fiorella, Francesca Lunardi, Elisabetta Balestro, Giuseppe Marulli, Egle Perissinotto, Monica Loy, Nazarena Nannini, et al. 2012. « Serpin B4 Isoform Overexpression Is Associated with Aberrant Epithelial Proliferation and Lung Cancer in Idiopathic Pulmonary Fibrosis ». *Pathology* 44 (3): 192-98. <https://doi.org/10.1097/PAT.0b013e3283511b61>.

Cao, Lanqing, Min Yao, Hironobu Sasano, Ping-Li Sun, et Hongwen Gao. 2020. « YAP Increases Response to Trastuzumab in HER2-Positive Breast Cancer by Enhancing P73-Induced Apoptosis ». *Journal of Cancer* 11 (22): 6748-59. <https://doi.org/10.7150/jca.48535>.

Cao, Xiaolei, Chenliang Wang, Jiyang Liu, et Bin Zhao. 2020. « Regulation and Functions of the Hippo Pathway in Stemness and Differentiation ». *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 52 (7): 736-48. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmaa048>.

Caon, Ilaria, Barbara Bartolini, Arianna Parnigoni, Elena Caravà, Paola Moretto, Manuela Viola, Evgenia Karousou, Davide Vigetti, et Alberto Passi. 2020. « Revisiting the Hallmarks of Cancer: The Role of Hyaluronan ». *Seminars in Cancer Biology* 62 (mai): 9-19. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.07.007>.

Capasso, L., M. Florio, M. Lillo, M. Basilico, V. De Santis, A. Zirano, A. Grasso, F. Minutillo, et G. Maccauro. 2019. « Vascular Endothelial Growth Factor Expression as a Biomarker of Prognosis in Patients with Chondrosarcoma, Ewing's Sarcoma and Osteosarcoma. Current Concepts ». *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents* 33 (2 Suppl. 1): 39-43. . XIX Congresso Nazionale S.I.C.O.O.P. Societa' Italiana Chirurghi Ortopedici Dell'ospedale' Privata Accreditata.

Castaño, Zafira, Beatriz P. San Juan, Asaf Spiegel, Ayush Pant, Molly J. DeCristo, Tyler Laszewski, Jessalyn M. Ubellacker, et al. 2018. « IL-1 β Inflammatory Response Driven by Primary Breast Cancer Prevents Metastasis-Initiating Cell Colonization ». *Nature Cell Biology* 20 (9): 1084-97. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0173-5>.

Chambers, Ann F., Alan C. Groom, et Ian C. MacDonald. 2002. « Dissemination and Growth of Cancer Cells in Metastatic Sites ». *Nature Reviews Cancer* 2 (8): 563-72. <https://doi.org/10.1038/nrc865>.

- Chan, L H, W Wang, W Yeung, Y Deng, P Yuan, et K K Mak. 2014. « Hedgehog Signaling Induces Osteosarcoma Development through Yap1 and H19 Overexpression ». *Oncogene* 33 (40): 4857-66. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.433>.
- Chang, Astra, Aaron Schwertschkow, Jan Nolte, et Jian Wu. 2015. « Involvement of Mesenchymal Stem Cells in Cancer Progression and Metastases ». *Current Cancer Drug Targets* 15 (2): 88-98. <https://doi.org/10.2174/1568009615666150126154151>.
- Chen, Chenglong, Lu Xie, Tingting Ren, Yi Huang, Jie Xu, et Wei Guo. 2021. « Immunotherapy for Osteosarcoma: Fundamental Mechanism, Rationale, and Recent Breakthroughs ». *Cancer Letters* 500 (mars): 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.12.024>.
- Chen, Liming, Portia Gloria Loh, et Haiwei Song. 2010. « Structural and Functional Insights into the TEAD-YAP Complex in the Hippo Signaling Pathway ». *Protein & Cell* 1 (12): 1073-83. <https://doi.org/10.1007/s13238-010-0138-3>.
- Chen, Tianchi, Thuan Beng Saw, René-Marc Mège, et Benoit Ladoux. 2018. « Mechanical Forces in Cell Monolayers ». *Journal of Cell Science* 131 (24): jcs218156. <https://doi.org/10.1242/jcs.218156>.
- Chen, Xiang, Armita Bahrami, Alberto Pappo, John Easton, James Dalton, Erin Hedlund, David Ellison, et al. 2014. « Recurrent Somatic Structural Variations Contribute to Tumorigenesis in Pediatric Osteosarcoma ». *Cell Reports* 7 (1): 104-12. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.03.003>.
- Cheng, Gong, Fengguang Gao, Xiujiang Sun, Haiyong Bi, et Yonglin Zhu. 2016. « Paris Saponin VII Suppresses Osteosarcoma Cell Migration and Invasion by Inhibiting MMP-2/9 Production via the P38 MAPK Signaling Pathway ». *Molecular Medicine Reports* 14 (4): 3199-3205. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5663>.
- Chong, Zhi Xiong, Swee Keong Yeap, et Wan Yong Ho. 2021a. « Unraveling the Roles of MiRNAs in Regulating Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) in Osteosarcoma ». *Pharmacological Research* 172 (octobre): 105818. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105818>.
- . 2021b. « Unraveling the Roles of MiRNAs in Regulating Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) in Osteosarcoma ». *Pharmacological Research* 172 (octobre): 105818. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105818>.
- Chung, HaeWon, Bum-Kyu Lee, Nadima Uprety, Wenwen Shen, Jiwoon Lee, et Jonghwan Kim. 2016. « Yap1 Is Dispensable for Self-renewal but Required for Proper Differentiation of Mouse Embryonic Stem (ES) Cells ». *EMBO Reports* 17 (4): 519-29. <https://doi.org/10.15252/embr.201540933>.
- Corre, Isabelle, Franck Verrecchia, Vincent Crenn, Françoise Redini, et Valérie Trichet. 2020. « The Osteosarcoma Microenvironment: A Complex but Targetable Ecosystem ». *Cells* 9 (4): 976. <https://doi.org/10.3390/cells9040976>.
- Croall, Dorothy E, et Klaus Ersfeld. 2007. « The calpains: modular designs and functional diversity ». *Genome Biology* 8 (6): 218. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-6-218>.
- Cui, Juncheng, Dylan Dean, Francis J. Hornicek, Zhiwei Chen, et Zhenfeng Duan. 2020a. « The Role of Extracellular Matrix in Osteosarcoma Progression and Metastasis ». *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR* 39 (1): 178. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01685-w>.

———. 2020b. « The Role of Extracellular Matrix in Osteosarcoma Progression and Metastasis ». *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR* 39 (1): 178. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01685-w>.

Danieau, Morice, Rédini, Verrecchia, et Royer. 2019. « New Insights about the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway in Primary Bone Tumors and Their Microenvironment: A Promising Target to Develop Therapeutic Strategies? » *International Journal of Molecular Sciences* 20 (15): 3751. <https://doi.org/10.3390/ijms20153751>.

Das, S, K Bryan, P G Buckley, O Piskareva, I M Bray, N Foley, J Ryan, et al. 2013. « Modulation of Neuroblastoma Disease Pathogenesis by an Extensive Network of Epigenetically Regulated MicroRNAs ». *Oncogene* 32 (24): 2927-36. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.311>.

Dasari, Venkata Ramesh, Virginia Mazack, Wen Feng, John Nash, David J. Carey, et Radhika Gogoi. 2017. « Verteporfin Exhibits YAP-Independent Anti-Proliferative and Cytotoxic Effects in Endometrial Cancer Cells ». *Oncotarget* 8 (17): 28628-40. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15614>.

Davis, Jessica L, et Andrew E Horvai. 2016. « Special AT-Rich Sequence-Binding Protein 2 (SATB2) Expression Is Sensitive but May Not Be Specific for Osteosarcoma as Compared with Other High-Grade Primary Bone Sarcomas ». *Histopathology* 69 (1): 84-90. <https://doi.org/10.1111/his.12911>.

Dear, T.N, et T Boehm. 1999. « Diverse mRNA Expression Patterns of the Mouse Calpain Genes Capn5, Capn6 and Capn11 during Development ». *Mechanisms of Development* 89 (1-2): 201-9. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(99\)00214-2](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(99)00214-2).

Deel, Michael D., Jenny J. Li, Lisa E. S. Crose, et Corinne M. Linardic. 2015. « A Review: Molecular Aberrations within Hippo Signaling in Bone and Soft-Tissue Sarcomas ». *Frontiers in Oncology* 5 (septembre). <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00190>.

DeLaney, Thomas F., Lily Park, Saveli I. Goldberg, Eugen B. Hug, Norbert J. Liebsch, John E. Munzenrider, et Herman D. Suit. 2005. « Radiotherapy for Local Control of Osteosarcoma ». *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*Physics* 61 (2): 492-98. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2004.05.051>.

Di Fiore, Riccardo, Antonella D'Anneo, Giovanni Tesoriere, et Renza Vento. 2013. « RB1 in Cancer: Different Mechanisms of RB1 Inactivation and Alterations of PRb Pathway in Tumorigenesis: RB1/PRb INACTIVATION IN CANCER ». *Journal of Cellular Physiology* 228 (8): 1676-87. <https://doi.org/10.1002/jcp.24329>.

Díaz-Montero, C. Marcela, James N. Wygant, et Bradley W. McIntyre. 2006. « PI3-K/Akt-Mediated Anoikis Resistance of Human Osteosarcoma Cells Requires Src Activation ». *European Journal of Cancer* 42 (10): 1491-1500. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2006.03.007>.

Doyle, Leona A. 2014. « Sarcoma Classification: An Update Based on the 2013 World Health Organization Classification of Tumors of Soft Tissue and Bone: WHO Update of Sarcoma Classification ». *Cancer* 120 (12): 1763-74. <https://doi.org/10.1002/cncr.28657>.

Duffaud, Florence, Gerlinde Egerer, Stefano Ferrari, Hisham Rassam, Ulrike Boecker, et B. Bui-Nguyen. 2012. « A Phase II Trial of Second-Line Pemetrexed in Adults with Advanced/Metastatic Osteosarcoma ». *European Journal of Cancer* 48 (4): 564-70. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2011.12.015>.

Dumars, Clotilde, Jean-Michel Ngyuen, Aurélie Gaultier, Rachel Lanel, Nadège Corradini, François Guoin, Dominique Heymann, et Marie-Françoise Heymann. 2016. « Dysregulation of Macrophage Polarization Is Associated with the Metastatic Process in Osteosarcoma ». *Oncotarget* 7 (48). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13055>.

Ehnman, Monika, Wiem Chaabane, Felix Haglund, et Panagiotis Tsagkosis. 2019. « The Tumor Microenvironment of Pediatric Sarcoma: Mesenchymal Mechanisms Regulating Cell Migration and Metastasis ». *Current Oncology Reports* 21 (10): 90. <https://doi.org/10.1007/s11912-019-0839-6>.

Endo-Munoz, L., A. Cumming, D. Rickwood, D. Wilson, C. Cueva, C. Ng, G. Strutton, et al. 2010. « Loss of Osteoclasts Contributes to Development of Osteosarcoma Pulmonary Metastases ». *Cancer Research* 70 (18): 7063-72. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4291>.

Enomoto, M, S Hayakawa, S Itsukushima, D Y Ren, M Matsuo, K Tamada, C Oneyama, et al. 2009. « Autonomous Regulation of Osteosarcoma Cell Invasiveness by Wnt5a/Ror2 Signaling ». *Oncogene* 28 (36): 3197-3208. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.175>.

Er, Ekrem Emrah, Manuel Valiente, Karuna Ganesh, Yilong Zou, Saloni Agrawal, Jing Hu, Bailey Griscom, et al. 2018. « Pericyte-like Spreading by Disseminated Cancer Cells Activates YAP and MRTF for Metastatic Colonization ». *Nature Cell Biology* 20 (8): 966-78. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0138-8>.

Escoll, Maribel, Diego Lastra, Marta Pajares, Natalia Robledinos-Antón, Ana I. Rojo, Raquel Fernández-Ginés, Marta Mendiola, et al. 2020. « Transcription Factor NRF2 Uses the Hippo Pathway Effector TAZ to Induce Tumorigenesis in Glioblastomas ». *Redox Biology* 30 (février): 101425. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101425>.

Estarás, Conchi, Hui-Ting Hsu, Ling Huang, et Katherine A. Jones. 2017. « YAP Repression of the *WNT3* Gene Controls HESC Differentiation along the Cardiac Mesoderm Lineage ». *Genes & Development* 31 (22): 2250-63. <https://doi.org/10.1101/gad.307512.117>.

Ewton, Daina Z., Jing Hu, Maria Vilenchik, Xiaobing Deng, Kin-chun Luk, Ann Polonskaia, Ann F. Hoffman, Karen Zipf, John F. Boylan, et Eileen A. Friedman. 2011. « Inactivation of Mirk/Dyrk1b Kinase Targets Quiescent Pancreatic Cancer Cells ». *Molecular Cancer Therapeutics* 10 (11): 2104-14. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0498>.

Feng, Helin, Jin Wang, Wei Chen, Baoen Shan, Yin Guo, Jianfa Xu, Ling Wang, Peng Guo, et Yingze Zhang. 2016. « Hypoxia-Induced Autophagy as an Additional Mechanism in Human Osteosarcoma Radioresistance ». *Journal of Bone Oncology* 5 (2): 67-73. <https://doi.org/10.1016/j.jbo.2016.03.001>.

Ferrari, Stefano, Pietro Ruggieri, Graziella Cefalo, Angela Tamburini, Rodolfo Capanna, Franca Fagioli, Alessandro Comandone, et al. 2012. « Neoadjuvant Chemotherapy With Methotrexate, Cisplatin, and Doxorubicin With or Without Ifosfamide in Nonmetastatic Osteosarcoma of the Extremity: An Italian Sarcoma Group Trial ISG/OS-1 ». *Journal of Clinical Oncology* 30 (17): 2112-18. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.38.4420>.

Finch-Edmondson, Megan L., Robyn P. Strauss, Adam M. Passman, Marius Sudol, George C. Yeoh, et Bernard A. Callus. 2015. « TAZ Protein Accumulation Is Negatively Regulated by YAP Abundance in Mammalian Cells ». *Journal of Biological Chemistry* 290 (46): 27928-38. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.692285>.

Fletcher, Georgina C., Maria-del-Carmen Diaz-de-la-Loza, Nerea Borreguero-Muñoz, Maxine Holder, Mario Aguilar-Aragon, et Barry J. Thompson. 2018. « Mechanical Strain Regulates the Hippo Pathway in *Drosophila* ». *Development*, janvier, dev.159467. <https://doi.org/10.1242/dev.159467>.

Freeman, Serena S., Steven W. Allen, Ramapriya Ganti, Jianrong Wu, Jing Ma, Xiaoping Su, Geoff Neale, Jeffrey S. Dome, Najat C. Daw, et Joseph D. Khoury. 2008. « Copy Number Gains in EGFR and Copy Number Losses in PTEN Are Common Events in Osteosarcoma Tumors ». *Cancer* 113 (6): 1453-61. <https://doi.org/10.1002/cncr.23782>.

Fritzsching, Benedikt, Joerg Fellenberg, Linda Moskovszky, Zoltan Sápi, Tibor Krenacs, Isidro Machado, Johannes Poeschl, et al. 2015. « CD8⁺/FOXP3⁺-Ratio in Osteosarcoma Microenvironment Separates Survivors from Non-Survivors: A Multicenter Validated Retrospective Study ». *OncImmunity* 4 (3): e990800. <https://doi.org/10.4161/2162402X.2014.990800>.

Fu, Lina, Yuqiong Hu, Moshi Song, Zunpeng Liu, Weiqi Zhang, Fa-Xing Yu, Jun Wu, et al. 2019. « Up-Regulation of FOXD1 by YAP Alleviates Senescence and Osteoarthritis ». Édité par Weiguo Zou. *PLOS Biology* 17 (4): e3000201. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000201>.

Fujita, Shuji, Taiji Ito, Taketoshi Mizutani, Shigeru Minoguchi, Nobutake Yamamichi, Kouhei Sakurai, et Hideo Iba. 2008. « MiR-21 Gene Expression Triggered by AP-1 Is Sustained through a Double-Negative Feedback Mechanism ». *Journal of Molecular Biology* 378 (3): 492-504. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.03.015>.

Fujiwara, Tomohiro, Takeshi Katsuda, Keitaro Hagiwara, Nobuyoshi Kosaka, Yusuke Yoshioka, Ryou-U Takahashi, Fumitaka Takeshita, et al. 2014. « Clinical Relevance and Therapeutic Significance of MicroRNA-133a Expression Profiles and Functions in Malignant Osteosarcoma-Initiating Cells: Clinical Relevance of MiR-133a in Osteosarcoma-TIC ». *STEM CELLS* 32 (4): 959-73. <https://doi.org/10.1002/stem.1618>.

Gambera, Stefano, Ander Abarrategi, Fernando González-Camacho, Álvaro Morales-Molina, Josep Roma, Arantzazu Alfranca, et Javier García-Castro. 2018. « Clonal Dynamics in Osteosarcoma Defined by RGB Marking ». *Nature Communications* 9 (1): 3994. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06401-z>.

Garnett, Mathew J., Elena J. Edelman, Sonja J. Heidorn, Chris D. Greenman, Anahita Dastur, King Wai Lau, Patricia Greninger, et al. 2012. « Systematic Identification of Genomic Markers of Drug Sensitivity in Cancer Cells ». *Nature* 483 (7391): 570-75. <https://doi.org/10.1038/nature11005>.

Gauthaman, Kalamegam, Fong Chui Yee, Suganya Cheyyatraivendran, Arijit Biswas, Mahesh Choolani, et Ariff Bongso. 2012. « Human Umbilical Cord Wharton's Jelly Stem Cell (HWJSC) Extracts Inhibit Cancer Cell Growth in Vitro ». *Journal of Cellular Biochemistry* 113 (6): 2027-39. <https://doi.org/10.1002/jcb.24073>.

Geller, David S., et Richard Gorlick. 2010. « Osteosarcoma: A Review of Diagnosis, Management, and Treatment Strategies ». *Clinical Advances in Hematology & Oncology: H&O* 8 (10): 705-18.

Geukes Foppen, M.H., M. Donia, I.M. Svane, et J.B.A.G. Haanen. 2015. « Tumor-Infiltrating Lymphocytes for the Treatment of Metastatic Cancer ». *Molecular Oncology* 9 (10): 1918-35. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2015.10.018>.

Gibbs, C. Parker, Valery G. Kukekov, John D. Reith, Olga Tchigrinova, Oleg N. Suslov, Edward W. Scott, Steven C. Ghivizzani, Tatyana N. Ignatova, et Dennis A. Steindler. 2005. « Stem-Like Cells in Bone

Sarcomas: Implications for Tumorigenesis ». *Neoplasia* 7 (11): 967-76.

<https://doi.org/10.1593/neo.05394>.

Gibbs, C. Parker, Padraic P. Levings, et Steven C. Ghivizzani. 2011. « Evidence for the Osteosarcoma Stem Cell ». *Current Orthopaedic Practice* 22 (4): 322-26.

<https://doi.org/10.1097/BCO.0b013e318221aee8>.

Gordon, Michael D., et Roel Nusse. 2006. « Wnt Signaling: Multiple Pathways, Multiple Receptors, and Multiple Transcription Factors ». *The Journal of Biological Chemistry* 281 (32): 22429-33.

<https://doi.org/10.1074/jbc.R600015200>.

Gordon, Siamon, et Fernando O. Martinez. 2010. « Alternative Activation of Macrophages: Mechanism and Functions ». *Immunity* 32 (5): 593-604. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.05.007>.

Greco, Nicholas, Trevor Schott, Xiaodong Mu, Adam Rothenberg, Clifford Voigt, Richard L. McGough III, Mark Goodman, Johnny Huard, et Kurt R. Weiss. 2014. « ALDH Activity Correlates with Metastatic Potential in Primary Sarcomas of Bone ». *Journal of Cancer Therapy* 05 (04): 331-38.

<https://doi.org/10.4236/jct.2014.54040>.

Greten, Florian R., et Sergei I. Grivennikov. 2019. « Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences ». *Immunity* 51 (1): 27-41. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.06.025>.

Grieve, Stacy, Gabriel Wajnberg, Miranda Lees, Simi Chacko, Jackson Weir, Nicolas Crapoulet, et Tony Reiman. 2019. « TAZ Functions as a Tumor Suppressor in Multiple Myeloma by Downregulating MYC ». *Blood Advances* 3 (22): 3613-25. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019000374>.

Grisendi, Giulia, Carlotta Spano, Naomi D'souza, Valeria Rasini, Elena Veronesi, Malvina Prapa, Tiziana Petrachi, et al. 2015. « Mesenchymal Progenitors Expressing TRAIL Induce Apoptosis in Sarcomas: Adipose MSC with TRAIL Target Sarcomas ». *STEM CELLS* 33 (3): 859-69.

<https://doi.org/10.1002/stem.1903>.

Grivennikov, Sergei I. 2013. « Inflammation and Colorectal Cancer: Colitis-Associated Neoplasia ». *Seminars in Immunopathology* 35 (2): 229-44. <https://doi.org/10.1007/s00281-012-0352-6>.

Gronke, Konrad, Pedro P. Hernández, Jakob Zimmermann, Christoph S. N. Klose, Michael Kofoed-Branzk, Fabian Guendel, Mario Witkowski, et al. 2019. « Interleukin-22 Protects Intestinal Stem Cells against Genotoxic Stress ». *Nature* 566 (7743): 249-53. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0899-7>.

Guan, Guofeng, Yinglong Zhang, Yao Lu, Lijuan Liu, Doufei Shi, Yanhua Wen, Lianjia Yang, et al. 2015. « The HIF-1 α /CXCR4 Pathway Supports Hypoxia-Induced Metastasis of Human Osteosarcoma Cells ». *Cancer Letters* 357 (1): 254-64. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.11.034>.

Gundogdu et Hergovich. 2019. « MOB (Mps One Binder) Proteins in the Hippo Pathway and Cancer ». *Cells* 8 (6): 569. <https://doi.org/10.3390/cells8060569>.

Guo, Xiaodong, Ling Yu, Zhengpei Zhang, Guo Dai, Tian Gao, et Weichun Guo. 2017. « MiR-335 Negatively Regulates Osteosarcoma Stem Cell-like Properties by Targeting POU5F1 ». *Cancer Cell International* 17 (1): 29. <https://doi.org/10.1186/s12935-017-0398-6>.

Guo, Yi, Elyssa M. Rubin, Jun Xie, Xiaolin Zi, et Bang H. Hoang. 2008. « Dominant Negative LRP5 Decreases Tumorigenicity and Metastasis of Osteosarcoma in an Animal Model ». *Clinical Orthopaedics and Related Research* 466 (9): 2039-45. <https://doi.org/10.1007/s11999-008-0344-y>.

Guo, Yi, Xiaolin Zi, Zach Koontz, Alison Kim, Jun Xie, Richard Gorlick, Randall F. Holcombe, et Bang H. Hoang. 2007. « Blocking Wnt/LRP5 Signaling by a Soluble Receptor Modulates the Epithelial to Mesenchymal Transition and Suppresses Met and Metalloproteinases in Osteosarcoma Saos-2 Cells ». *Journal of Orthopaedic Research* 25 (7): 964-71. <https://doi.org/10.1002/jor.20356>.

Han, Qinglin, Hongguang Shi, et Fan Liu. 2016. « CD163 + M2-Type Tumor-Associated Macrophage Support the Suppression of Tumor-Infiltrating T Cells in Osteosarcoma ». *International Immunopharmacology* 34 (mai): 101-6. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.01.023>.

Han, Yu, Wei Guo, Tingting Ren, Yi Huang, Shidong Wang, Kuisheng Liu, Bingxin Zheng, Kang Yang, Hongliang Zhang, et Xin Liang. 2019. « Tumor-Associated Macrophages Promote Lung Metastasis and Induce Epithelial-Mesenchymal Transition in Osteosarcoma by Activating the COX-2/STAT3 Axis ». *Cancer Letters* 440-441 (janvier): 116-25. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.10.011>.

Hattinger, Claudia M., Giuseppina Stoico, Francesca Michelacci, Michela Pasello, Isabella Scionti, Daniel Remondini, Gastone C. Castellani, et al. 2009. « Mechanisms of Gene Amplification and Evidence of Coamplification in Drug-Resistant Human Osteosarcoma Cell Lines ». *Genes, Chromosomes and Cancer* 48 (4): 289-309. <https://doi.org/10.1002/gcc.20640>.

Hattinger, Claudia Maria, Marilù Fanelli, Elisa Tavanti, Serena Vella, Stefano Ferrari, Piero Picci, et Massimo Serra. 2015. « Advances in Emerging Drugs for Osteosarcoma ». *Expert Opinion on Emerging Drugs* 20 (3): 495-514. <https://doi.org/10.1517/14728214.2015.1051965>.

He, Chunlei, Jianyi Xiong, Xiaoping Xu, Wei Lu, Lijun Liu, Deming Xiao, et Daping Wang. 2009. « Functional Elucidation of MiR-34 in Osteosarcoma Cells and Primary Tumor Samples ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 388 (1): 35-40. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.07.101>.

Heymann, D., B. Ory, F. Blanchard, M-F. Heymann, P. Coipeau, C. Charrier, S. Couillaud, J.P. Thiery, F. Gouin, et F. Redini. 2005. « Enhanced Tumor Regression and Tissue Repair When Zoledronic Acid Is Combined with Ifosfamide in Rat Osteosarcoma ». *Bone* 37 (1): 74-86. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2005.02.020>.

Heymann, Marie-Françoise, Hannah K. Brown, et Dominique Heymann. 2016. « Drugs in Early Clinical Development for the Treatment of Osteosarcoma ». *Expert Opinion on Investigational Drugs* 25 (11): 1265-80. <https://doi.org/10.1080/13543784.2016.1237503>.

Hinrichs, Christian S., et Steven A. Rosenberg. 2014. « Exploiting the Curative Potential of Adoptive T-Cell Therapy for Cancer ». *Immunological Reviews* 257 (1): 56-71. <https://doi.org/10.1111/imr.12132>.

Hirahata, Mio, Mitsuhiro Osaki, Yusuke Kanda, Yui Sugimoto, Yusuke Yoshioka, Nobuyoshi Kosaka, Fumitaka Takeshita, et al. 2016. « PAI -1, a Target Gene of MiR-143, Regulates Invasion and Metastasis by Upregulating MMP -13 Expression of Human Osteosarcoma ». *Cancer Medicine* 5 (5): 892-902. <https://doi.org/10.1002/cam4.651>.

Hofschröer, Verena, Kevin Alexander Koch, Florian Timo Ludwig, Peter Friedl, Hans Oberleithner, Christian Stock, et Albrecht Schwab. 2017. « Extracellular Protonation Modulates Cell-Cell Interaction Mechanics and Tissue Invasion in Human Melanoma Cells ». *Scientific Reports* 7 (février): 42369. <https://doi.org/10.1038/srep42369>.

Honoki. 2010. « Possible involvement of stem-like populations with elevated ALDH1 in sarcomas for chemotherapeutic drug resistance ». *Oncology Reports* 24 (2). https://doi.org/10.3892/or_00000885.

Hotfilder, Marc, Nikhil Mallela, Jochen Seggewiß, Uta Dirksen, et Eberhard Korsching. 2018. « Defining a Characteristic Gene Expression Set Responsible for Cancer Stem Cell-Like Features in a Sub-Population of Ewing Sarcoma Cells CADO-ES1 ». *International Journal of Molecular Sciences* 19 (12): 3908. <https://doi.org/10.3390/ijms19123908>.

Hou, Chun-Han, Rong-sen Yang, et Ya-Ting Tsao. 2018. « Connective Tissue Growth Factor Stimulates Osteosarcoma Cell Migration and Induces Osteosarcoma Metastasis by Upregulating VCAM-1 Expression ». *Biochemical Pharmacology* 155 (septembre): 71-81. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.06.015>.

Hu, M., G. Peluffo, H. Chen, R. Gelman, S. Schnitt, et K. Polyak. 2009. « Role of COX-2 in Epithelial-Stromal Cell Interactions and Progression of Ductal Carcinoma in Situ of the Breast ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (9): 3372-77. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813306106>.

Huang, Yugang, Xiuwen Chen, Li Wang, Tieyan Wang, Xianbin Tang, et Xiaomin Su. 2021. « Centromere Protein F (CENPF) Serves as a Potential Prognostic Biomarker and Target for Human Hepatocellular Carcinoma ». *Journal of Cancer* 12 (10): 2933-51. <https://doi.org/10.7150/jca.52187>.

Hughes, Dennis P. M. 2009. « How the NOTCH Pathway Contributes to the Ability of Osteosarcoma Cells to Metastasize ». In *Pediatric and Adolescent Osteosarcoma*, édité par Norman Jaffe, Oyvind S. Bruland, et Stefan Bielack, 152:479-96. Cancer Treatment and Research. Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0284-9_28.

Hugo, Honor J., Stephanie Leuret, Eva Tomaskovic-Crook, Nuzhat Ahmed, Tony Blick, Donald F. Newgreen, Erik W. Thompson, et M. Leigh Ackland. 2012. « Contribution of Fibroblast and Mast Cell (Afferent) and Tumor (Efferent) IL-6 Effects within the Tumor Microenvironment ». *Cancer Microenvironment* 5 (1): 83-93. <https://doi.org/10.1007/s12307-012-0098-7>.

Ibáñez, Lidia, Grazia Abou-Ezzi, Thomas Ciucci, Vanessa Amiot, Nourhène Belaïd, Dorian Obino, Anna Mansour, Matthieu Rouleau, Abdelilah Wakkach, et Claudine Blin-Wakkach. 2016. « Inflammatory Osteoclasts Prime TNF α -Producing CD4⁺ T Cells and Express CX₃CR1: OSTEOCLAST IMMUNOMODULATORY FUNCTION SWITCHES UPON INFLAMMATION ». *Journal of Bone and Mineral Research* 31 (10): 1899-1908. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2868>.

Imajo, Masamichi, Koichi Miyatake, Akira Imura, Atsumu Miyamoto, et Eisuke Nishida. 2012. « A Molecular Mechanism That Links Hippo Signalling to the Inhibition of Wnt/ β -Catenin Signalling: Hippo Signalling Regulates β -Catenin Localization ». *The EMBO Journal* 31 (5): 1109-22. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.487>.

Inagaki, Y., E. Hookway, K. A. Williams, A. B. Hassan, U. Oppermann, Y. Tanaka, E. Soilleux, et N. A. Athanasou. 2016. « Dendritic and Mast Cell Involvement in the Inflammatory Response to Primary Malignant Bone Tumours ». *Clinical Sarcoma Research* 6 (1): 13. <https://doi.org/10.1186/s13569-016-0053-3>.

Iwaya, Keiichi, Hitoshi Ogawa, Masahiko Kuroda, Miki Izumi, Tsuyoshi Ishida, et Kiyoshi Mukai. 2003. « Cytoplasmic and/or Nuclear Staining of Beta-Catenin Is Associated with Lung Metastasis ». *Clinical & Experimental Metastasis* 20 (6): 525-29. <https://doi.org/10.1023/a:1025821229013>.

Jambhekar, Na, Ss Desai, N Krishnamoorthy, et B Rekhi. 2011. « A Clinico-Morphological Study of 95 Cases of Sarcomas with Metastases to the Lungs ». *Indian Journal of Cancer* 48 (3): 335. <https://doi.org/10.4103/0019-509X.84942>.

Jin, Hua, Song Luo, Yun Wang, Chang Liu, Zhenghao Piao, Meng Xu, Wei Guan, et al. 2017. « MiR-135b Stimulates Osteosarcoma Recurrence and Lung Metastasis via Notch and Wnt/ β -Catenin Signaling ». *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 8 (septembre): 111-22. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.06.008>.

Johnson, Rachelle W., Ernestina Schipani, et Amato J. Giaccia. 2015. « HIF Targets in Bone Remodeling and Metastatic Disease ». *Pharmacology & Therapeutics* 150 (juin): 169-77.

<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.02.002>.

Jones, Peter A., et Stephen B. Baylin. 2007. « The Epigenomics of Cancer ». *Cell* 128 (4): 683-92. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.029>.

Kang, M. H., J. Wang, M. R. Makena, J.-S. Lee, N. Paz, C. P. Hall, M. M. Song, et al. 2015. « Activity of MM-398, Nanoliposomal Irinotecan (Nal-IRI), in Ewing's Family Tumor Xenografts Is Associated with High Exposure of Tumor to Drug and High SLFN11 Expression ». *Clinical Cancer Research* 21 (5): 1139-50. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-1882>.

Kansara, Maya, Michael Tsang, Laurent Kodjabachian, Natalie A. Sims, Melanie K. Trivett, Mathias Ehrich, Alexander Dobrovic, et al. 2009. « Wnt Inhibitory Factor 1 Is Epigenetically Silenced in Human Osteosarcoma, and Targeted Disruption Accelerates Osteosarcomagenesis in Mice ». *Journal of Clinical Investigation* 119 (4): 837-51. <https://doi.org/10.1172/JCI37175>.

Karin, Michael. 2006. « Nuclear Factor- κ B in Cancer Development and Progression ». *Nature* 441 (7092): 431-36. <https://doi.org/10.1038/nature04870>.

Kerr, Darcy A., Hector U. Lopez, Vikram Deshpande, Francis J. Hornicek, Zhenfeng Duan, Yaxia Zhang, Andrew E. Rosenberg, Darrel R. Borger, et G. Petur Nielsen. 2013. « Molecular Distinction of Chondrosarcoma From Chondroblastic Osteosarcoma Through IDH1/2 Mutations ». *American Journal of Surgical Pathology* 37 (6): 787-95. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e31827ab703>.

Khakoo, Aarif Y., Shibani Pati, Stasia A. Anderson, William Reid, Mohamed F. Elshal, Ilsa I. Rovira, Ahn T. Nguyen, et al. 2006. « Human Mesenchymal Stem Cells Exert Potent Antitumorigenic Effects in a Model of Kaposi's Sarcoma ». *Journal of Experimental Medicine* 203 (5): 1235-47. <https://doi.org/10.1084/jem.20051921>.

Khan, Imran S., Maria L. Mouchess, Meng-Lei Zhu, Bridget Conley, Kayla J. Fasano, Yafei Hou, Lawrence Fong, Maureen A. Su, et Mark S. Anderson. 2014. « Enhancement of an Anti-Tumor Immune Response by Transient Blockade of Central T Cell Tolerance ». *Journal of Experimental Medicine* 211 (5): 761-68. <https://doi.org/10.1084/jem.20131889>.

Khanna, C., J. Khan, P. Nguyen, J. Prehn, J. Caylor, C. Yeung, J. Trepel, P. Meltzer, et L. Helman. 2001. « Metastasis-Associated Differences in Gene Expression in a Murine Model of Osteosarcoma ». *Cancer Research* 61 (9): 3750-59.

Khanna, C., J. Prehn, C. Yeung, J. Caylor, M. Tsokos, et L. Helman. 2000. « An Orthotopic Model of Murine Osteosarcoma with Clonally Related Variants Differing in Pulmonary Metastatic Potential ». *Clinical & Experimental Metastasis* 18 (3): 261-71. <https://doi.org/10.1023/a:1006767007547>.

Kietzmann, Thomas. 2019. « Liver Zonation in Health and Disease: Hypoxia and Hypoxia-Inducible Transcription Factors as Concert Masters ». *International Journal of Molecular Sciences* 20 (9): 2347. <https://doi.org/10.3390/ijms20092347>.

Kim, Bo Hye, Do Yeon Kim, Sumin Oh, Je Yeong Ko, Gyuyeong Rah, Kyung Hyun Yoo, et Jong Hoon Park. 2019. « Deficiency of Calpain-6 Inhibits Primary Ciliogenesis ». *BMB Reports* 52 (10): 619-24. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2019.52.10.182>.

Kleinerman, E. S., K. L. Erickson, A. J. Schroit, W. E. Fogler, et I. J. Fidler. 1983. « Activation of Tumoricidal Properties in Human Blood Monocytes by Liposomes Containing Lipophilic Muramyl Tripeptide ». *Cancer Research* 43 (5): 2010-14.

Kleinschmidt, Markus A., Petra de Graaf, Hetty A. A. M. van Teeffelen, et H. Th. Marc Timmers. 2012. « Cell Cycle Regulation by the PRMT6 Arginine Methyltransferase through Repression of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors ». Édité par Axel Imhof. *PLoS ONE* 7 (8): e41446. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041446>.

Koirala, Pratistha, Michael E. Roth, Jonathan Gill, Sajida Piperdi, Jordan M. Chinai, David S. Geller, Bang H. Hoang, et al. 2016. « Immune Infiltration and PD-L1 Expression in the Tumor Microenvironment Are Prognostic in Osteosarcoma ». *Scientific Reports* 6 (1): 30093. <https://doi.org/10.1038/srep30093>.

Kolosenko, Iryna, Sofia Avnet, Nicola Baldini, Jenny Viklund, et Angelo De Milito. 2017. « Therapeutic Implications of Tumor Interstitial Acidification ». *Seminars in Cancer Biology* 43 (avril): 119-33. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.01.008>.

Korpi, Jarkko T., Jaana Hagström, Niko Lehtonen, Jyrki Parkkinen, Timo Sorsa, Tuula Salo, et Minna Laitinen. 2011. « Expression of Matrix Metalloproteinases-2, -8, -13, -26, and Tissue Inhibitors of Metalloproteinase-1 in Human Osteosarcoma ». *Surgical Oncology* 20 (1): e18-22. <https://doi.org/10.1016/j.suronc.2010.08.004>.

Kovac, Michal, Claudia Blattmann, Sebastian Ribi, Jan Smida, Nikola S. Mueller, Florian Engert, Francesc Castro-Giner, et al. 2015. « Exome Sequencing of Osteosarcoma Reveals Mutation Signatures Reminiscent of BRCA Deficiency ». *Nature Communications* 6 (1): 8940. <https://doi.org/10.1038/ncomms9940>.

Kovar, Heinrich, Lisa Bierbaumer, et Branka Radic-Sarikas. 2020. « The YAP/TAZ Pathway in Osteogenesis and Bone Sarcoma Pathogenesis ». *Cells* 9 (4): 972. <https://doi.org/10.3390/cells9040972>.

Kudawara, Ikuo, Yasuaki Aoki, Takafumi Ueda, Nobuhito Araki, Norifumi Naka, Hirofumi Nakanishi, Akihiko Matsumine, et al. 2013. « Neoadjuvant and Adjuvant Chemotherapy with High-Dose Ifosfamide, Doxorubicin, Cisplatin and High-Dose Methotrexate in Non-Metastatic Osteosarcoma of the Extremities: A Phase II Trial in Japan ». *Journal of Chemotherapy* 25 (1): 41-48. <https://doi.org/10.1179/1973947812Y.0000000055>.

Kundu, ZileSingh. 2014. « Classification, Imaging, Biopsy and Staging of Osteosarcoma ». *Indian Journal of Orthopaedics* 48 (3): 238. <https://doi.org/10.4103/0019-5413.132491>.

Kun-Peng, Zhu, Zhang Chun-Lin, Ma Xiao-Long, et Zhang Lei. 2019. « Fibronectin-1 Modulated by the Long Noncoding RNA OIP5-AS1/MiR-200b-3p Axis Contributes to Doxorubicin Resistance of Osteosarcoma Cells ». *Journal of Cellular Physiology* 234 (5): 6927-39. <https://doi.org/10.1002/jcp.27435>.

Kwon, C H, H J Park, J R Lee, H K Kim, T Y Jeon, H-J Jo, D H Kim, G H Kim, et D Y Park. 2014. « Serpin Peptidase Inhibitor Clade A Member 1 Is a Biomarker of Poor Prognosis in Gastric Cancer ». *British Journal of Cancer* 111 (10): 1993-2002. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.490>.

La Noce, Marcella, Francesca Paino, Luigi Mele, Gianpaolo Papaccio, Tarik Regad, Angela Lombardi, Federica Papaccio, Vincenzo Desiderio, et Virginia Tirino. 2018. « HDAC2 Depletion Promotes Osteosarcoma's Stemness Both in Vitro and in Vivo: A Study on a Putative New Target for CSCs Directed Therapy ». *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 37 (1): 296.

<https://doi.org/10.1186/s13046-018-0978-x>.

Lambert, Arthur W., Diwakar R. Pattabiraman, et Robert A. Weinberg. 2017. « Emerging Biological Principles of Metastasis ». *Cell* 168 (4): 670-91. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.037>.

Lamoureux, F., P. Richard, Y. Wittrant, S. Battaglia, P. Pilet, V. Trichet, F. Blanchard, et al. 2007. « Therapeutic Relevance of Osteoprotegerin Gene Therapy in Osteosarcoma: Blockade of the Vicious Cycle between Tumor Cell Proliferation and Bone Resorption ». *Cancer Research* 67 (15): 7308-18. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4130>.

Lawal, Rialnat A, Xichao Zhou, Kaylind Batey, Corey M Hoffman, Mary A Georger, Freddy Radtke, Matthew J Hilton, Lianping Xing, Benjamin J Frisch, et Laura M Calvi. 2017. « The Notch Ligand Jagged1 Regulates the Osteoblastic Lineage by Maintaining the Osteoprogenitor Pool: JAGGED1 REGULATES OSTEOBLASTIC LINEAGE BY MAINTAINING OSTEOPROGENITOR POOL ». *Journal of Bone and Mineral Research* 32 (6): 1320-31. <https://doi.org/10.1002/jbmr.3106>.

Lawson, Devon A., Nirav R. Bhakta, Kai Kessenbrock, Karin D. Prummel, Ying Yu, Ken Takai, Alicia Zhou, et al. 2015. « Single-Cell Analysis Reveals a Stem-Cell Program in Human Metastatic Breast Cancer Cells ». *Nature* 526 (7571): 131-35. <https://doi.org/10.1038/nature15260>.

Lawson, Devon A., Kai Kessenbrock, Ryan T. Davis, Nicholas Pervolarakis, et Zena Werb. 2018. « Tumour Heterogeneity and Metastasis at Single-Cell Resolution ». *Nature Cell Biology* 20 (12): 1349-60. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0236-7>.

LeBlanc, Lucy, Nereida Ramirez, et Jonghwan Kim. 2021. « Context-Dependent Roles of YAP/TAZ in Stem Cell Fates and Cancer ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 78 (9): 4201-19. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03781-2>.

Lee, Dung-Fang, Jie Su, Huen Suk Kim, Betty Chang, Dmitri Papatsenko, Ruiying Zhao, Ye Yuan, et al. 2015. « Modeling Familial Cancer with Induced Pluripotent Stem Cells ». *Cell* 161 (2): 240-54. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.045>.

Lee, Jae W., Meredith L. Stone, Paige M. Porrett, Stacy K. Thomas, Chad A. Komar, Joey H. Li, Devora Delman, et al. 2019. « Hepatocytes Direct the Formation of a Pro-Metastatic Niche in the Liver ». *Nature* 567 (7747): 249-52. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1004-y>.

Lee, S.-J., Y.-L. Choi, E.-J. Lee, B.-G. Kim, D.-S. Bae, G. H. Ahn, et J.-H. Lee. 2007. « Increased Expression of Calpain 6 in Uterine Sarcomas and Carcinosarcomas: An Immunohistochemical Analysis ». *International Journal of Gynecologic Cancer* 17 (1): 248-53. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1438.2006.00756.x>.

Lee, Sun-Joo, Byoung-Gie Kim, Yoon-La Choi, et Jeong-Won Lee. 2008. « Increased Expression of Calpain 6 during the Progression of Uterine Cervical Neoplasia: Immunohistochemical Analysis ». *Oncology Reports* 19 (4): 859-63.

Lei, Yong, Chen Junxin, Huang Yongcan, Liu Xiaoguang, et Yu Binsheng. 2020. « Role of MicroRNAs in the Crosstalk between Osteosarcoma Cells and the Tumour Microenvironment ». *Journal of Bone Oncology* 25 (décembre): 100322. <https://doi.org/10.1016/j.jbo.2020.100322>.

- Li, Binghao, et Zhaoming Ye. 2014. « Epigenetic Alterations in Osteosarcoma: Promising Targets ». *Molecular Biology Reports* 41 (5): 3303-15. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3193-7>.
- Li, Kun, Jiwei Guo, Yan Wu, Dan Jin, Hong Jiang, Chengxia Liu, et Chengyong Qin. 2018. « Suppression of YAP by DDP disrupts colon tumor progression ». *Oncology Reports*, mars. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6297>.
- Li, Minjing, Jinliang Chen, Xiaofei Yu, Sen Xu, Defang Li, Qiusheng Zheng, et Yancun Yin. 2019. « Myricetin Suppresses the Propagation of Hepatocellular Carcinoma via Down-Regulating Expression of YAP ». *Cells* 8 (4): 358. <https://doi.org/10.3390/cells8040358>.
- Li, Zheng, Xingye Li, Derong Xu, Xin Chen, Shugang Li, Lin Zhang, Matthew T. V. Chan, et William K. K. Wu. 2021. « An Update on the Roles of Circular RNAs in Osteosarcoma ». *Cell Proliferation* 54 (1). <https://doi.org/10.1111/cpr.12936>.
- Lin, P. P., M. K. Pandey, F. Jin, A.K. Raymond, H. Akiyama, et G. Lozano. 2009. « Targeted Mutation of P53 and Rb in Mesenchymal Cells of the Limb Bud Produces Sarcomas in Mice ». *Carcinogenesis* 30 (10): 1789-95. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp180>.
- Lindsey, Brock A., Justin E. Markel, et Eugenie S. Kleinerman. 2017. « Osteosarcoma Overview ». *Rheumatology and Therapy* 4 (1): 25-43. <https://doi.org/10.1007/s40744-016-0050-2>.
- Ling, Ling, Si Kee Tan, Ting Hwee Goh, Edwin Cheung, Victor Nurcombe, Andre J. van Wijnen, et Simon M. Cool. 2015. « Targeting the Heparin-Binding Domain of Fibroblast Growth Factor Receptor 1 as a Potential Cancer Therapy ». *Molecular Cancer* 14 (1): 136. <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0391-4>.
- Linke, Monika, Stephanie Deborah Fritsch, Nyamdelger Sukhbaatar, Markus Hengstschläger, et Thomas Weichhart. 2017. « MTORC1 and MTORC2 as Regulators of Cell Metabolism in Immunity ». *FEBS Letters* 591 (19): 3089-3103. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12711>.
- Lis, Raphael, Cyril Touboul, Pejman Mirshahi, Fadoua Ali, Sharon Mathew, Daniel J. Nolan, Mahtab Maleki, et al. 2011. « Tumor Associated Mesenchymal Stem Cells Protects Ovarian Cancer Cells from Hyperthermia through CXCL12 ». *International Journal of Cancer* 128 (3): 715-25. <https://doi.org/10.1002/ijc.25619>.
- Liu, Ling-Yan, Xiao-Qiong Shan, Fu-Kun Zhang, Xiao-Fang Fan, Jun-Ming Fan, Yong-Yu Wang, Shu-Liu Sun, Zhong-Mao, et Yong-Sheng Gong. 2020. « YAP activity protects against endotoxemic acute lung injury by activating multiple mechanisms ». *International Journal of Molecular Medicine* 46 (6): 2235-50. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2020.4759>.
- Liu, Tao, Xuan-Cheng Fang, Zhen Ding, Ze-Gan Sun, Li-Ming Sun, et Yi-Lian Wang. 2015. « Pre-Operative Lymphocyte-to-Monocyte Ratio as a Predictor of Overall Survival in Patients Suffering from Osteosarcoma ». *FEBS Open Bio* 5 (1): 682-87. <https://doi.org/10.1016/j.fob.2015.08.002>.
- Liu, Yonglei, Chuanzhong Mei, Lidong Sun, Xin Li, Mingzhu Liu, Liying Wang, Zengxia Li, et al. 2011. « The PI3K-Akt Pathway Regulates Calpain 6 Expression, Proliferation, and Apoptosis ». *Cellular Signalling* 23 (5): 827-36. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.01.005>.
- Liu, Yonglei, Yutong Wang, Xiangjun Sun, Chuanzhong Mei, Liying Wang, Zengxia Li, et Xiliang Zha. 2016. « MiR-449a Promotes Liver Cancer Cell Apoptosis by Downregulation of Calpain 6 and POU2F1 ». *Oncotarget* 7 (12): 13491-501. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4821>.

Liu, Zhenguo, Junqiang Yin, Qian Zhou, Jiali Yang, Bo Zeng, Sai-Ching J. Yeung, Jingnan Shen, et Chao Cheng. 2020. « Survival after Pulmonary Metastasectomy for Relapsed Osteosarcoma ». *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, novembre, S0022522320330968. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2020.10.137>.

Lourenco, Sofia, Vitor H. Teixeira, Tammy Kalber, Ricardo J. Jose, R. Andres Floto, et Sam M. Janes. 2015. « Macrophage Migration Inhibitory Factor–CXCR4 Is the Dominant Chemotactic Axis in Human Mesenchymal Stem Cell Recruitment to Tumors ». *The Journal of Immunology* 194 (7): 3463-74. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402097>.

Lu, Bei-Ji, Yun-Qing Wang, Xue-Jie Wei, Liang-Qun Rong, Dong Wei, Chang-Ming Yan, Deng-Jie Wang, et Jun-Ying Sun. 2012. « Expression of WNT-5a and ROR2 Correlates with Disease Severity in Osteosarcoma ». *Molecular Medicine Reports* 5 (4): 1033-36. <https://doi.org/10.3892/mmr.2012.772>.

Lu, J, G Song, Q Tang, J Yin, C Zou, Z Zhao, X Xie, et al. 2017. « MiR-26a Inhibits Stem Cell-like Phenotype and Tumor Growth of Osteosarcoma by Targeting Jagged1 ». *Oncogene* 36 (2): 231-41. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.194>.

Lu, Yao, Guo-Feng Guan, Jie Chen, Bin Hu, Cong Sun, Qiong Ma, Yan-Hua Wen, Xiu-Chun Qiu, et Yong Zhou. 2015. « Aberrant CXCR4 and β -Catenin Expression in Osteosarcoma Correlates with Patient Survival ». *Oncology Letters* 10 (4): 2123-29. <https://doi.org/10.3892/ol.2015.3535>.

Lussier, Danielle M., Lauren O'Neill, Lizbeth M. Nieves, Megan S. McAfee, Susan A. Holechek, Andrea W. Collins, Paul Dickman, Jeffrey Jacobsen, Pooja Hingorani, et Joseph N. Blattman. 2015. « Enhanced T-Cell Immunity to Osteosarcoma Through Antibody Blockade of PD-1/PD-L1 Interactions ». *Journal of Immunotherapy* 38 (3): 96-106. <https://doi.org/10.1097/CJI.000000000000065>.

Luu, Anita K., Courtney R. Schott, Robert Jones, Andrew C. Poon, Brandon Golding, Roa'a Hamed, Benjamin Deheshi, Anthony Mutsaers, Geoffrey A. Wood, et Alicia M. Vilorio-Petit. 2018. « An Evaluation of TAZ and YAP Crosstalk with TGF β Signalling in Canine Osteosarcoma Suggests Involvement of Hippo Signalling in Disease Progression ». *BMC Veterinary Research* 14 (1): 365. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1651-5>.

Ma, Kai, Qing Xu, Shuren Wang, Weina Zhang, Mei Liu, Shufang Liang, Hongxia Zhu, et Ningzhi Xu. 2016. « Nuclear Accumulation of Yes-Associated Protein (YAP) Maintains the Survival of Doxorubicin-Induced Senescent Cells by Promoting Survivin Expression ». *Cancer Letters* 375 (1): 84-91. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.02.045>.

MacEwen, E. G., I. D. Kurzman, R. C. Rosenthal, B. W. Smith, P. A. Manley, J. K. Roush, et P. E. Howard. 1989. « Therapy for Osteosarcoma in Dogs with Intravenous Injection of Liposome-Encapsulated Muramyl Tripeptide ». *Journal of the National Cancer Institute* 81 (12): 935-38. <https://doi.org/10.1093/jnci/81.12.935>.

Macherey, Sascha, Khosro Hekmat, Kourosh Zarghooni, Fabian Doerr, Matthias Heldwein, et Thorsten Wahlers. 2017. « Lungenmetastasen Chirurgie bei Patienten mit fortgeschrittenen Weichteil- und Osteosarkomen ». *Zeitschrift für Orthopädie und Unfallchirurgie* 155 (05): 567-74. <https://doi.org/10.1055/s-0043-110010>.

Macklin, Rebecca, Haolu Wang, Dorothy Loo, Sally Martin, Andrew Cumming, Na Cai, Rebecca Lane, et al. 2016a. « Extracellular Vesicles Secreted by Highly Metastatic Clonal Variants of Osteosarcoma

Preferentially Localize to the Lungs and Induce Metastatic Behaviour in Poorly Metastatic Clones ». *Oncotarget* 7 (28): 43570-87. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9781>.

— — —. 2016b. « Extracellular Vesicles Secreted by Highly Metastatic Clonal Variants of Osteosarcoma Preferentially Localize to the Lungs and Induce Metastatic Behaviour in Poorly Metastatic Clones ». *Oncotarget* 7 (28): 43570-87. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9781>.

Maldegem, Annemiek M. van, Judith V.M.G. Bovée, Elleke F.P. Peterse, Pancras C.W. Hogendoorn, et Hans Gelderblom. 2016. « Ewing Sarcoma: The Clinical Relevance of the Insulin-like Growth Factor 1 and the Poly-ADP-Ribose-Polymerase Pathway ». *European Journal of Cancer* 53 (janvier): 171-80. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2015.09.009>.

Malladi, Srinivas, Danilo G. Macalinao, Xin Jin, Lan He, Harihar Basnet, Yilong Zou, Elisa de Stanchina, et Joan Massagué. 2016. « Metastatic Latency and Immune Evasion through Autocrine Inhibition of WNT ». *Cell* 165 (1): 45-60. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.025>.

Malladi, Srinivas, Danilo G. Macalinao, Xin Jin, Lan He, Harihar Basnet, Yilong Zou, Elisa de Stanchina, et Joan Massagué. 2016. « Metastatic Latency and Immune Evasion through Autocrine Inhibition of WNT ». *Cell* 165 (1): 45-60. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.025>.

Maloney, Caroline, Michelle P. Kallis, Morris Edelman, Christopher Tzanavaris, Martin Lesser, Samuel Z. Soffer, Marc Symons, et Bettie M. Steinberg. 2020. « Gefitinib Inhibits Invasion and Metastasis of Osteosarcoma via Inhibition of Macrophage Receptor Interacting Serine-Threonine Kinase 2 ». *Molecular Cancer Therapeutics* 19 (6): 1340-50. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-19-0903>.

Marco, Rex A. W., C. Marcela Díaz-Montero, James N. Wygant, Eugenie S. Kleinerman, et Bradley W. McIntyre. 2003. « A4 Integrin Increases Anoikis of Human Osteosarcoma Cells: A4 Integrin in Anoikis of Osteosarcoma ». *Journal of Cellular Biochemistry* 88 (5): 1038-47. <https://doi.org/10.1002/jcb.10465>.

Marion, Allison, François-Xavier Dieudonné, Ana Patiño-Garcia, Fernando Lecanda, Pierre J. Marie, et Dominique Modrowski. 2012. « Calpain-6 Is an Endothelin-1 Signaling Dependent Protective Factor in Chemoresistant Osteosarcoma ». *International Journal of Cancer* 130 (11): 2514-25. <https://doi.org/10.1002/ijc.26246>.

Martin, Jeff W., Jeremy A. Squire, et Maria Zielenska. 2012. « The Genetics of Osteosarcoma ». *Sarcoma* 2012: 1-11. <https://doi.org/10.1155/2012/627254>.

Massagué, Joan, et Anna C. Obenauf. 2016. « Metastatic Colonization by Circulating Tumour Cells ». *Nature* 529 (7586): 298-306. <https://doi.org/10.1038/nature17038>.

Matheson, Christopher J., Donald S. Backos, et Philip Reigan. 2016. « Targeting WEE1 Kinase in Cancer ». *Trends in Pharmacological Sciences* 37 (10): 872-81. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.06.006>.

Maximov, Vadim V, et Rami I Aqeilan. 2016. « Genetic Factors Conferring Metastasis in Osteosarcoma ». *Future Oncology* 12 (13): 1623-44. <https://doi.org/10.2217/fon-2016-0014>.

Mazumdar, Alekhya, Joaquin Urdinez, Aleksandar Boro, Matthias J. E. Arlt, Fabian E. Egli, Barbara Niederöst, Patrick K. Jaeger, et al. 2020. « Exploring the Role of Osteosarcoma-Derived Extracellular Vesicles in Pre-Metastatic Niche Formation and Metastasis in the 143-B Xenograft Mouse Osteosarcoma Model ». *Cancers* 12 (11): 3457. <https://doi.org/10.3390/cancers12113457>.

Mazumdar, Alekhya, Joaquin Urdinez, Aleksandar Boro, Jessica Migliavacca, Matthias J.E. Arlt, Roman Muff, Bruno Fuchs, Jess Gerrit Snedeker, et Ana Gvozdenovic. 2020. « Osteosarcoma-Derived Extracellular Vesicles Induce Lung Fibroblast Reprogramming ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (15): 5451. <https://doi.org/10.3390/ijms21155451>.

McEachron, Troy A, Timothy J Triche, Laurie Sorenson, David M Parham, et John D Carpten. 2018.

« Profiling Targetable Immune Checkpoints in Osteosarcoma ». *Oncotarget* 7 (12): e1475873.

<https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1475873>.

McGranahan, Nicholas, et Charles Swanton. 2017. « Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future ». *Cell* 168 (4): 613-28. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.01.018>.

Meinhardt, Gudrun, Sandra Haider, Victoria Kunihs, Leila Saleh, Jürgen Pollheimer, Christian Fiala, Szabolcs Hetey, et al. 2020. « Pivotal Role of the Transcriptional Co-Activator YAP in Trophoblast Stemness of the Developing Human Placenta ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117 (24): 13562-70. <https://doi.org/10.1073/pnas.2002630117>.

Meyers, Paul A., Cindy L. Schwartz, Mark D. Krailo, John H. Healey, Mark L. Bernstein, Donna Betcher, William S. Ferguson, et al. 2008. « Osteosarcoma: The Addition of Muramyl Tripeptide to Chemotherapy Improves Overall Survival—A Report From the Children’s Oncology Group ». *Journal of Clinical Oncology* 26 (4): 633-38. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.14.0095>.

Minami, Kanako, Nanami Ueda, Kaichi Ishimoto, et Toshifumi Tsujiuchi. 2020. « Regulation of Cell Survival through Free Fatty Acid Receptor 1 (FFA1) and FFA4 Induced by Endothelial Cells in Osteosarcoma Cells ». *Journal of Receptors and Signal Transduction* 40 (2): 181-86. <https://doi.org/10.1080/10799893.2020.1725047>.

Minn, Andy J., Yibin Kang, Inna Serganova, Gaorav P. Gupta, Dilip D. Giri, Mikhail Doubrovin, Vladimir Ponomarev, William L. Gerald, Ronald Blasberg, et Joan Massagué. 2005. « Distinct Organ-Specific Metastatic Potential of Individual Breast Cancer Cells and Primary Tumors ». *The Journal of Clinical Investigation* 115 (1): 44-55. <https://doi.org/10.1172/JCI22320>.

Mirabello, Lisa, Roelof Koster, Branden S. Moriarity, Logan G. Spector, Paul S. Meltzer, Joy Gary, Mitchell J. Machiela, et al. 2015. « A Genome-Wide Scan Identifies Variants in *NF1B* Associated with Metastasis in Patients with Osteosarcoma ». *Cancer Discovery* 5 (9): 920-31. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-0125>.

Mirabello, Lisa, Meredith Yeager, Phuong L. Mai, Julie M. Gastier-Foster, Richard Gorlick, Chand Khanna, Ana Patiño-Garcia, et al. 2015. « Germline TP53 Variants and Susceptibility to Osteosarcoma ». *Journal of the National Cancer Institute* 107 (7): djv101. <https://doi.org/10.1093/jnci/djv101>.

Miranda, Maria Zena, Janne Folke Bialik, Pam Speight, Qinghong Dan, Tony Yeung, Katalin Szászi, Stine F. Pedersen, et András Kapus. 2017. « TGF-B1 Regulates the Expression and Transcriptional Activity of TAZ Protein via a Smad3-Independent, Myocardin-Related Transcription Factor-Mediated Mechanism ». *Journal of Biological Chemistry* 292 (36): 14902-20. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.780502>.

Mitani, Yoshitsugu, Naohide Oue, Yoichi Hamai, Phyu Phyu Aung, Shunji Matsumura, Hirofumi Nakayama, Nobuyuki Kamata, et Wataru Yasui. 2005. « Histone H3 Acetylation Is Associated with Reduced P21WAF1/CIP1 Expression by Gastric Carcinoma ». *The Journal of Pathology* 205 (1): 65-73. <https://doi.org/10.1002/path.1684>.

Mitchison, Timothy J. 2012. « The Proliferation Rate Paradox in Antimitotic Chemotherapy ». Édité par Doug Kellogg. *Molecular Biology of the Cell* 23 (1): 1-6. <https://doi.org/10.1091/mbc.e10-04-0335>.

Miyazaki, Takuro, Kazuo Tonami, Shoji Hata, Toshihiro Aiuchi, Koji Ohnishi, Xiao-Feng Lei, Joo-ri Kim-Kaneyama, et al. 2016. « Calpain-6 Confers Atherogenicity to Macrophages by Dysregulating Pre-MRNA Splicing ». *Journal of Clinical Investigation* 126 (9): 3417-32. <https://doi.org/10.1172/JCI85880>.

Mizobuchi, Hiroo, José Manuel García-Castellano, Shaji Philip, John H. Healey, et Richard Gorlick. 2008. « Hypoxia Markers in Human Osteosarcoma: An Exploratory Study ». *Clinical Orthopaedics and Related Research* 466 (9): 2052-59. <https://doi.org/10.1007/s11999-008-0328-y>.

Mohseny, Alexander B, Wei Xiao, Ralph Carvalho, Herman P Spaink, Pancras CW Hogendoorn, et Anne-Marie Cleton-Jansen. 2012. « An Osteosarcoma Zebrafish Model Implicates Mmp-19 and Ets-1 as Well as Reduced Host Immune Response in Angiogenesis and Migration ». *The Journal of Pathology* 227 (2): 245-53. <https://doi.org/10.1002/path.3998>.

Moriarity, Branden S, George M Otto, Eric P Rahrmann, Susan K Rathe, Natalie K Wolf, Madison T Weg, Luke A Manlove, et al. 2015. « A Sleeping Beauty Forward Genetic Screen Identifies New Genes and Pathways Driving Osteosarcoma Development and Metastasis ». *Nature Genetics* 47 (6): 615-24. <https://doi.org/10.1038/ng.3293>.

Morishita, Maki, Tomoki Muramatsu, Yumiko Suto, Momoki Hirai, Teruaki Konishi, Shin Hayashi, Daichi Shigemizu, Tatsuhiko Tsunoda, Keiji Moriyama, et Johji Inazawa. 2016. « Chromothripsis-like Chromosomal Rearrangements Induced by Ionizing Radiation Using Proton Microbeam Irradiation System ». *Oncotarget* 7 (9): 10182-92. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7186>.

Morrow, K. Adam, Shamik Das, Erhong Meng, Mitchell E. Menezes, Sarah K. Bailey, Brandon J. Metge, Donald J. Buchsbaum, Rajeev S. Samant, et Lalita A. Shevde. 2016. « Loss of Tumor Suppressor Merlin Results in Aberrant Activation of Wnt/ β -Catenin Signaling in Cancer ». *Oncotarget* 7 (14): 17991-5. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7494>.

Morrow, K. Adam, Shamik Das, Brandon J. Metge, Keqiang Ye, Madhuri S. Mulekar, J. Allan Tucker, Rajeev S. Samant, et Lalita A. Shevde. 2011. « Loss of Tumor Suppressor Merlin in Advanced Breast Cancer Is Due to Post-Translational Regulation ». *Journal of Biological Chemistry* 286 (46): 40376-85. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.250035>.

Mota, Mateus, et Lalita A. Shevde. 2020. « Merlin Regulates Signaling Events at the Nexus of Development and Cancer ». *Cell Communication and Signaling* 18 (1): 63. <https://doi.org/10.1186/s12964-020-00544-7>.

Mross, K., A. Frost, S. Steinbild, S. Hedbom, M. Buchert, U. Fasol, C. Unger, et al. 2012. « A Phase I Dose-Escalation Study of Regorafenib (BAY 73-4506), an Inhibitor of Oncogenic, Angiogenic, and Stromal Kinases, in Patients with Advanced Solid Tumors ». *Clinical Cancer Research* 18 (9): 2658-67. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-1900>.

Muguruma, Yukari, Katsuto Hozumi, Hiroyuki Warita, Takashi Yahata, Tomoko Uno, Mamoru Ito, et Kiyoshi Ando. 2017. « Maintenance of Bone Homeostasis by DLL1-Mediated Notch Signaling: DLL1-NOTCH SIGNAL REGULATES BONE REMODELING ». *Journal of Cellular Physiology* 232 (9): 2569-80. <https://doi.org/10.1002/jcp.25647>.

Muppala, Santoshi, Vijay Krishna Raghunathan, Iman Jalilian, Sara Thomasy, et Christopher J. Murphy. 2019. « YAP and TAZ Are Distinct Effectors of Corneal Myofibroblast Transformation ». *Experimental Eye Research* 180 (mars): 102-9. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2018.12.009>.

Mutsaers, Anthony J., Alvin J.M. Ng, Emma K. Baker, Megan R. Russell, Alistair M. Chalk, Meaghan Wall, Brain J.J. Liddicoat, et al. 2013. « Modeling Distinct Osteosarcoma Subtypes in Vivo Using Cre:Lox and Lineage-Restricted Transgenic ShRNA ». *Bone* 55 (1): 166-78.

<https://doi.org/10.1016/j.bone.2013.02.016>.

Mutsaers, Anthony J., et Carl R. Walkley. 2014. « Cells of Origin in Osteosarcoma: Mesenchymal Stem Cells or Osteoblast Committed Cells? » *Bone* 62 (mai): 56-63.

<https://doi.org/10.1016/j.bone.2014.02.003>.

Namløs, Heidi M., Leonardo A. Meza-Zepeda, Tale Barøy, Ingrid H. G. Østensen, Stine H. Kresse, Marieke L. Kuijjer, Massimo Serra, Horst Bürger, Anne-Marie Cleton-Jansen, et Ola Myklebost. 2012.

« Modulation of the Osteosarcoma Expression Phenotype by MicroRNAs ». Édité par Ilya Ulasov. *PLoS ONE* 7 (10): e48086. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048086>.

Nandy, Sushmita Bose, et Rajkumar Lakshmanaswamy. 2017. « Cancer Stem Cells and Metastasis ». In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 151:137-76. Elsevier.

<https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.07.007>.

Nazha, Bassel, Cengiz Inal, et Taofeek K. Owonikoko. 2020. « Disialoganglioside GD2 Expression in Solid Tumors and Role as a Target for Cancer Therapy ». *Frontiers in Oncology* 10 (juillet): 1000.

<https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01000>.

Nguyen, Don X., Paula D. Bos, et Joan Massagué. 2009. « Metastasis: From Dissemination to Organ-Specific Colonization ». *Nature Reviews Cancer* 9 (4): 274-84. <https://doi.org/10.1038/nrc2622>.

Nishio, Miki, Koichi Hamada, Kohichi Kawahara, Masato Sasaki, Fumihito Noguchi, Shuhei Chiba, Kensaku Mizuno, et al. 2012. « Cancer Susceptibility and Embryonic Lethality in Mob1a/1b Double-Mutant Mice ». *Journal of Clinical Investigation* 122 (12): 4505-18. <https://doi.org/10.1172/JCI63735>.

Niu, Xiaohui. 2011. « Synergistic antitumor efficacy by combining adriamycin with recombinant human endostatin in an osteosarcoma model ». *Oncology Letters*, juillet. <https://doi.org/10.3892/ol.2011.334>.

Noto, A, C De Vitis, M E Pisanu, G Roscilli, G Ricci, A Catizone, G Sorrentino, et al. 2017. « Stearoyl-CoA-Desaturase 1 Regulates Lung Cancer Stemness via Stabilization and Nuclear Localization of YAP/TAZ ». *Oncogene* 36 (32): 4573-84. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.75>.

Noy, Roy, et Jeffrey W. Pollard. 2014. « Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy ». *Immunity* 41 (1): 49-61. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.010>.

Oda, Yoshinao, Hidetaka Yamamoto, Sadafumi Tamiya, Shuichi Matsuda, Kazuhiro Tanaka, Ryohei Yokoyama, Yukihide Iwamoto, et Masazumi Tsuneyoshi. 2006. « CXCR4 and VEGF Expression in the Primary Site and the Metastatic Site of Human Osteosarcoma: Analysis within a Group of Patients, All of Whom Developed Lung Metastasis ». *Modern Pathology* 19 (5): 738-45.

<https://doi.org/10.1038/modpathol.3800587>.

O'Day, Kathleen, et Richard Gorlick. 2009. « Novel Therapeutic Agents for Osteosarcoma ». *Expert Review of Anticancer Therapy* 9 (4): 511-23. <https://doi.org/10.1586/era.09.7>.

Oh, Joo Han, Han-Soo Kim, Hyung-Ho Kim, Woo Ho Kim, et Sang Hoon Lee. 2006. « Aberrant Methylation of P14ARF Gene Correlates with Poor Survival in Osteosarcoma ». *Clinical Orthopaedics & Related Research* 442 (janvier): 216-22. <https://doi.org/10.1097/01.blo.0000188063.56091.69>.

Oh, Mijung, Seung Bae Rho, Chaeyeun Son, Kyoungsook Park, et Sang Yong Song. 2019. « Non-Proteolytic Calpain-6 Interacts with VEGFA and Promotes Angiogenesis by Increasing VEGF Secretion ». *Scientific Reports* 9 (1): 15771. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52364-6>.

Okuno, Kazuma, Takao Matsubara, Tomoki Nakamura, Takahiro Iino, Takuya Kakimoto, Kunihiro Asanuma, Akihiko Matsumine, et Akihiro Sudo. 2018. « Carbonic Anhydrase IX Enhances Tumor Cell Proliferation and Tumor Progression in Osteosarcoma ». *Oncotargets and Therapy* Volume 11 (octobre): 6879-86. <https://doi.org/10.2147/OTT.S177605>.

« osteosarcome; cancer.org ». s. d. Consulté le 1 avril 2020.
<http://www.cancer.org/cancer/osteosarcoma/index>.

Ottaviani, Giulia, et Norman Jaffe. 2009. « The Epidemiology of Osteosarcoma ». In *Pediatric and Adolescent Osteosarcoma*, édité par Norman Jaffe, Oyvind S. Bruland, et Stefan Bielack, 152:3-13. Cancer Treatment and Research. Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0284-9_1.

Panciera, Tito, Luca Azzolin, Michelangelo Cordenonsi, et Stefano Piccolo. 2017. « Mechanobiology of YAP and TAZ in Physiology and Disease ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 18 (12): 758-70. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.87>.

Panciera, Tito, Luca Azzolin, Daniele Di Biagio, Antonio Totaro, Michelangelo Cordenonsi, et Stefano Piccolo. 2018. « De Novo Generation of Somatic Stem Cells by YAP/TAZ ». *Journal of Visualized Experiments*, n° 135 (mai): 57462. <https://doi.org/10.3791/57462>.

Panciera, Tito, Luca Azzolin, Atsushi Fujimura, Daniele Di Biagio, Chiara Frasson, Silvia Bresolin, Sandra Soligo, et al. 2016. « Induction of Expandable Tissue-Specific Stem/Progenitor Cells through Transient Expression of YAP/TAZ ». *Cell Stem Cell* 19 (6): 725-37. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.08.009>.

P. Anract, D. Biau, A. Babinet, V. Dumaine, et B. Tomeno. 2006. « Osteosarcoma: diagnosis and results of the treatment ». *La Lettre du Rhumatologue*, octobre 2006, sect. - n° 325. <https://www.edimark.fr/Front/frontpost/getfiles/12526.pdf>.

Paoluzzi, L., A. Cacavio, M. Ghesani, A. Karambelkar, A. Rapkiewicz, J. Weber, et G. Rosen. 2016. « Response to Anti-PD1 Therapy with Nivolumab in Metastatic Sarcomas ». *Clinical Sarcoma Research* 6 (1): 24. <https://doi.org/10.1186/s13569-016-0064-0>.

Park, Hyun Woo, Young Chul Kim, Bo Yu, Toshiro Moroishi, Jung-Soon Mo, Steven W. Plouffe, Zhipeng Meng, et al. 2015. « Alternative Wnt Signaling Activates YAP/TAZ ». *Cell* 162 (4): 780-94. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.013>.

Patiño-García, Ana, Marta Zalacaín, Lucía Marrodán, Mikel San-Julián, et Luis Sierrasesúмага. 2009. « Methotrexate in Pediatric Osteosarcoma: Response and Toxicity in Relation to Genetic Polymorphisms and Dihydrofolate Reductase and Reduced Folate Carrier 1 Expression ». *The Journal of Pediatrics* 154 (5): 688-93. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2008.11.030>.

Paydas, Semra, Emine Kilic Bagir, Mehmet Ali Deveci, et Gulfiliz Gonlusen. 2016. « Clinical and Prognostic Significance of PD-1 and PD-L1 Expression in Sarcomas ». *Medical Oncology* 33 (8): 93. <https://doi.org/10.1007/s12032-016-0807-z>.

- Peltier, Julien, Jean-Pierre Roperch, Stéphane Audebert, Jean-Paul Borg, et Luc Camoin. 2016. « Quantitative Proteomic Analysis Exploring Progression of Colorectal Cancer: Modulation of the Serpin Family ». *Journal of Proteomics* 148 (octobre): 139-48. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.07.031>.
- Perry, Jennifer A., Adam Kiezun, Peter Tonzi, Eliezer M. Van Allen, Scott L. Carter, Sylvan C. Baca, Glenn S. Cowley, et al. 2014. « Complementary Genomic Approaches Highlight the PI3K/MTOR Pathway as a Common Vulnerability in Osteosarcoma ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (51): E5564-5573. <https://doi.org/10.1073/pnas.1419260111>.
- Perut, Francesca, Laura Roncuzzi, et Nicola Baldini. 2019. « The Emerging Roles of Extracellular Vesicles in Osteosarcoma ». *Frontiers in Oncology* 9 (décembre): 1342. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01342>.
- Picci, P., G. Bacci, M. Campanacci, M. Gasparini, S. Pilotti, S. Cerasoli, F. Bertoni, A. Guerra, R. Capanna, et U. Albisinni. 1985. « Histologic Evaluation of Necrosis in Osteosarcoma Induced by Chemotherapy. Regional Mapping of Viable and Nonviable Tumor ». *Cancer* 56 (7): 1515-21. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19851001\)56:7<1515::aid-cnrc2820560707>3.0.co;2-6](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19851001)56:7<1515::aid-cnrc2820560707>3.0.co;2-6).
- Pierrevelcin, Marina, Quentin Fuchs, Benoit Lhermitte, Melissa Messé, Eric Guérin, Noelle Weingertner, Sophie Martin, et al. 2020. « Focus on Hypoxia-Related Pathways in Pediatric Osteosarcomas and Their Druggability ». *Cells* 9 (9): 1998. <https://doi.org/10.3390/cells9091998>.
- PosthumaDeBoer, J., M. A. Witlox, G. J. L. Kaspers, et B. J. van Royen. 2011. « Molecular Alterations as Target for Therapy in Metastatic Osteosarcoma: A Review of Literature ». *Clinical & Experimental Metastasis* 28 (5): 493-503. <https://doi.org/10.1007/s10585-011-9384-x>.
- Qasem, Shadi. 2016. « Biology and Treatment of Metastasis of Sarcoma to the Brain ». *Frontiers in Bioscience* 8 (2): 233-44. <https://doi.org/10.2741/e764>.
- Qiao, Bo, Wei Shui, Li Cai, Shuquan Guo, et Dianming Jiang. 2015. « Human Mesenchymal Stem Cells as Delivery Of Osteoprotegerin Gene: Homing and Therapeutic Effect for Osteosarcoma ». *Drug Design, Development and Therapy*, février, 969. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S77116>.
- Qin, Han, Miroslav Hejna, Yanxia Liu, Michelle Percharde, Mark Wossidlo, Laure Blouin, Jens Durruthy-Durruthy, et al. 2016. « YAP Induces Human Naive Pluripotency ». *Cell Reports* 14 (10): 2301-12. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.02.036>.
- Quattrini, Irene, Serena Pollino, Laura Pazzaglia, Amalia Conti, Chiara Novello, Cristina Ferrari, Elettra Pignotti, Piero Picci, et Maria Serena Benassi. 2015. « Prognostic Role of Nuclear Factor/IB and Bone Remodeling Proteins in Metastatic Giant Cell Tumor of Bone: A Retrospective Study: PROGNOSTIC FACTORS IN GIANT CELL TUMOR OF BONE ». *Journal of Orthopaedic Research* 33 (8): 1205-11. <https://doi.org/10.1002/jor.22873>.
- Raffaella Santoro, , MARCO ZANOTTO, , CARMINE CARBONE, GENY PIRO, GIAMPAOLO TORTOR, et DAVIDE MELISI. 2018. « MEK3 Sustains EMT and Stemness in Pancreatic Cancer by Regulating YAP and TAZ Transcriptional Activity ». *Anticancer Research* 38 (4). <https://doi.org/10.21873/anticancer.12431>.
- Ramaswamy, Sridhar, Ken N. Ross, Eric S. Lander, et Todd R. Golub. 2003. « A Molecular Signature of Metastasis in Primary Solid Tumors ». *Nature Genetics* 33 (1): 49-54. <https://doi.org/10.1038/ng1060>.

Raza, Shaan M, Ahmed Habib, Wei-Lien Wang, Paul W Gildey, Anthony P Conley, Marc-Elie Nader, Ehab Y Hanna, Shirley Y Su, et Franco DeMonte. 2020. « Surgical Management of Primary Skull Base Osteosarcomas: Impact of Margin Status and Patterns of Relapse ». *Neurosurgery* 86 (1): E23-32. <https://doi.org/10.1093/neuros/nyz360>.

Redondo, A., J. Cruz, A. Lopez-Pousa, et F. Barón. 2013. « SEOM Clinical Guidelines for the Treatment of Osteosarcoma in Adults-2013 ». *Clinical and Translational Oncology* 15 (12): 1037-43. <https://doi.org/10.1007/s12094-013-1087-0>.

Renema, Nathalie, Benjamin Navet, Marie-Françoise Heymann, Frédéric Lezot, et Dominique Heymann. 2016. « RANK–RANKL Signalling in Cancer ». *Bioscience Reports* 36 (4): e00366. <https://doi.org/10.1042/BSR20160150>.

Rho, Seung Bae, Hyun-Jung Byun, Sang-Yoon Park, et Taehoon Chun. 2008. « Calpain 6 Supports Tumorigenesis by Inhibiting Apoptosis and Facilitating Angiogenesis ». *Cancer Letters* 271 (2): 306-13. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.06.020>.

Rickel, Kirby, Fang Fang, et Jianning Tao. 2017. « Molecular Genetics of Osteosarcoma ». *Bone* 102 (septembre): 69-79. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2016.10.017>.

Robanus-Maandag, Els, Marco Giovannini, Martin van der Valk, Michiko Niwa-Kawakita, Vincent Abramowski, Cristina Antonescu, Gilles Thomas, et Anton Berns. 2004. « Synergy of Nf2 and P53 Mutations in Development of Malignant Tumours of Neural Crest Origin ». *Oncogene* 23 (39): 6541-47. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207858>.

Robert, Jacques. 2013. « Biology of cancer metastasis ». *Bulletin du Cancer* 100 (4): 333-42. <https://doi.org/10.1684/bdc.2013.1724>.

Robles, Ana I., Giovanni Traverso, Ming Zhang, Nicholas J. Roberts, Mohammed A. Khan, Christine Joseph, Gregory Y. Lauwers, et al. 2016. « Whole-Exome Sequencing Analyses of Inflammatory Bowel Disease-Associated Colorectal Cancers ». *Gastroenterology* 150 (4): 931-43. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.12.036>.

Rodriguez, Rene, Ruth Rubio, et Pablo Menendez. 2012. « Modeling Sarcomagenesis Using Multipotent Mesenchymal Stem Cells ». *Cell Research* 22 (1): 62-77. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.157>.

Roessner, Albert, Christoph Lohmann, et Doerthe Jechorek. 2021. « Translational Cell Biology of Highly Malignant Osteosarcoma ». *Pathology International* 71 (5): 291-303. <https://doi.org/10.1111/pin.13080>.

Roncuzzi, Laura, Fabia Pancotti, et Nicola Baldini. 2014. « Involvement of HIF-1 α Activation in the Doxorubicin Resistance of Human Osteosarcoma Cells ». *Oncology Reports* 32 (1): 389-94. <https://doi.org/10.3892/or.2014.3181>.

Rosenberg, Steven A. 2001. « Progress in Human Tumour Immunology and Immunotherapy ». *Nature* 411 (6835): 380-84. <https://doi.org/10.1038/35077246>.

Rosenbluh, Joseph, Deepak Nijhawan, Andrew G. Cox, Xingnan Li, James T. Neal, Eric J. Schafer, Travis I. Zack, et al. 2012. « β -Catenin-Driven Cancers Require a YAP1 Transcriptional Complex for Survival and Tumorigenesis ». *Cell* 151 (7): 1457-73. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.11.026>.

Rubin, Elyssa M., Yi Guo, Khoa Tu, Jun Xie, Xiaolin Zi, et Bang H. Hoang. 2010. « Wnt Inhibitory Factor 1 Decreases Tumorigenesis and Metastasis in Osteosarcoma ». *Molecular Cancer Therapeutics* 9 (3): 731-41. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-09-0147>.

Rusch, Valerie W. 1995. « Pulmonary Metastasectomy ». *Chest* 107 (6): 322S-331S. https://doi.org/10.1378/chest.107.6_Supplement.322S.

Sadykova, Leissan R., Atara I. Ntekim, Musalwa Muyangwa-Semenova, Catrin S. Rutland, Jennie N. Jeyapalan, Nataliya Blatt, et Albert A Rizvanov. 2020. « Epidemiology and Risk Factors of Osteosarcoma ». *Cancer Investigation* 38 (5): 259-69. <https://doi.org/10.1080/07357907.2020.1768401>.

Saviola, Anthony J., Patrick D. Burns, Ashis K. Mukherjee, et Stephen P. Mackessy. 2016. « The Disintegrin Tzabcanin Inhibits Adhesion and Migration in Melanoma and Lung Cancer Cells ». *International Journal of Biological Macromolecules* 88 (juillet): 457-64. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.008>.

Schardt, Julian A., Manfred Meyer, Claudia H. Hartmann, Falk Schubert, Oleg Schmidt-Kittler, Christine Fuhrmann, Bernhard Polzer, Marco Petronio, Roland Eils, et Christoph A. Klein. 2005. « Genomic Analysis of Single Cytokeratin-Positive Cells from Bone Marrow Reveals Early Mutational Events in Breast Cancer ». *Cancer Cell* 8 (3): 227-39. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.08.003>.

Schiavone, Kristina, Delphine Garnier, Marie-Francoise Heymann, et Dominique Heymann. 2019. « The Heterogeneity of Osteosarcoma: The Role Played by Cancer Stem Cells ». In *Stem Cells Heterogeneity in Cancer*, édité par Alexander Birbrair, 1139:187-200. Advances in Experimental Medicine and Biology. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-14366-4_11.

Schwitalla, Sarah, Alexander A. Fingerle, Patrizia Cammareri, Tim Nebelsiek, Serkan I. Göktuna, Paul K. Ziegler, Ozge Canli, et al. 2013. « Intestinal Tumorigenesis Initiated by Dedifferentiation and Acquisition of Stem-Cell-like Properties ». *Cell* 152 (1-2): 25-38. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.12.012>.

Ségaliny, Aude I., Marta Tellez-Gabriel, Marie-Françoise Heymann, et Dominique Heymann. 2015a. « Receptor Tyrosine Kinases: Characterisation, Mechanism of Action and Therapeutic Interests for Bone Cancers ». *Journal of Bone Oncology* 4 (1): 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.jbo.2015.01.001>.

———. 2015b. « Receptor Tyrosine Kinases: Characterisation, Mechanism of Action and Therapeutic Interests for Bone Cancers ». *Journal of Bone Oncology* 4 (1): 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.jbo.2015.01.001>.

Selvarajah, Shamini, Maisa Yoshimoto, Paul C. Park, Georges Maire, Jana Paderova, Jane Bayani, Gloria Lim, Khaldoun Al-Romaih, Jeremy A. Squire, et Maria Zielenska. 2006. « The Breakage-Fusion-Bridge (BFB) Cycle as a Mechanism for Generating Genetic Heterogeneity in Osteosarcoma ». *Chromosoma* 115 (6): 459-67. <https://doi.org/10.1007/s00412-006-0074-4>.

Shah, Nina R., Isabelle Tancioni, Kristy K. Ward, Christine Lawson, Xiao Lei Chen, Christine Jean, Florian J. Sulzmaier, et al. 2014. « Analyses of Merlin/NF2 Connection to FAK Inhibitor Responsiveness in Serous Ovarian Cancer ». *Gynecologic Oncology* 134 (1): 104-11. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2014.04.044>.

Shapouri-Moghaddam, Abbas, Saeed Mohammadian, Hossein Vazini, Mahdi Taghadosi, Seyed-Alireza Esmaeili, Fatemeh Mardani, Bitá Seifi, Asadollah Mohammadi, Jalil T. Afshari, et Amirhossein Sahebkar. 2018. « Macrophage Plasticity, Polarization, and Function in Health and Disease ». *Journal of Cellular Physiology* 233 (9): 6425-40. <https://doi.org/10.1002/jcp.26429>.

Shekhar, M. P., J. Werdell, S. J. Santner, R. J. Pauley, et L. Tait. 2001. « Breast Stroma Plays a Dominant Regulatory Role in Breast Epithelial Growth and Differentiation: Implications for Tumor Development and Progression ». *Cancer Research* 61 (4): 1320-26.

Shen, Shuying, Kangmao Huang, Yizheng Wu, Yan Ma, Jiying Wang, Feiwei Qin, et Jianjun Ma. 2017. « A MiR-135b-TAZ Positive Feedback Loop Promotes Epithelial–Mesenchymal Transition (EMT) and Tumorigenesis in Osteosarcoma ». *Cancer Letters* 407 (octobre): 32-44.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.08.005>.

Shreberk-Shaked, Michal, Bareket Dassa, Sanju Sinha, Silvia Di Agostino, Ido Azuri, Saptaparna Mukherjee, Yael Aylon, Giovanni Blandino, Eytan Ruppim, et Moshe Oren. 2020. « A Division of Labor between YAP and TAZ in Non–Small Cell Lung Cancer ». *Cancer Research* 80 (19): 4145-57.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-0125>.

Smida, Jan, Hongen Xu, Yanping Zhang, Daniel Baumhoer, Sebastian Ribbi, Michal Kovac, Irene von Luettichau, et al. 2017. « Genome-Wide Analysis of Somatic Copy Number Alterations and Chromosomal Breakages in Osteosarcoma: SCNAs in OS ». *International Journal of Cancer* 141 (4): 816-28. <https://doi.org/10.1002/ijc.30778>.

Song, Zifeng, Martin C. Pearce, Yuan Jiang, Liping Yang, Cheri Goodall, Cristobal L. Miranda, Milan Milovancev, Shay Bracha, Siva K. Kolluri, et Claudia S. Maier. 2020. « Delineation of Hypoxia-Induced Proteome Shifts in Osteosarcoma Cells with Different Metastatic Propensities ». *Scientific Reports* 10 (1): 727. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56878-x>.

Stephens, Philip J., Chris D. Greenman, Beiyuan Fu, Fengtang Yang, Graham R. Bignell, Laura J. Mudie, Erin D. Pleasance, et al. 2011. « Massive Genomic Rearrangement Acquired in a Single Catastrophic Event during Cancer Development ». *Cell* 144 (1): 27-40. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.11.055>.

Stoecklein, Nikolas H., et Christoph A. Klein. 2010. « Genetic Disparity between Primary Tumours, Disseminated Tumour Cells, and Manifest Metastasis ». *International Journal of Cancer* 126 (3): 589-98.
<https://doi.org/10.1002/ijc.24916>.

Stuelten, Christina H., Johanna I. Busch, Binwu Tang, Kathleen C. Flanders, Akira Oshima, Emily Sutton, Tatiana S. Karpova, Anita B. Roberts, Lalage M. Wakefield, et John E. Niederhuber. 2010. « Transient Tumor-Fibroblast Interactions Increase Tumor Cell Malignancy by a TGF- β Mediated Mechanism in a Mouse Xenograft Model of Breast Cancer ». Édité par Mikhail V. Blagosklonny. *PLoS ONE* 5 (3): e9832.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009832>.

Subbiah, Vivek, Pete Anderson, et Eric Rohren. 2015. « Alpha Emitter Radium 223 in High-Risk Osteosarcoma: First Clinical Evidence of Response and Blood-Brain Barrier Penetration ». *JAMA Oncology* 1 (2): 253. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2014.289>.

Sun, Xiang, Zhijun Ren, Yixian Cun, Cai Zhao, Xianglin Huang, Jiajian Zhou, Rong Hu, et al. 2020. « Hippo-YAP Signaling Controls Lineage Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells through Modulating the Formation of Super-Enhancers ». *Nucleic Acids Research*, juin, gkaa482.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkaa482>.

Sun, Zhao, Shihua Wang, et Robert Zhao. 2014. « The Roles of Mesenchymal Stem Cells in Tumor Inflammatory Microenvironment ». *Journal of Hematology & Oncology* 7 (1): 14.
<https://doi.org/10.1186/1756-8722-7-14>.

Sundara, Yayan T., Marie Kostine, Arjen H. G. Cleven, Judith V. M. G. Bovée, Marco W. Schilham, et Anne-Marie Cleton-Jansen. 2017. « Increased PD-L1 and T-Cell Infiltration in the Presence of HLA Class I Expression in Metastatic High-Grade Osteosarcoma: A Rationale for T-Cell-Based Immunotherapy ». *Cancer Immunology, Immunotherapy* 66 (1): 119-28. <https://doi.org/10.1007/s00262-016-1925-3>.

Takashi, Hasegawa, Sugihara Takaaki, Hoshino Yoshiki, Tarumoto Ryohei, Matsuki Yukako, Kanda Tsutomu, Takata Tomoaki, Nagahara Takakazu, Matono Tomomitsu, et Isomoto Hajime. 2021. « Photosensitizer verteporfin inhibits the growth of YAP- and TAZ-dominant gastric cancer cells by suppressing the anti-apoptotic protein Survivin in a light-independent manner ». *Oncology Letters* 22 (4): 703. <https://doi.org/10.3892/ol.2021.12964>.

Tao, Jianning, Ming-Ming Jiang, Lichun Jiang, Jason S. Salvo, Huan-Chang Zeng, Brian Dawson, Terry K. Bertin, et al. 2014. « Notch Activation as a Driver of Osteogenic Sarcoma ». *Cancer Cell* 26 (3): 390-401. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.07.023>.

Tao, Qiang, Siliang Chen, Jia Liu, Peng Zhao, Lingmin Jiang, Xinyue Tu, Xiang Tang, et al. 2021. « The roles of the cell division cycle-associated gene family in hepatocellular carcinoma ». *Journal of Gastrointestinal Oncology* 12 (2): 781-94. <https://doi.org/10.21037/jgo-21-110>.

Theodoropoulos, Panayiotis A., Hara Polioudaki, Sofia Agelaki, Galatea Kallergi, Zacharenia Saridaki, Dimitris Mavroudis, et Vassilis Georgoulis. 2010. « Circulating Tumor Cells with a Putative Stem Cell Phenotype in Peripheral Blood of Patients with Breast Cancer ». *Cancer Letters* 288 (1): 99-106. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.06.027>.

Théoleyre, S, K Mori, B Cherrier, N Passuti, F Gouin, F Rédini, et D Heymann. 2005. « Phenotypic and Functional Analysis of Lymphocytes Infiltrating Osteolytic Tumors: Use as a Possible Therapeutic Approach of Osteosarcoma ». *BMC Cancer* 5 (1): 123. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-5-123>.

Tian, Haijun, Tangjun Zhou, Hongfang Chen, Chenshuang Li, Ziyue Jiang, Lifeng Lao, Suzana Assad Kahn, et al. 2019. « Bone Morphogenetic Protein-2 Promotes Osteosarcoma Growth by Promoting Epithelial-mesenchymal Transition (EMT) through the Wnt/B-catenin Signaling Pathway ». *Journal of Orthopaedic Research* 37 (7): 1638-48. <https://doi.org/10.1002/jor.24244>.

Tirino, Virginia, Vincenzo Desiderio, Francesca Paino, Alfredo De Rosa, Federica Papaccio, Flavio Fazioli, Giuseppe Pirozzi, et Gianpaolo Papaccio. 2011. « Human Primary Bone Sarcomas Contain CD133⁺ Cancer Stem Cells Displaying High Tumorigenicity *in Vivo* ». *The FASEB Journal* 25 (6): 2022-30. <https://doi.org/10.1096/fj.10-179036>.

Tonami, Kazuo, Shoji Hata, Koichi Ojima, Yasuko Ono, Yukiko Kurihara, Tomokazu Amano, Takahiro Sato, Yumiko Kawamura, Hiroki Kurihara, et Hiroyuki Sorimachi. 2013. « Calpain-6 Deficiency Promotes Skeletal Muscle Development and Regeneration ». Édité par Gregory A. Cox. *PLoS Genetics* 9 (8): e1003668. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003668>.

Tonami, Kazuo, Yukiko Kurihara, Hiroyuki Aburatani, Yasunobu Uchijima, Tomoichiro Asano, et Hiroki Kurihara. 2007. « Calpain 6 Is Involved in Microtubule Stabilization and Cytoskeletal Organization ». *Molecular and Cellular Biology* 27 (7): 2548-61. <https://doi.org/10.1128/MCB.00992-06>.

Totaro, Antonio, Qiuyu Zhuang, Tito Panciera, Giusy Battilana, Luca Azzolin, Giulia Brumana, Alessandro Gandin, Giovanna Brusatin, Michelangelo Cordenonsi, et Stefano Piccolo. 2019. « Cell Phenotypic Plasticity Requires Autophagic Flux Driven by YAP/TAZ Mechanotransduction ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116 (36): 17848-57. <https://doi.org/10.1073/pnas.1908228116>.

Tsai, Hsiao-Chi, Chun-Yin Huang, Hong-Lin Su, et Chih-Hsin Tang. 2014. « CTGF Increases Drug Resistance to Paclitaxel by Upregulating Survivin Expression in Human Osteosarcoma Cells ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1843 (5): 846-54. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.01.007>.

Tsukahara, Tomohide, Satoshi Kawaguchi, Toshihiko Torigoe, Hiroko Asanuma, Emiri Nakazawa, Kumiko Shimozawa, Yuki Nabeta, et al. 2006. « Prognostic Significance of HLA Class I Expression in Osteosarcoma Defined by Anti-Pan HLA Class I Monoclonal Antibody, EMR8-5 ». *Cancer Science* 97 (12): 1374-80. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2006.00317.x>.

Tu, Bing, Jing Zhu, Shen Liu, Lei Wang, Qiming Fan, Yongqiang Hao, Cunyi Fan, et Ting-Ting Tang. 2016. « Mesenchymal Stem Cells Promote Osteosarcoma Cell Survival and Drug Resistance through Activation of STAT3 ». *Oncotarget* 7 (30). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10219>.

Usman, Saima, Naushin H. Waseem, Thuan Khanh Ngoc Nguyen, Sahar Mohsin, Ahmad Jamal, Muy-Teck Teh, et Ahmad Waseem. 2021. « Vimentin Is at the Heart of Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) Mediated Metastasis ». *Cancers* 13 (19): 4985. <https://doi.org/10.3390/cancers13194985>.

Valent, Peter, Dominique Bonnet, Ruggero De Maria, Tsvee Lapidot, Mhairi Copland, Junia V. Melo, Christine Chomienne, et al. 2012. « Cancer Stem Cell Definitions and Terminology: The Devil Is in the Details ». *Nature Reviews Cancer* 12 (11): 767-75. <https://doi.org/10.1038/nrc3368>.

Valette, François M., Christophe Olivier, Frédéric Lézot, Lisa Oliver, Denis Cochonneau, Lisenn Lalier, Pierre-François Cartron, et Dominique Heymann. 2019. « Dormant, Quiescent, Tolerant and Persister Cells: Four Synonyms for the Same Target in Cancer ». *Biochemical Pharmacology* 162 (avril): 169-76. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.11.004>.

Visvader, Jane E., et Geoffrey J. Lindeman. 2008. « Cancer Stem Cells in Solid Tumours: Accumulating Evidence and Unresolved Questions ». *Nature Reviews Cancer* 8 (10): 755-68. <https://doi.org/10.1038/nrc2499>.

———. 2012. « Cancer Stem Cells: Current Status and Evolving Complexities ». *Cell Stem Cell* 10 (6): 717-28. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.05.007>.

Vlodavsky, Israel, Phillip Beckhove, Immanuel Lerner, Claudio Pisano, Amichai Meirovitz, Neta Ilan, et Michael Elkin. 2012. « Significance of Heparanase in Cancer and Inflammation ». *Cancer Microenvironment* 5 (2): 115-32. <https://doi.org/10.1007/s12307-011-0082-7>.

Vogelstein, Bert, Nickolas Papadopoulos, Victor E. Velculescu, Shibin Zhou, Luis A. Diaz, et Kenneth W. Kinzler. 2013. « Cancer Genome Landscapes ». *Science (New York, N.Y.)* 339 (6127): 1546-58. <https://doi.org/10.1126/science.1235122>.

Volckaert, Thomas, Tingting Yuan, Jie Yuan, Eistine Boateng, Seantel Hopkins, Jin-San Zhang, Victor J. Thannickal, Reinhard Fässler, et Stijn P. De Langhe. 2019. « Hippo Signaling Promotes Lung Epithelial Lineage Commitment by Curbing Fgf10 and β -Catenin Signaling ». *Development* 146 (2): dev166454. <https://doi.org/10.1242/dev.166454>.

Walkley, C. R., R. Qudsi, V. G. Sankaran, J. A. Perry, M. Gostissa, S. I. Roth, S. J. Rodda, et al. 2008. « Conditional Mouse Osteosarcoma, Dependent on P53 Loss and Potentiated by Loss of Rb, Mimics the Human Disease ». *Genes & Development* 22 (12): 1662-76. <https://doi.org/10.1101/gad.1656808>.

Wang, Chao, Xiaoyong Zhu, Weiwei Feng, Yinhua Yu, Kangjin Jeong, Wei Guo, Yiling Lu, et Gordon B. Mills. 2016. « Verteporfin Inhibits YAP Function through Up-Regulating 14-3-3 σ Sequestering YAP in the Cytoplasm ». *American Journal of Cancer Research* 6 (1): 27-37.

Wang, Di, Xiaohui Niu, Zhijie Wang, Cheng-Li Song, Zhen Huang, Ke-Neng Chen, Jianchun Duan, et al. 2019. « Multiregion Sequencing Reveals the Genetic Heterogeneity and Evolutionary History of Osteosarcoma and Matched Pulmonary Metastases ». *Cancer Research* 79 (1): 7-20.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-1086>.

Wang, Hai, Cuijuan Yu, Xia Gao, Thomas Welte, Aaron M. Muscarella, Lin Tian, Hong Zhao, et al. 2015. « The Osteogenic Niche Promotes Early-Stage Bone Colonization of Disseminated Breast Cancer Cells ». *Cancer Cell* 27 (2): 193-210. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.11.017>.

Wang, Jiayi, Lifang Ma, Wenhao Weng, Yongxia Qiao, Yue Zhang, Jiangtu He, Hongmei Wang, et al. 2013. « Mutual Interaction between YAP and CREB Promotes Tumorigenesis in Liver Cancer: Wang, MA, et Al. » *Hepatology* 58 (3): 1011-20. <https://doi.org/10.1002/hep.26420>.

Wang, Li-Hong, Hsiao-Chi Tsai, Yu-Che Cheng, Chih-Yang Lin, Yuan-Li Huang, Chun-Hao Tsai, Guo-Hong Xu, Shih-Wei Wang, Yi-Chin Fong, et Chih-Hsin Tang. 2017. « CTGF Promotes Osteosarcoma Angiogenesis by Regulating MiR-543/Angiopoietin 2 Signaling ». *Cancer Letters* 391 (avril): 28-37.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.01.013>.

Wang, Songgang, Dong Zhang, Shasha Han, Peng Gao, Changying Liu, Jianmin Li, et Xin Pan. 2017. « Fibulin-3 Promotes Osteosarcoma Invasion and Metastasis by Inducing Epithelial to Mesenchymal Transition and Activating the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway ». *Scientific Reports* 7 (1): 6215.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-06353-2>.

Wang, Xiaoguang, Bin Wu, et Zhengxiang Zhong. 2018. « Downregulation of YAP inhibits proliferation, invasion and increases cisplatin sensitivity in human hepatocellular carcinoma cells ». *Oncology Letters*, mai. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8633>.

Weil, Robert J., Diane C. Palmieri, Julie L. Bronder, Andreas M. Stark, et Patricia S. Steeg. 2005. « Breast Cancer Metastasis to the Central Nervous System ». *The American Journal of Pathology* 167 (4): 913-20.
[https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)61180-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61180-7).

Wenger, Roland, Vartan Kurtcuoglu, Carsten Scholz, Hugo Marti, et David Hoogewijs. 2015. « Frequently Asked Questions in Hypoxia Research ». *Hypoxia*, septembre, 35. <https://doi.org/10.2147/HP.S92198>.

Whelan, Jeremy, Daniel Patterson, Martha Perisoglou, Stefan Bielack, Neyssa Marina, Sigbjorn Smeland, et Mark Bernstein. 2010. « The Role of Interferons in the Treatment of Osteosarcoma: Interferons and Osteosarcoma ». *Pediatric Blood & Cancer* 54 (3): 350-54. <https://doi.org/10.1002/pbc.22136>.

Wiklund, T, C Blomqvist, L Risteli, J Risteli, E Karaharju, et I Elomaa. 1996. « Type I and Type III Collagen Metabolites in Adult Osteosarcoma Patients ». *British Journal of Cancer* 73 (1): 106-9.
<https://doi.org/10.1038/bjc.1996.19>.

Wong, C. W., A. Lee, L. Shientag, J. Yu, Y. Dong, G. Kao, A. B. Al-Mehdi, E. J. Bernhard, et R. J. Muschel. 2001. « Apoptosis: An Early Event in Metastatic Inefficiency ». *Cancer Research* 61 (1): 333-38.

Worth, Laura L., Elizabeth A. Lafleur, Shu-Fang Jia, et Eugenie S. Kleinerman. 2002. « Fas Expression Inversely Correlates with Metastatic Potential in Osteosarcoma Cells ». *Oncology Reports* 9 (4): 823-27.

Wu, Tangwei, Hui Hu, Tianzhu Zhang, Liyuan Jiang, Xiaoyi Li, Shuiyi Liu, Chao Zheng, et al. 2019. « MiR-25 Promotes Cell Proliferation, Migration, and Invasion of Non-Small-Cell Lung Cancer by Targeting the LATS2/YAP Signaling Pathway ». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2019 (juin): 1-14. <https://doi.org/10.1155/2019/9719723>.

Xiang, Lisha, Daniele M. Gilkes, Hongxia Hu, Weibo Luo, John W. Bullen, Houjie Liang, et Gregg L. Semenza. 2015. « HIF-1 α and TAZ Serve as Reciprocal Co-Activators in Human Breast Cancer Cells ». *Oncotarget* 6 (14): 11768-78. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4190>.

Xiang, Yinzhou, Fen Li, Lei Wang, Anyuan Zheng, Jingjing Zuo, Man Li, Yongping Wang, et al. 2017. « Decreased Calpain 6 Expression Is Associated with Tumorigenesis and Poor Prognosis in HNSCC ». *Oncology Letters* 13 (4): 2237-43. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.5687>.

Xiao, Wei, Alexander B Mohseny, Pancras C W Hogendoorn, et Anne-Marie Cleton-Jansen. 2013. « Mesenchymal Stem Cell Transformation and Sarcoma Genesis ». *Clinical Sarcoma Research* 3 (1): 10. <https://doi.org/10.1186/2045-3329-3-10>.

Xie, Chuhai, Shengyao Liu, Boyi Wu, Yu Zhao, Binwei Chen, Jianhong Guo, ShouHong Qiu, et Yan-ming Cao. 2020. « MiR-19 Promotes Cell Proliferation, Invasion, Migration, and EMT by Inhibiting SPRED2-Mediated Autophagy in Osteosarcoma Cells ». *Cell Transplantation* 29 (janvier): 096368972096246. <https://doi.org/10.1177/0963689720962460>.

Xie, Lin, Zhihong Yao, Ya Zhang, Dongqi Li, Fengdi Hu, Yedan Liao, Ling Zhou, et al. 2018. « Deep RNA Sequencing Reveals the Dynamic Regulation of MiRNA, lncRNAs, and MRNAs in Osteosarcoma Tumorigenesis and Pulmonary Metastasis ». *Cell Death & Disease* 9 (7): 772. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0813-5>.

Xing, Meiyuan, Feifei Yan, Sufen Yu, et Peng Shen. 2015. « Efficacy and Cardiotoxicity of Liposomal Doxorubicin-Based Chemotherapy in Advanced Breast Cancer: A Meta-Analysis of Ten Randomized Controlled Trials ». Édité par Jung Weon Lee. *PLOS ONE* 10 (7): e0133569. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133569>.

Xu, Wei, Zhikun Li, Xiaodong Zhu, Ruijun Xu, et Youjia Xu. 2018. « MiR-29 Family Inhibits Resistance to Methotrexate and Promotes Cell Apoptosis by Targeting COL3A1 and MCL1 in Osteosarcoma ». *Medical Science Monitor* 24 (décembre): 8812-21. <https://doi.org/10.12659/MSM.911972>.

Yang, Jilong, et Wei Zhang. 2013. « New Molecular Insights into Osteosarcoma Targeted Therapy ». *Current Opinion in Oncology* 25 (4): 398-406. <https://doi.org/10.1097/CCO.0b013e3283622c1b>.

Yang, Min, Ming Yan, Rui Zhang, Jing Li, et Zhuojing Luo. 2011. « Side Population Cells Isolated from Human Osteosarcoma Are Enriched with Tumor-Initiating Cells ». *Cancer Science* 102 (10): 1774-81. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2011.02028.x>.

Yang, Wen, Yu-Bin Qi, Meng Si, Yong Hou, et Lin Nie. 2020. « A Comprehensive Analysis for Associations between Multiple MicroRNAs and Prognosis of Osteosarcoma Patients ». *PeerJ* 8: e8389. <https://doi.org/10.7717/peerj.8389>.

Yang, Wen-Hsuan, Chien-Kuang Cornelia Ding, Tianai Sun, Gabrielle Rupprecht, Chao-Chieh Lin, David Hsu, et Jen-Tsan Chi. 2019. « The Hippo Pathway Effector TAZ Regulates Ferroptosis in Renal Cell Carcinoma ». *Cell Reports* 28 (10): 2501-2508.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.07.107>.

Yang, Yi, He Li, Yu Liu, Chuang Chi, Jiangwei Ni, et Xiaoming Lin. 2019. « MiR-4319 Hinders YAP Expression to Restrain Non-Small Cell Lung Cancer Growth through Regulation of LIN28-Mediated RFX5 Stability ». *Biomedicine & Pharmacotherapy* 115 (juillet): 108956. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108956>.

Yang, Zhi, Ming Zhang, Ke Xu, Lin Liu, Wei-Kun Hou, Yuan-Zhen Cai, Peng Xu, et Jian-Feng Yao. 2014. « Knockdown of YAP1 Inhibits the Proliferation of Osteosarcoma Cells in Vitro and in Vivo ». *Oncology Reports* 32 (3): 1265-72. <https://doi.org/10.3892/or.2014.3305>.

Yarmish, Gail, Michael J. Klein, Jonathan Landa, Robert A. Lefkowitz, et Sinchun Hwang. 2010. « Imaging Characteristics of Primary Osteosarcoma: Nonconventional Subtypes ». *RadioGraphics* 30 (6): 1653-72. <https://doi.org/10.1148/rg.306105524>.

Yu, Ling, Kezhou Xia, Tian Gao, Jingteng Chen, Zhengpei Zhang, Xiangran Sun, Bruno M. Simões, et al. 2019. « The Notch Pathway Promotes Osteosarcoma Progression through Activation of Ephrin Reverse Signaling ». *Molecular Cancer Research* 17 (12): 2383-94. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-19-0493>.

Zanduetta, Carolina, Cristina Ormazábal, Naiara Perurena, Susana Martínez-Canarias, Marta Zalacaín, Mikel San Julián, Agamemnon E Grigoriadis, et al. 2016. « Matrix-Gla Protein Promotes Osteosarcoma Lung Metastasis and Associates with Poor Prognosis: Matrix-Gla Protein in Osteosarcoma Lung Metastases ». *The Journal of Pathology* 239 (4): 438-49. <https://doi.org/10.1002/path.4740>.

Zang, Xingxing, et James P. Allison. 2007. « The B7 Family and Cancer Therapy: Costimulation and Coinhibition ». *Clinical Cancer Research* 13 (18): 5271-79. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1030>.

Zhan, Ting, Qingxi Zhu, Zheng Han, Jie Tan, Meng Liu, Weijie Liu, Wei Chen, et al. 2020. « MiR-455-3p Functions as a Tumor Suppressor by Restraining Wnt/ β -Catenin Signaling via TAZ in Pancreatic Cancer ». *Cancer Management and Research* Volume 12 (février): 1483-92. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S235794>.

Zhang, Bo, Ya-Li Li, Jin-Long Zhao, Ouyang Zhen, Chao Yu, Bin-Hui Yang, et Xiao-Rui Yu. 2018. « Hypoxia-Inducible Factor-1 Promotes Cancer Progression through Activating AKT/Cyclin D1 Signaling Pathway in Osteosarcoma ». *Biomedicine & Pharmacotherapy* 105 (septembre): 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.165>.

Zhang, Dong, Qing Zhao, Hao Sun, Lijuan Yin, Jiajun Wu, Jun Xu, Tianxiang He, Chunlei Yang, et Chengwei Liang. 2016. « Defective Autophagy Leads to the Suppression of Stem-like Features of CD271+ Osteosarcoma Cells ». *Journal of Biomedical Science* 23 (1): 82. <https://doi.org/10.1186/s12929-016-0297-5>.

Zhang, Lin, Siyuan Zhang, Jun Yao, Frank J. Lowery, Qingling Zhang, Wen-Chien Huang, Ping Li, et al. 2015. « Microenvironment-Induced PTEN Loss by Exosomal MicroRNA Primes Brain Metastasis Outgrowth ». *Nature* 527 (7576): 100-104. <https://doi.org/10.1038/nature15376>.

Zhang, Peng, Ling Dong, Hua Long, Tong-Tao Yang, Yong Zhou, Qing-Yu Fan, et Bao-An Ma. 2014. « Homologous Mesenchymal Stem Cells Promote the Emergence and Growth of Pulmonary Metastases of the Rat Osteosarcoma Cell Line UMR-106 ». *Oncology Letters* 8 (1): 127-32. <https://doi.org/10.3892/ol.2014.2127>.

Zhang, Peng, Ling Dong, Kang Yan, Hua Long, Tong-Tao Yang, Ming-Qing Dong, Yong Zhou, Qing-Yu Fan, et Bao-An Ma. 2013. « CXCR4-Mediated Osteosarcoma Growth and Pulmonary Metastasis Is Promoted by Mesenchymal Stem Cells through VEGF ». *Oncology Reports* 30 (4): 1753-61. <https://doi.org/10.3892/or.2013.2619>.

Zhang, Rong-mou, Ting Tang, Hai-Ming Yu, et Xue-Dong Yao. 2018. « LncRNA DLX6-AS1/MiR-129-5p/DLK1 Axis Aggravates Stemness of Osteosarcoma through Wnt Signaling ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 507 (1-4): 260-66. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.11.019>.

Zhang, Sheng, Hongtao Chen, Wanshun Liu, Le Fang, Zhanyang Qian, Renyi Kong, Qi Zhang, Juming Li, et Xiaojian Cao. 2020. « miR-766-3p Targeting BCL9L Suppressed Tumorigenesis, Epithelial-Mesenchymal Transition, and Metastasis Through the β -Catenin Signaling Pathway in Osteosarcoma Cells ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8 (octobre): 594135. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.594135>.

Zhang, Xianbin, Ahmed Abdelrahman, Brigitte Vollmar, et Dietmar Zechner. 2018. « The Ambivalent Function of YAP in Apoptosis and Cancer ». *International Journal of Molecular Sciences* 19 (12): 3770. <https://doi.org/10.3390/ijms19123770>.

Zhang, Yong, Jiale Li, Yinsheng Wang, Juehua Jing, et Jun Li. 2019. « The Roles of Circular RNAs in Osteosarcoma ». *Medical Science Monitor* 25 (août): 6378-82. <https://doi.org/10.12659/MSM.915559>.

Zhang, Yuhua, Lijing Wei, Jin Yu, Guang Li, Xiuru Zhang, Anliu Wang, Yanjiao He, Hongli Li, et Deling Yin. 2014. « Targeting of the B6 Gene to Suppress Degradation of ECM via Inactivation of the MAPK Pathway in Breast Adenocarcinoma Cells ». *Oncology Reports* 32 (5): 1787-95. <https://doi.org/10.3892/or.2014.3419>.

Zhao, B., L. Li, K. Tumaneng, C.-Y. Wang, et K.-L. Guan. 2010. « A Coordinated Phosphorylation by Lats and CK1 Regulates YAP Stability through SCF -TRCP ». *Genes & Development* 24 (1): 72-85. <https://doi.org/10.1101/gad.1843810>.

Zhao, Di, Youbin Chen, Shunliang Chen, Chuangyi Zheng, Jun Hu, et Shaowei Luo. 2017. « MiR-19a Regulates the Cell Growth and Apoptosis of Osteosarcoma Stem Cells by Targeting PTEN ». *Tumor Biology* 39 (5): 101042831770534. <https://doi.org/10.1177/1010428317705341>.

Zhao, Zi-Ming, Bixiao Zhao, Yalai Bai, Atila Iamarino, Stephen G. Gaffney, Joseph Schlessinger, Richard P. Lifton, David L. Rimm, et Jeffrey P. Townsend. 2016. « Early and Multiple Origins of Metastatic Lineages within Primary Tumors ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113 (8): 2140-45. <https://doi.org/10.1073/pnas.1525677113>.

Zheng, Datong, Weiling Wu, Na Dong, Xiuqin Jiang, Jinjin Xu, Xi Zhan, Zhengdong Zhang, et Zhenzhen Hu. 2017. « Mxd1 Mediates Hypoxia-Induced Cisplatin Resistance in Osteosarcoma Cells by Repression of the PTEN Tumor Suppressor Gene ». *Molecular Carcinogenesis* 56 (10): 2234-44. <https://doi.org/10.1002/mc.22676>.

Zheng, Hanqiu, Yangjin Bae, Sabine Kasimir-Bauer, Rebecca Tang, Jin Chen, Guangwen Ren, Min Yuan, et al. 2017. « Therapeutic Antibody Targeting Tumor- and Osteoblastic Niche-Derived Jagged1 Sensitizes Bone Metastasis to Chemotherapy ». *Cancer Cell* 32 (6): 731-747.e6. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.11.002>.

Zheng, Ying, Gangyang Wang, Ruiling Chen, Yingqi Hua, et Zhengdong Cai. 2018. « Mesenchymal Stem Cells in the Osteosarcoma Microenvironment: Their Biological Properties, Influence on Tumor Growth,

and Therapeutic Implications ». *Stem Cell Research & Therapy* 9 (1): 22.

<https://doi.org/10.1186/s13287-018-0780-x>.

Zhong, Li, Dan Liao, Jingjing Li, Wenqiang Liu, Jingxuan Wang, Cuiling Zeng, Xin Wang, et al. 2021.

« Rab22a-NeoF1 Fusion Protein Promotes Osteosarcoma Lung Metastasis through Its Secretion into Exosomes ». *Signal Transduction and Targeted Therapy* 6 (1): 59. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00414-1>.

Zhou, Jian, Tang Liu, et Wanchun Wang. 2018. « Prognostic Significance of Matrix Metalloproteinase 9 Expression in Osteosarcoma: A Meta-Analysis of 16 Studies ». *Medicine* 97 (44): e13051.

<https://doi.org/10.1097/MD.00000000000013051>.

Zhou, Qian, Miao Xian, Senfeng Xiang, Danyan Xiang, Xuejing Shao, Jincheng Wang, Ji Cao, et al. 2017.

« All-Trans Retinoic Acid Prevents Osteosarcoma Metastasis by Inhibiting M2 Polarization of Tumor-Associated Macrophages ». *Cancer Immunology Research* 5 (7): 547-59. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-16-0259>.

Zhou, Xingliang, Jean Paul Chadarevian, Bryan Ruiz, et Qi-Long Ying. 2017. « Cytoplasmic and Nuclear TAZ Exert Distinct Functions in Regulating Primed Pluripotency ». *Stem Cell Reports* 9 (3): 732-41.

<https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.07.019>.

Zhou, Yan, Dong Yang, Qingcheng Yang, Xiaobin Lv, Wentao Huang, Zhenhua Zhou, Yaling Wang, et al.

2020. « Single-Cell RNA Landscape of Intratumoral Heterogeneity and Immunosuppressive Microenvironment in Advanced Osteosarcoma ». *Nature Communications* 11 (1): 6322.

<https://doi.org/10.1038/s41467-020-20059-6>.

Zhu, Limin, Madonna M. McManus, et Dennis P. M. Hughes. 2013. « Understanding the Biology of Bone Sarcoma from Early Initiating Events through Late Events in Metastasis and Disease Progression ».

Frontiers in Oncology 3. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00230>.

Zhu, Zhenhua, Zheng Jin, Mei Zhang, Yajun Tang, Guang Yang, Xiaowei Yuan, Jihang Yao, et Dahui Sun.

2017. « Prognostic Value of Programmed Death-Ligand 1 in Sarcoma: A Meta-Analysis ». *Oncotarget* 8 (35): 59570-80. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19168>.

Zieba, Jennifer T., Yi-Ting Chen, Brendan H. Lee, et Yangjin Bae. 2020. « Notch Signaling in Skeletal Development, Homeostasis and Pathogenesis ». *Biomolecules* 10 (2): 332.

<https://doi.org/10.3390/biom10020332>.

Zucchini, Cinzia, Maria Cristina Manara, Camilla Cristalli, Marianna Carrabotta, Sara Greco, Rosa Simona Pinca, Cristina Ferrari, et al. 2019. « ROCK2 Deprivation Leads to the Inhibition of Tumor Growth and

Metastatic Potential in Osteosarcoma Cells through the Modulation of YAP Activity ». *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 38 (1): 503. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1506-3>.

ANNEXES

Liste des présentations des travaux de recherche

Octobre 2020 : Poster

European Calcified Tissue Society (ECTS ; digital congres) , FRANCE

« Regulation of the expression and activity of YAP in osteosarcoma stem cells by Calpain-6»

Juin 2019 : Poster

Congrès des Journées Françaises des Tissus Minéralisés (JFBTM), FRANCE

« Calpain-6 dependant regulation of YAP/TAZ factors in osteosarcoma stem cells »

Mai 2019 : Présentation orale au pré-congrès (10mins) et poster

European Calcified Tissue Society (ECTS), BUDAPEST

« Contribution of cancer stem cells to the metastatic capacities of osteosarcoma »

Review

Metastatic progression of osteosarcomas: environmental versus oncogenic drivers

Guillaume Odri, Joëlle Tchicaya-Bouanga, Diane Jiyun Yoon, Dominique Modrowski

Metastatic progression of osteosarcomas: environmental versus oncogenic drivers

Guillaume Odri, Joëlle Tchicaya-Bouanga, Diane Ji Yun Yoon, Dominique Modrowski

INSERM UMR 1132, Biologie de l'os et du cartilage (BIOSCAR), Université de Paris, Faculté de Santé, UFR de médecine, Hôpital Lariboisière, Paris, France.

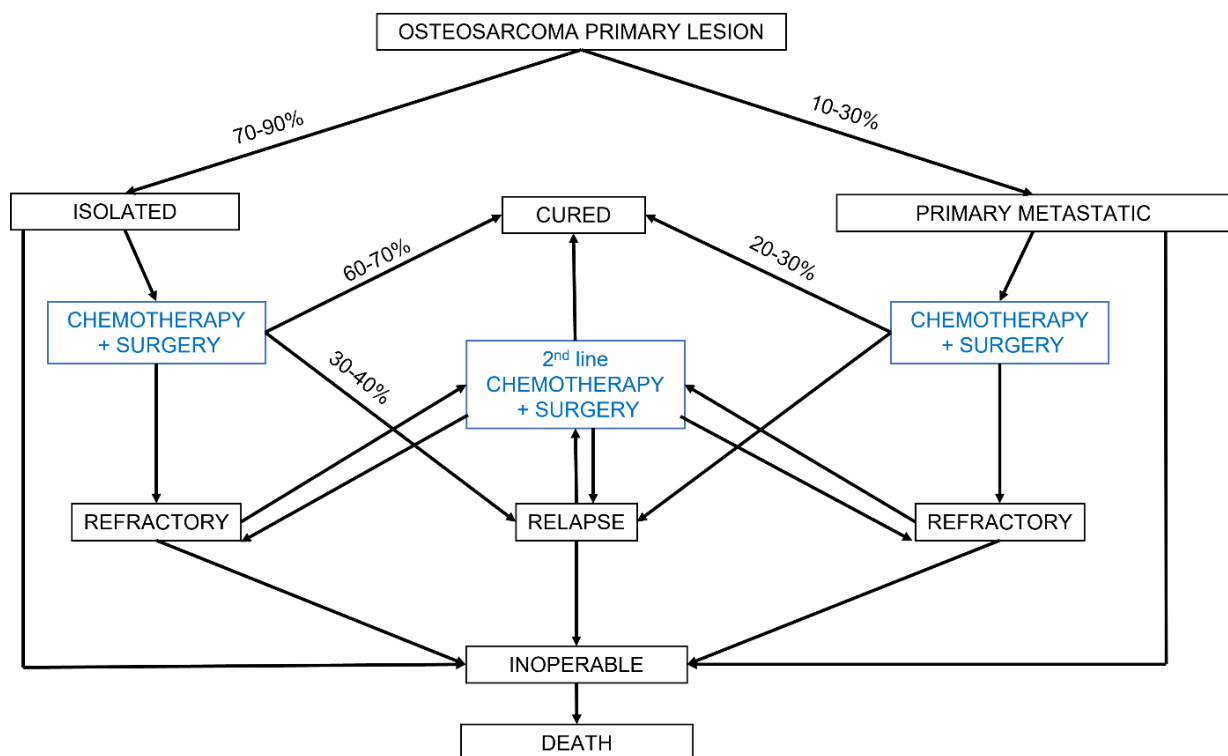


Figure 1: **Metastatic evolution in osteosarcoma patients.** Patient outcome depends on the occurrence of metastasis before diagnosis and/or relapse after treatment, on the response to chemotherapy and on the possibility to perform a full surgical resection.

1-Introduction

The presence of macroscopic metastasis is still the strongest predictor of survival in osteosarcoma patients [1], [2]. The mean 5-year overall survival rate for these patients remains very low, below 30% [2]–[4]. However, the metastatic spread of bone tumors seems to be a very heterogeneous disease. Indeed, metastases can be detected at initial diagnosis or appear at short or long term after the treatments. Some patients develop metastases during the treatment and have a refractory osteosarcoma and the worst prognosis. Although the most common site is lungs and bones [5], metastasis in osteosarcoma can appear in many other tissues. The secondary lesion can be unique or multiple and patients with more metastases have a less good prognosis [6]. Hence, it is crucial to better understand the origin of the heterogeneity and the specific mechanisms that could be targeted to stop or prevent these secondary diseases. Here, we review the different types of relapse/metastasis that have been clinically characterized in osteosarcoma patients and recent knowledges of mechanisms underlying the occurrence of osteosarcoma-associated metastases.

2-Clinical description of the metastases

2-1 Synchronous metastases

The metastases that are detected at diagnosis are called synchronous because they developed in parallel with the primary tumor (Fig. 1). Synchronous metastases are most frequently found in the lung [7]. However, bone metastases are also found in 10-30% of patients during clinical examinations and in 30-45% during autopsy studies [7]–[9]. In 1975, Enneking et al. did a systematic analysis of the entire bones of the limbs after amputation and found 25% of patients with a secondary lesion in bone of these limbs. This type of lesion was called skip metastasis [10]. Thus, skip metastasis is defined as a second foci of tumor cells within the same

bone as the primary lesion but that is separated from the primary foci by normal marrow tissues. Occasionally, it may arise at the opposing site of a joint and is referred to as trans articular skip metastasis. It can be single or multiple, distal or proximal to the primary tumor. According to the American joint committee on cancer (AJCC) staging system for primary malignant bone tumors, the patients with a discontinuous tumor in the primary bone site with no regional lymph node or other distant metastasis are considered stage 3. Skip metastasis can be found in 1.4 to 10% of the patients and are best seen using magnetic resonance imaging [11]–[16].

It was proposed that bone metastases are secondary events of lung lesions because most patients with bone metastases also have lung lesions. However, patients can develop bone metastases without or before any other non-skeletal metastases. In another hand, some osteosarcomas occur on several bones and are called multifocal osteosarcomas (MFOS) or multicentric osteosarcoma. This type of osteosarcoma accounts for 1 to 3% of the cases [17]. It is debated whether these MFOS are primary osteosarcomas with bone metastases or different and independent osteosarcomas arising in different bones. Most of the synchronous MFOS cases have a big tumor associated with smaller tumors which may favor a metastatic spread hypothesis; but synchronous MFOS with all the lesions being the same size have also been described [18]. A histological analysis of simultaneously resected tumors from two bone sites, found the same response rate to chemotherapy in the 2 lesions, supporting the thesis of bone-to-bone metastases from a primary tumor [19].

The risk factors associated with the appearance of lung metastasis at diagnosis are a delayed diagnosis, a higher grade, a larger tumor (> 5cm) or an axial localization and presence of bone or brain metastases [20]–[22]. The consequence is that the patients with synchronous

metastases have very heterogeneous outcomes depending on the number and the distribution of the metastases. For example, patients with unilateral lung metastases have a mean 5-year event free survival rate up to 75%. This rate falls to 0% for patients with synchronous MFOS [19]. The possibility of complete metastasectomy and the response to chemotherapy are other independent prognostic factors for patients with synchronous lung metastases [23]. In recent studies, it was reported that 45% of the patients with skip metastasis survived after 5-year, patients with skip metastases in the same bone having a better prognosis than trans-articular skip metastases [3], [12], [13], [16].

The best treatment regimen for patients with synchronous metastases is still not clear but should include chemotherapy protocols associated to primary lesion resection and metastasis resection [24]. For lung metastases, aggressive surgical attitude including removal of metastases at several sites has proven to be efficient to increase survival of these patients [4], [23], [25]. For patients with synchronous skip metastases, surgical resection of primary tumor including the skip metastases is necessary [3]. Patients with other organs synchronous metastasis or inoperable multiple metastasis often have multiorgan involvement and rapid progressive disease [3].

Early detection of disseminated cells might be a crucial point to better manage the metastatic disease. In high income countries, synchronous metastases are detected in 10 to 30% of the patients with osteosarcoma and this proportion has not changed in the past 50 years [2], [3], [5], [6], [20]. In low- and middle-income countries with delayed diagnosis, up to 40% of the patients have metastatic disease at presentation [26]. Hence, the identification of metastatic lesions largely depends on the available imaging technologies [22]. Because the diagnostic delay has improved in the past decades, the rate of patients with macro metastasis at

diagnostic tends to decrease, but at the same time, modern imaging leads to a better detection of the metastases and to increased number of patients with detected synchronous metastases. We can extrapolate that it is possible that we are still not able to detect every metastatic disease foci. This is suggested by histological analyses of amputated limbs or autopsies of patients with osteosarcoma which revealed a far greater number of metastases than could be detected by the imaging techniques. For example, histological analyses of resected lungs observed more metastases than on the pre-operative computed tomography [27]. Therefore, the exact proportion of patients with metastases at diagnosis could be much higher. This would be in line with the very low proportion (20%) of patients that survived without developing metastases when osteosarcomas were treated by surgery alone [28]. These 20% of surviving patients could be truly non-metastatic at diagnosis. This points out that despite improvements of the imaging techniques and biopsies, it is still required to have new tools to detect or predict the metastatic diseases and to discriminate metastatic and non-metastatic bone tumors.

2-2 Metachronous metastases

The metastases which appear after the end of the treatment are considered as relapses or recurrences (Fig. 1). These relapses are called early when they appear during the 24 months following the end of treatment, late when they appear after 5 years, and very late after 10 years [29][30], [31].

Osteosarcoma with isolated bone recurrence in absence of any lung metastasis, have been previously classified as metachronous MFOS. They represent 1% of osteosarcomas [32]. Like synchronous MFOS, these secondary lesions could be metastatic or second independent osteosarcomas. However, it is difficult not to see a metastatic relationship between the

primary lesion and the secondary bone lesion even in the absence of lung metastases, as metachronous metastases in organs other than lungs and bone (such as brain or pancreas) can be seen in the absence of lung metastases, showing other routes of metastatic dissemination. However, for very late metachronous MFOS arising in patients with predisposing syndromes such as p53 or Rb mutations, a second independent osteosarcoma cannot be ruled out. Patients with metachronous MFOS have better survival than patients with synchronous MFOS [17].

Local recurrence is when the tumor relapse at the site of the primary surgery. They account for 5-10% of the patients with relapse. Debate has been ongoing whether the local recurrences after limb salvage surgery could not relate to the persistence of skip metastases in the bone which harbored the primary tumor, no local recurrence was reported after radical excision taking out the entire bone [11], [33]. In contrast, different studies indicate a correlation between local recurrence and surgical margins, suggesting a possible residual disease of the primary tumor [34].

In some patients, metastases appear during neoadjuvant chemotherapy treatment and the osteosarcoma is considered to be refractory (Fig. 1). These osteosarcomas resistant to chemotherapy have the worst prognosis with a 5-year overall survival of only 8%.

2-3 The treatments of metastatic osteosarcoma

Chemotherapy has strongly reduced the early metastatic/relapse events in patients and delayed the appearance of metachronous metastases. However, more cases of late and very late recurrences up to more than 20 years have been reported. These relapses are mainly in lungs. Prior to chemotherapy, 80-90% of the patients had relapses and since the introduction of chemotherapy this rate fell to 30-50% [6], [8], [20], [35]–[38]. Furthermore, the mean time

to first relapse was around 6-9 months after surgery alone and is now above 18 months [1], [7], [38], [39]. Chemotherapy has also changed the pattern of relapses. The majority of patients (80-90%) developed lung metastases and other sites were clinically involved in less than 20% [7]. Now, 60-80% of the patients have a relapse in lungs and 20-40% of the patients have other sites involved. These sites can be bone, bowels, heart, brain, eyelid, epidural, muscle, pancreas, adrenal gland, eye, skin, stomach or breast [8], [35], [37], [39]. Of note, lymph node metastases seem to be rare in osteosarcoma and can be found clinically in 4% of the patients but they are detected in up to 28% of the patients at autopsy [7]. Chemotherapies have also changed the number of metastases at relapse from 72% of the patients with bilateral lung metastases to less than 30% [7], [8], [35], [37], [39].

In contrast, chemotherapy did not significantly change the survival of patients with metachronous metastases. In recent studies, the median post-metastasis survival duration is around 22 months and 5-year overall survival between 28-38% [2], [5], [40].

The identified risk factors for appearance of lung metastasis after treatment are male sex, tumor size ≥ 8 cm, histological grade G2, Enneking stages II, anatomic location to the distal femur, pathological subtype (conventional osteosarcoma), and high levels of alkaline phosphatase (ALP) at diagnosis [41]. The prognostic factors associated to better survival are timing of metastasis [40], younger age (< 60 y.o.) and surgical treatment of the primitive tumor [20]. The prognostic factors associated to shorter survival are primitive size (> 3 or 8cm), histological subtype (chondroblastic versus osteosarcoma), histological grade G2, Enneking stage II, early metastasis, local recurrence prior to metastasis, extrapulmonary metastasis, multiple pulmonary metastases, poor response to primary chemotherapy, lack of curative

treatment after metastasis including metastasectomy and increased level of ALP at diagnosis and LDH after metastasis [5], [41]–[43].

There is no standard treatment for patients with relapse. Patients with lung metastases should undergo metastasectomy when possible and repeated thoracotomy can be required [24]. Only patients who can achieve full surgical resection can achieve complete remission. Second line chemotherapy associated to surgery was shown to increase survival compared to surgery alone but its exact modality is still debated [23], [44], [45]. In a recent review, Gazouli et al evaluated 56 phase I and II trials for new treatment strategies in recurrent / metastatic osteosarcoma over the last two decades, including cytotoxic chemotherapy, targeted agent such as tyrosine kinase and mTOR inhibitors, immunotherapy and combinatorial approaches [44]. Most of these studies failed to show any benefit of these new drugs. High dose chemotherapy followed by stem cell transplantation showed some promising results but must be confirmed in prospective and randomized clinical trials [46]. Immunotherapy with anti CTLA4 (Ipilimumab) or anti-PD1 (Pembrolizumab and Nivolumab) monoclonal antibodies showed only a short stabilization of disease for a very few patients [47]–[49]. HER2-directed CART-cells in 16 patients with HER2 expressing osteosarcomas induced stabilization of the disease for 12 weeks in 3 patients, and one patient had a 90% tumor necrosis on histological analysis after surgical excision [40].

In conclusion, the presence of metastasis during osteosarcoma development is a predictor of bad prognosis. Metastatic diseases are very heterogeneous and the timing of appearance of the metastasis, the number, the size and probably many other factors also impact patient outcome. Only the patients who can have a full surgical resection of all the macro metastasis can survive. However, the presence of micro metastatic foci may be frequent and very early

events in osteosarcoma progression. They cannot be treated by surgery and may persist because they contain refractory tumor cells that are resistant to chemotherapy. Many new therapeutic options including targeted therapy, immunotherapy and intensive chemotherapy with stem cell transplantation are under investigation, but none has yet shown a major change in the overall survival.

3-Mechanisms of metastasis formation

3-1 Regulation of the metastatic capacities of primary tumor cells

The formation of metastases strongly depends on the capacities of tumor cells to leave the primary site. In line with that, the frequency of circulating osteosarcoma cells was found higher in patients with metastases than in patients with a localized tumor and the presence of circulating cells with mesenchymal characteristics after treatment can predict relapses and metastases occurrence [50], [51]. A large amount of studies focused on factors and signaling pathways which could influence the metastatic capacities of cells of primary tumors. There were performed by analyzing cell migration/invasion, using cell lines, metastasis formation in mouse models and more recently by comparing transcriptomes of metastatic with non-metastatic tumors and primary tumors with metastatic tissues [52], [53]. Previously, genes that could be metastasis drivers have been extensively studied but more recently epigenetic regulations by long non-coding- (lnc), micro- (mi) and circular-RNA have gain in interest [54]–[60]. These non-coding RNA also serve as prognostic markers [61]–[63]. Identifying their targets highlighted that cellular processes such as metabolism, autophagy and adaptation to hypoxia are altered with the metastatic potential of tumor cells [64]–[66]. The prognosis signatures also documented modifications of the tumor environment indicating that the

development of metastases in patients is associated with alterations of cytokines production and immune cell recruitment [65], [67].

3-2 Epithelial-mesenchymal transition (EMT)

Although it is contra-intuitive given their mesenchymal origin, epithelial to mesenchymal transition (EMT) seems to be a key process for sarcoma cell reprogramming toward an increased metastatic potential [68], [69]. Recently, a prognostic signature was shown to include FHIT, a gene that is downregulated in osteosarcoma tissues as compared to normal osteoblasts. Rescuing its expression in osteosarcoma cells resulted in down-regulation of N-cadherin and vimentin and up-regulation of E-cadherin, indicating that FHIT controls the switch between mesenchymal and epithelial markers [61]. These results demonstrated the relationship between the risk of metastatic progression and EMT in patients. In addition, the presence of the mesenchymal marker, N-cadherin, in osteosarcoma-derived vesicles was shown to predict metastasis progression [70]. Because micro-vesicles display markers of original cells, this further links the EMT process to the metastatic potential of the tumor cells. Various lnc- and mi-RNA have been shown to regulate EMT and thereby influence the metastatic behavior of the tumor cells [69]. Especially these RNA modulate the expression of transcription factors such as zinc finger E-box binding homeobox 1 (ZEB1) [71]–[73], Twist1 [74] or STAT3 [75] and signaling pathways including the Wnt/ β -catenin and NOTCH pathways [76], [77].

The effectors of the Hippo pathway, YAP and TAZ, are key regulators of the plasticity of osteosarcoma cells [78]. This signaling pathway integrates mechanical and nutritional cues to drive the cell adaptation to ECM physical properties, cell junction modifications, oxygen level or mechanical stresses (Fig.2) [79]–[81], [82]. The Hippo cascade is interconnected to the

multiple pathways depending on the activation of receptor tyrosine kinases, TGF- β , NOTCH, Wnt, G-protein-coupled receptors or integrins which together modulate YAP/TAZ nuclear translocation and TEAD or Smad transcriptional activities [83], [84], [85]. YAP/TAZ control EMT process directly via modulation of EMT genes or indirectly via modulation of signaling pathways (Fig. 2) [86]. In another hand, YAP and TAZ can interact directly with the key transcription factors of EMT, snail family transcriptional repressors (SNAIL and SLUG) and ZEB1 in mesenchymal stem cells [87]. These transcription complexes could therefore promote the acquisition of mesenchymal/pro-metastatic capacities in undifferentiated tumor cells.

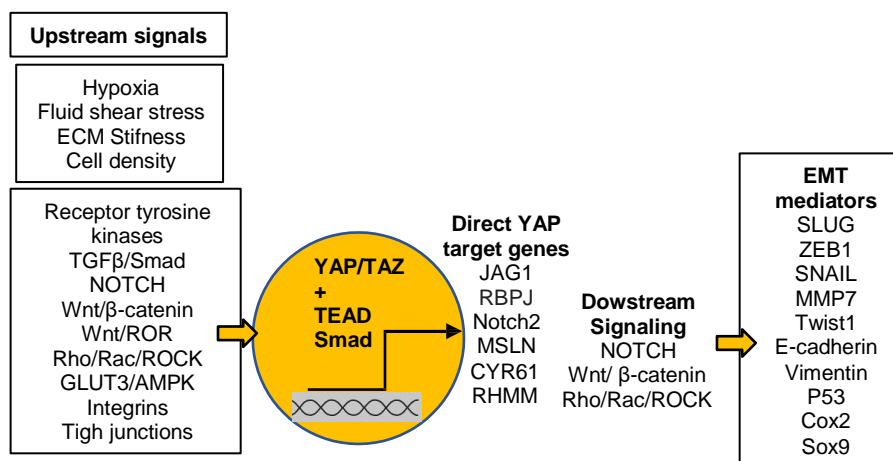


Figure 2: **The effectors of the Hippo pathway, YAP/TAZ, are at the core of the EMT regulation.** Their nuclear translocation and transcriptional activities depend on microenvironment cues and the multiple signaling pathways which integrate these signals to induce cell adaptation. YAP/TAZ in turn modulate the expression of genes and the activity of signaling pathways involved in the EMT process.

3-3 Role of the microenvironment

Aside intrinsic properties, cell evasion from the tumors also depends on the tumor microenvironment (TME). Tumors are complex association of different types of cells, including fibroblasts, endothelial and immune cells which communicate through metabolites, cytokines,

growth factors and micro vesicles. The tumor cohesion is ensured thanks to an extracellular matrix. Matrix proteins such as collagens, fibronectin and laminins were proven to have important roles to support cancer progression and metastases by influencing cell adhesion and migration and modulating integrin signaling and matrix metalloproteinase expression [88]–[90]. Zanduetta et al. identified matrix-Gla protein (MGP) in transcriptomic profiles of osteosarcomas. They showed that MGP influenced endothelial adhesion, trans-endothelial migration, *in vitro*, and tumor cell extravasation ability, *in vivo*. Metastatic patients had high levels of tumor and circulating MGP and the suppression of the protein resulted in reduced metastasis development in mice [91]. Hence, altering interactions between osteosarcoma cells and specific matrix proteins may offer therapeutic options to prevent the first steps of the metastasis process.

The role of tumor associated-macrophages (TAM) in the promotion of cancer cells invasion and metastasis capacities have been documented in diverse cancers [92]. In the same way, evidences of the contribution of these cells in the metastatic progression of the osteosarcomas were reported in cell and mouse models. These studies revealed that TAM communicate with tumor cells to activate a COX-2/STAT3 axis and promote EMT [93]. Maloney et al. reported that an inhibitor of EGFR acted on TAM and reduced invasion capacities and the metastatic burden in mice [94]. Moreover, Muramyl tripeptide phosphatidylethanolamine which activates monocytes and macrophages showed encouraging effects in patients with recurrent osteosarcomas [95], [96]. However, the numerous studies of TAMs in patients led to diverse conclusions about the identity of these immune cells and the association with the prognosis. Mainly, TAM infiltration was associated with better prognosis [97], [98]. Some authors found that the higher ratios of M1/M2 predict better overall and disease-free survival [99]. Depending on the methods M0, M1 and/or M2 were found within the tumors [97], [100],

[101]. Zhou et al. also identified alveolar macrophages with a pro-inflammatory phenotype in lung metastatic tissues [100]. Whether macrophage-like cells could be targets to prevent or treat osteosarcoma metastasis progression is a major issue to improve or implement novel immunotherapies.

3-4 Regulation of the metastatic niche

The notion of « metastatic inefficiency » was established in mouse models because of the observation that most of the tumor cells injected in the circulation, died some days after metastatic site colonization [102]. Hence, metastasis formation seems to be a very selective process. The primary tumors do not only provide cells with intrinsic properties to survive outside the tumors and colonize other sites. It is now well established that they also produce growth factors, cytokines and miRNA that can be transported in extracellular vesicles (EV) to modify local and distant sites and influence metastatic niches and thereby foster the development of disseminated tumors [103]. Macklin and colleagues isolated EV from highly metastatic osteosarcoma cell clones and showed their preferential addressing in lungs [104]. It was recently reported that the fusion protein Rab22a-NeoF1 and its partner PYK2 are produced in EV by subpopulations of osteosarcoma cells, can “pre-educate” the lungs of tumor-free mice inducing higher expression of chemokines and the recruitment of macrophages to enhance metastatic development [105]. Mechanistically, the growth factor TGF- β transported in EV was found to induce differentiation/activation of lung fibroblasts with increased expression of fibronectin [106].

However, in other models of human tumor cells xenografts in mice, osteosarcoma cell-derived EVs induced macrophage accumulation in lungs but had no effect on metastasis development [107]. This suggests that tumor-derived EV may not be the only required messengers. It also

points out that metastasis development may require a “soil” with intrinsic permissive characteristics. It is clear that tumor-independent events influence the metastatic development since metastasis out growth can occur in patients long after primary tumor resection. These events may be related to vascularization, metabolism, and immunity.

Thus, metastasis outgrowth could not be driven only by specific gene alterations in tumor cells but also depends on the permissiveness of the environment [108], [109]. The tumor-independent conditions that promote the metastatic disease in osteosarcoma patients is a large field to be explored.

4-Metastasis heterogeneity

An important question is why consensus sets of targetable genes or microRNA are still missing and why it is still impossible to develop a therapeutic strategy to reduce the number of patients with a metastatic disease, while numerous metastasis promoting/predicting factors have been identified? The heterogeneity of the metastatic tissues could be part of the answer.

4-1 Timing of dissemination

Histological comparisons of primary osteosarcomas and the associated lung metastases first revealed the large variety in the dissemination process [110]. Indeed, unilateral, bilateral solitary and multiple lung lesions were described. In a group of 20 bone sarcomas that were compared to the lung lesions, 60% had identical osteoblastic or chondroblastic histology and 40% had different histology [110]. Recently, genomic and transcriptomic analyses further documented the complex relationships between primary bone tumor and metastases [52], [111], [112]. Wang et al. show that metastases lesions have increased mutational burden and genome instability as compared to matched primary tumors. However, metastatic cell clones still have common genomic alterations with the primary tumors or strongly different genomic

landscapes. These genetic divergences may be the consequence of different dissemination timing with part of the metastases deriving from the mature tumor, whereas, other evolving in parallel with the bone tumor [111], [112]. Consistent with previous studies in solid tumors it appears that osteosarcoma dissemination may depend on tumor maturation or is an early or continuous event during bone tumor development [113], [114]. Interestingly, metastases with a parallel evolution developed faster after primary tumor resection. This indicates that the mode of metastasis development has clinical significance in the disease progression. It may be the consequence of a high permissiveness of the host tissue.

4-2 Metastasis cell founders

Mainly 2 models of tumorigenesis have evolved in parallel. The stochastic one predicts that tumor cell clones undergo Darwinian selective pressure to survive and grow. The other model includes particular tumor cells with stemness features and imply a hierarchical organization. These mechanisms are not exclusive and can be equally involved in the formation of primary osteosarcomas. Although the existence of cancer stem-like cells was well documented in osteosarcomas, the possible contribution of these cells to the metastatic process is still unclear.

Clonal progression of osteosarcoma metastases was first supported by tracing experiments that showed a polyclonal seeding in lungs from bone tumor [115]. Of note, these experiments were conducted in immunodeficient mice and did not take in account the possible selection of tumor clones by the immune system. However, phylogenetic analyses confirmed the polyclonal features of metastatic lesions in patients [45]. Single-cell RNAseq analyses also identified diverse osteosarcoma cell populations with specialized characteristics, i.e., high proliferation, angiogenesis, IFN- α and IFN- γ , MYC and oxidative phosphorylation, hypoxia

signaling or inflammatory responses [100]. By analyzing differentiation gene signatures in cell clones of chondroblastic osteosarcomas, these authors revealed that malignant chondroblastic osteosarcoma cells could be transdifferentiated into malignant osteoblastic cells. Liu and colleagues further demonstrated the presence of particular osteoblastic clones within bone tumors that are at the starting position of differentiation paths [116]. It was the first evidence in patients that osteosarcoma cell clones may not develop independently but are linked by hierarchical relationships and derive or “differentiate” from each other as it was shown in other types of tumors [117], [118]. Together these data further support the concept of cancer stem/precursor cells (CSCs) that contribute to osteosarcoma tumorigenesis. Different teams have previously described osteosarcoma cells that grow in spheres, express embryonic stem cell markers and have high tumorigenic capacities [119], [120]. We identified calpain-6 as a marker of sarcoma SCs [121]. We showed that calpain-6-expressing cells are at the head of a cell hierarchy. These cells were able to rest as a slowly growing/dormant disease in lungs, months after orthotopic implantation of few osteosarcoma cells in mice [121]. Hence, sarcoma stem cells could specifically contribute to the metastatic process but the mechanisms have to be further elucidated.

In patients CSCs could be selected after chemotherapy and be responsible of the residual disease thanks to their chemoresistance capacities [122], [123], [124], [125]. The most characterized CSCs are those of carcinomas. Comparing early and advanced lung metastases of breast carcinoma, it was observed that cells of low burden metastases expressed CSC markers, whereas, cells of high burden lesion had the same gene signature than the primary tumors [126]. This suggests that carcinoma SCs are involved during early steps of metastasis outgrowth and that metastases could evolve in the same way as the primary tumors. In support to this, the acquisition of a metastatic behavior is strongly correlated with the EMT

program in CSCs [127]–[129]. However, metastasis development is also dependent on cell plasticity and the ability to produce committed epithelial progeny. Indeed, blocking tumor cells in the mesenchymal phenotype was sufficient to inhibit metastasis progression in different models of epithelial cancer [126], [130]. In the same way, the EMT program seems to be closely associated with both stemness and metastasis capacities during osteosarcoma progression [131], [132]. In another hand, metastatic capacities correlate with SC features. For example, metastatic potential of osteosarcoma cells was found to correlate with aldehyde dehydrogenase 1A1 activity, a well-known CSC marker [133]. Enhanced Transglutaminase-2 expression in metastatic osteosarcomas contributes to migratory and invasive properties of tumor cells but also to stem cell phenotype [134]. Interestingly, Zhang et al. have described that osteosarcoma SCs can undergo myofibroblastic reprogramming that mimics a process of non-tumor myofibroblasts by inducing fibrosis in lungs that, in turn, promotes metastasis growth [135]. Hence, osteosarcoma SCs have specific features such as EMT, high migration capacities, chemoresistance and plasticity that make them strong candidates to drive an efficient metastatic process.

One possible mechanism to explain chemo resistance and the ability to re-initiate tumor development after treatment is that CSCs induce immunosuppression [136]. An ancient idea is that because cancer cells differ from normal cells due to the genetic instability and a high rate of mutations, tumor growth should induce innate and adaptive immune responses. In support to that, cancer specific antigens have been identified and an immune surveillance was shown to keep quiescent metastasis cells [137]. However, CSCs can overcome this constrain through intrinsic mechanisms and through modeling a specific microenvironment. For example, similarly to normal SCs, CSCs express low levels of class I MHC [138]. In contrast, CSCs express high levels of programmed death ligand 1 (PDL-1), a checkpoint inhibitor that

suppresses T cell activation and promotes Treg differentiation [139], [140]. In another hand, CSC-specific microenvironment called niche was shown to comprise matrix proteins such as Tenascins that inhibit CD4+ and CD8+ T cells activation, proliferation and production of interferon- γ [141]. Finally, there are many evidences that the dialogue between the CSCs and the environment results in the production of a specific set of inflammatory mediators that regulate, in turn, the recruitment and differentiation of the immune cells [136]. In conclusion, the CSCs are able to influence the immunity set point that is the balance which determines pro- or anti-tumor immunity.

5-Conclusions

Chemotherapy and surgery have improved the outcome of patients with a local bone tumor. Its impact on metastatic diseases is less clear. In spite of the huge number of prognostic markers/signatures that have been associated with osteosarcoma dissemination, specific therapeutic targets are still missing. Thanks to new technologies the complex relations between primary and disseminated tumors are going to be elucidated. Osteosarcoma SCs were proposed to play a key role in the organization of the metastases and to be key contributors in the metastatic process. Hence, further characterization of these cells especially of their possible role in immune suppression may help to unveil novel therapeutic avenues.

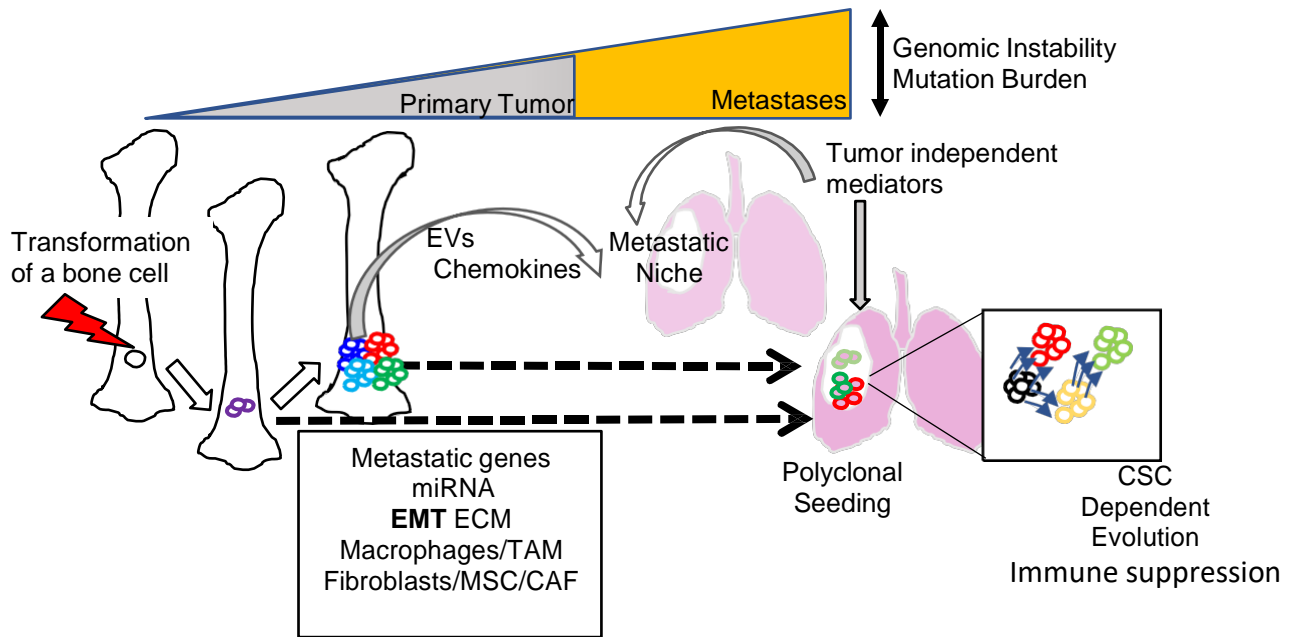


Figure 3: Schematic view of the formation of osteosarcoma-derived lung metastases accompanied with increased genomic alterations. The metastatic capacities of the bone tumor cells are dependent on gene alterations (metastatic genes) and epigenetic regulations (miRNA). Both can contribute to the epithelial-mesenchymal transition (EMT). The extracellular matrix (ECM) and the tumor-associated fibroblasts (CAF) and macrophages (TAM) are responsible for microenvironment-mediated promotion of tumor progression. Cells can escape the primary site during early or late stages of tumor development (as indicated with the dotted arrows). The primary tumor produces factors that can travel in extracellular vesicles (EVs) to induce or activate metastatic niches. The metastatic niche could be regulated by tumor independent factors that make the host highly permissive for metastasis development. Polyclonal seeding can be associated with a hierarchical progression with cancer stem cells (CSCs) as initiating population of metastases.

REFERENCES

- [1] S. S. Bielack *et al.*, "Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1,702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols," *J. Clin. Oncol.*, vol. 20, no. 3, pp. 776–790, Feb. 2002, doi: 10.1200/JCO.2002.20.3.776.
- [2] S. Smeland *et al.*, "Survival and prognosis with osteosarcoma: outcomes in more than 2000 patients in the EURAMOS-1 (European and American Osteosarcoma Study) cohort," *Eur. J. Cancer*, vol. 109, pp. 36–50, Mar. 2019, doi: 10.1016/J.EJCA.2018.11.027.
- [3] L. Kager *et al.*, "Primary metastatic osteosarcoma: presentation and outcome of patients treated on neoadjuvant Cooperative Osteosarcoma Study Group protocols," *J. Clin. Oncol.*, vol. 21, no. 10, pp. 2011–2018, May 2003, doi: 10.1200/JCO.2003.08.132.
- [4] G. Bacci *et al.*, "High grade osteosarcoma of the extremities with lung metastases at presentation: treatment with neoadjuvant chemotherapy and simultaneous resection of primary and metastatic lesions," *J. Surg. Oncol.*, vol. 98, no. 6, pp. 415–420, Nov. 2008, doi: 10.1002/JSO.21140.
- [5] W. Kim, I. Han, J. S. Lee, H. S. Cho, J. W. Park, and H. S. Kim, "Postmetastasis survival in high-grade extremity osteosarcoma: A retrospective analysis of prognostic factors in 126 patients," *J. Surg. Oncol.*, vol. 117, no. 6, pp. 1223–1231, May 2018, doi: 10.1002/JSO.24963.
- [6] P. A. Meyers *et al.*, "Osteogenic sarcoma with clinically detectable metastasis at initial presentation," *J. Clin. Oncol.*, vol. 11, no. 3, pp. 449–453, 1993, doi: 10.1200/JCO.1993.11.3.449.
- [7] G. M. Jeffree, C. H. G. Price, and H. A. Sissons, "The metastatic patterns of osteosarcoma," *Br. J. Cancer*, vol. 32, no. 1, pp. 87–107, 1975, doi: 10.1038/BJC.1975.136.
- [8] A. E. Giuliano, S. Feig, and F. R. Eilber, "Changing metastatic patterns of osteosarcoma," *Cancer*, vol. 54, no. 10, pp. 2160–2164, 1984, doi: 10.1002/1097-0142(19841115)54:10<2160::aid-cnrc2820541016>3.0.co;2-p.
- [9] L. Le Aung *et al.*, "Metachronous skeletal osteosarcoma in patients treated with adjuvant and neoadjuvant chemotherapy for nonmetastatic osteosarcoma," *J. Clin. Oncol.*, vol. 21, no. 2, pp. 342–348, Jan. 2003, doi: 10.1200/JCO.2003.06.177.
- [10] W. F. Enneking and A. Kagan, "The implications of 'skip' metastases in osteosarcoma," *Clin. Orthop. Relat. Res.*, vol. 111, no. 111, pp. 33–41, 1975, doi: 10.1097/00003086-197509000-00005.
- [11] P. Wuisman and W. F. Enneking, "Prognosis for patients who have osteosarcoma with skip metastasis," *J. Bone Joint Surg. Am.*, vol. 72, no. 1, pp. 60–68, 1990, doi: 10.2106/00004623-199072010-00010.
- [12] L. Kager *et al.*, "Skip metastases in osteosarcoma: experience of the Cooperative Osteosarcoma Study Group," *J. Clin. Oncol.*, vol. 24, no. 10, pp. 1535–1541, Apr. 2006,

doi: 10.1200/JCO.2005.04.2978.

- [13] N. Li, X. Wei, Z. Zhang, and Y. Zhang, "Use Of Microwave Thermal Ablation In Management Of Skip Metastases In Extremity Osteosarcomas," *Cancer Manag. Res.*, vol. 11, pp. 9843–9848, 2019, doi: 10.2147/CMAR.S221967.
- [14] J. R. Barnett, P. Gikas, C. Gerrand, T. W. Briggs, and A. Saifuddin, "The sensitivity, specificity, and diagnostic accuracy of whole-bone MRI for identifying skip metastases in appendicular osteosarcoma and Ewing sarcoma," *Skeletal Radiol.*, vol. 49, no. 6, pp. 913–919, Jun. 2020, doi: 10.1007/S00256-019-03364-0.
- [15] P. Yang *et al.*, "Survival of osteosarcoma patients following diagnosis of synchronous skip metastases," *J. Orthop.*, vol. 18, pp. 121–125, Mar. 2019, doi: 10.1016/J.JOR.2019.10.003.
- [16] A. Saifuddin, M. Michelagnoli, and I. Pressney, "Skip metastases in high-grade intramedullary appendicular osteosarcoma: an indicator of more aggressive disease?," *Skeletal Radiol.*, vol. 50, no. 12, pp. 2415–2422, Dec. 2021, doi: 10.1007/S00256-021-03814-8.
- [17] D. Corradi *et al.*, "Multicentric osteosarcoma: clinicopathologic and radiographic study of 56 cases," *Am. J. Clin. Pathol.*, vol. 136, no. 5, pp. 799–807, Nov. 2011, doi: 10.1309/AJCPOV0OATKCNAZP.
- [18] F. Gherlinzoni, B. Antoci, and V. Canale, "Case report 250. Multicentric osteosarcomata (osteosarcomatosis)," *Skeletal Radiol.*, vol. 10, no. 4, pp. 281–285, Nov. 1983, doi: 10.1007/BF00357907.
- [19] A. Longhi *et al.*, "Neoadjuvant chemotherapy for patients with synchronous multifocal osteosarcoma: results in eleven cases," *J. Chemother.*, vol. 13, no. 3, pp. 324–330, 2001, doi: 10.1179/JOC.2001.13.3.324.
- [20] C. Zhang *et al.*, "Lung metastases at the initial diagnosis of high-grade osteosarcoma: prevalence, risk factors and prognostic factors. A large population-based cohort study," *Sao Paulo Med. J.*, vol. 137, no. 5, pp. 423–429, Sep. 2019, doi: 10.1590/1516-3180.2018.0381120619.
- [21] L. Xie, W. Huang, H. Wang, C. Zheng, and J. Jiang, "Risk factors for lung metastasis at presentation with malignant primary osseous neoplasms: a population-based study," *J. Orthop. Surg. Res.*, vol. 15, no. 1, Jan. 2020, doi: 10.1186/S13018-020-1571-5.
- [22] S. Yoshida *et al.*, "Delay in diagnosis of primary osteosarcoma of bone in children: Have we improved in the last 15 years and what is the impact of delay on diagnosis?," *J. bone Oncol.*, vol. 28, Jun. 2021, doi: 10.1016/J.JBO.2021.100359.
- [23] A. Gok Durnali *et al.*, "Outcomes of Adolescent and Adult Patients with Lung Metastatic Osteosarcoma and Comparison of Synchronous and Metachronous Lung Metastatic Groups," *PLoS One*, vol. 11, no. 5, May 2016, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0152621.
- [24] P. G. Casali *et al.*, "Bone sarcomas: ESMO-PaedCan-EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up," *Ann. Oncol.*, vol. 29, pp. iv79–iv95, Oct. 2018, doi: 10.1093/annonc/mdy310.

- [25] C. Meazza and P. Scanagatta, "Metastatic osteosarcoma: a challenging multidisciplinary treatment," *Expert Rev. Anticancer Ther.*, vol. 16, no. 5, pp. 543–556, May 2016, doi: 10.1586/14737140.2016.1168697.
- [26] L. Vasquez *et al.*, "Prognostic impact of diagnostic and treatment delays in children with osteosarcoma," *Pediatr. Blood Cancer*, vol. 67, no. 4, Apr. 2020, doi: 10.1002/PBC.28180.
- [27] T. E. Heaton *et al.*, "A 20-year retrospective analysis of CT-based pre-operative identification of pulmonary metastases in patients with osteosarcoma: A single-center review," *J. Pediatr. Surg.*, vol. 52, no. 1, pp. 115–119, Jan. 2017, doi: 10.1016/J.JPESURG.2016.10.034.
- [28] C. H. G. Price and G. M. Jeffree, "Metastatic spread of osteosarcoma," *Br. J. Cancer*, vol. 28, no. 6, pp. 515–524, 1973, doi: 10.1038/BJC.1973.181.
- [29] S. J. Strauss, A. McTiernan, and J. S. Whelan, "Late relapse of osteosarcoma: implications for follow-up and screening," *Pediatr. Blood Cancer*, vol. 43, no. 6, pp. 692–697, Nov. 2004, doi: 10.1002/PBC.20154.
- [30] K. Wasilewski-Masker *et al.*, "Late recurrence in pediatric cancer: a report from the Childhood Cancer Survivor Study," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 101, no. 24, pp. 1709–1720, Dec. 2009, doi: 10.1093/JNCI/DJP417.
- [31] Y. Kaneuchi *et al.*, "Very late relapse of high-grade osteosarcoma: A case report and review of the literature," *Medicine (Baltimore)*, vol. 99, no. 29, p. e21206, Jul. 2020, doi: 10.1097/MD.0000000000021206.
- [32] P. Brandal, B. Bjerkehagen, Ø. S. Bruland, S. Skjeldal, T. V. Bogsrud, and K. S. Hall, "Synchronous and metachronous skeletal osteosarcomas: the Norwegian Radium Hospital experience," *Acta Oncol.*, vol. 48, no. 8, pp. 1165–1172, 2009, doi: 10.3109/02841860903032809.
- [33] M. A. Simon, M. A. Aschliman, N. Thomas, and H. J. Mankin, "Limb-salvage treatment versus amputation for osteosarcoma of the distal end of the femur," *J. Bone Joint Surg. Am.*, vol. 68, no. 9, pp. 1331–1337, 1986, doi: 10.2106/00004623-198668090-00005.
- [34] T. E. Bertrand, A. Cruz, O. Binitie, D. Cheong, and G. D. Letson, "Do Surgical Margins Affect Local Recurrence and Survival in Extremity, Nonmetastatic, High-grade Osteosarcoma?," *Clin. Orthop. Relat. Res.*, vol. 474, no. 3, pp. 677–683, Mar. 2016, doi: 10.1007/S11999-015-4359-X.
- [35] G. Bacci *et al.*, "Changing pattern of relapse in osteosarcoma of the extremities treated with adjuvant and neoadjuvant chemotherapy," *J. Chemother.*, vol. 7, no. 3, pp. 230–239, 1995, doi: 10.1179/JOC.1995.7.3.230.
- [36] B. Kempf-Bielack *et al.*, "Osteosarcoma relapse after combined modality therapy: an analysis of unselected patients in the Cooperative Osteosarcoma Study Group (COSS)," *J. Clin. Oncol.*, vol. 23, no. 3, pp. 559–568, 2005, doi: 10.1200/JCO.2005.04.063.
- [37] S. S. Bielack *et al.*, "Second and subsequent recurrences of osteosarcoma:

- presentation, treatment, and outcomes of 249 consecutive cooperative osteosarcoma study group patients,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 27, no. 4, pp. 557–565, Feb. 2009, doi: 10.1200/JCO.2008.16.2305.
- [38] E. Thebault *et al.*, “Successive Osteosarcoma Relapses after the First Line O2006/Sarcome-09 Trial: What Can We Learn for Further Phase-II Trials?,” *Cancers (Basel)*, vol. 13, no. 7, Apr. 2021, doi: 10.3390/CANCERS13071683.
- [39] S. N. Chi *et al.*, “The patterns of relapse in osteosarcoma: the Memorial Sloan-Kettering experience,” *Pediatr. Blood Cancer*, vol. 42, no. 1, pp. 46–51, 2004, doi: 10.1002/PBC.10420.
- [40] G. Ahmed *et al.*, “Effect of timing of pulmonary metastasis occurrence on the outcome of metastasectomy in osteosarcoma patients,” *J. Pediatr. Surg.*, vol. 54, no. 4, pp. 775–779, Apr. 2019, doi: 10.1016/J.JPESURG.2018.06.019.
- [41] J. Bao *et al.*, “A Retrospective Clinicopathological Study of Osteosarcoma Patients with Metachronous Metastatic Relapse,” *J. Cancer*, vol. 10, no. 13, pp. 2982–2990, 2019, doi: 10.7150/JCA.30750.
- [42] A. D. Slade *et al.*, “Effect of concurrent metastatic disease on survival in children and adolescents undergoing lung resection for metastatic osteosarcoma,” *J. Pediatr. Surg.*, vol. 50, no. 1, pp. 157–160, 2015, doi: 10.1016/J.JPESURG.2014.10.038.
- [43] W. Li and S. Zhang, “Survival of patients with primary osteosarcoma and lung metastases,” *J. BUON.*, vol. 23, no. 5, pp. 1500–1504, Sep. 2018, Accessed: Nov. 11, 2021. [Online]. Available: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/30570878/>.
- [44] I. Gazouli *et al.*, “Systematic Review of Recurrent Osteosarcoma Systemic Therapy,” *Cancers (Basel)*, vol. 13, no. 8, Apr. 2021, doi: 10.3390/CANCERS13081757.
- [45] E. Lavit *et al.*, “Treatment of 120 adult osteosarcoma patients with metachronous and synchronous metastases: A retrospective series of the French Sarcoma Group,” *Int. J. cancer*, 2021, doi: 10.1002/IJC.33823.
- [46] F. Fagioli *et al.*, “High-dose chemotherapy in the treatment of relapsed osteosarcoma: an Italian sarcoma group study,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 20, no. 8, pp. 2150–2156, Apr. 2002, doi: 10.1200/JCO.2002.08.081.
- [47] H. A. Tawbi *et al.*, “Pembrolizumab in advanced soft-tissue sarcoma and bone sarcoma (SARC028): a multicentre, two-cohort, single-arm, open-label, phase 2 trial,” *Lancet. Oncol.*, vol. 18, no. 11, pp. 1493–1501, Nov. 2017, doi: 10.1016/S1470-2045(17)30624-1.
- [48] M. Burgess and H. Tawbi, “Immunotherapeutic approaches to sarcoma,” *Curr. Treat. Options Oncol.*, vol. 16, no. 6, Jun. 2015, doi: 10.1007/S11864-015-0345-5.
- [49] M. S. Merchant *et al.*, “Adjuvant Immunotherapy to Improve Outcome in High-Risk Pediatric Sarcomas,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 22, no. 13, pp. 3182–3191, Jul. 2016, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2550.
- [50] M. Li *et al.*, “Prognostic and clinicopathological significance of circulating tumor cells

- in osteosarcoma," *J. Bone Oncol.*, vol. 16, Jun. 2019, doi: 10.1016/j.jbo.2019.100236.
- [51] Z. J. Wu, J. C. Tan, X. Qin, B. Liu, and Z. C. Yuan, "Significance of circulating tumor cells in osteosarcoma patients treated by neoadjuvant chemotherapy and surgery," *Cancer Manag. Res.*, vol. 10, pp. 3333–3339, 2018, doi: 10.2147/CMAR.S176515.
- [52] B. S. Moriarity *et al.*, "A Sleeping Beauty forward genetic screen identifies new genes and pathways driving osteosarcoma development and metastasis," *Nat. Genet.*, vol. 47, no. 6, pp. 615–624, May 2015, doi: 10.1038/ng.3293.
- [53] C. Adamopoulos, A. N. Gargalionis, E. K. Basdra, and A. G. Papavassiliou, "Deciphering signaling networks in osteosarcoma pathobiology," *Exp. Biol. Med.*, vol. 241, no. 12, pp. 1296–1305, Jun. 2016, doi: 10.1177/1535370216648806.
- [54] Z. Li *et al.*, "An update on the roles of circular RNAs in osteosarcoma," *Cell Proliferation*, vol. 54, no. 1. Cell Prolif, Jan. 01, 2021, doi: 10.1111/cpr.12936.
- [55] Y. Zhang, J. Li, Y. Wang, J. Jing, and J. Li, "The roles of circular RNAs in osteosarcoma," *Med. Sci. Monit.*, vol. 25, pp. 6378–6382, Aug. 2019, doi: 10.12659/MSM.915559.
- [56] N. E. Kushlinskii, M. V. Fridman, and E. A. Braga, "Long Non-Coding RNAs as Competitive Endogenous RNAs in Osteosarcoma," *Molekuliarnaia biologii*, vol. 54, no. 5. Mol Biol (Mosk), pp. 776–801, Sep. 01, 2020, doi: 10.31857/S0026898420050055.
- [57] G. Botti, A. Giordano, F. Feroce, A. R. De Chiara, and M. Cantile, "Noncoding RNAs as circulating biomarkers in osteosarcoma patients," *J. Cell. Physiol.*, vol. 234, no. 11, pp. 19249–19255, Nov. 2019, doi: 10.1002/JCP.28744.
- [58] L. Llobat and O. Gourbault, "Role of micrnas in human osteosarcoma: Future perspectives," *Biomedicines*, vol. 9, no. 5. Biomedicines, May 01, 2021, doi: 10.3390/biomedicines9050463.
- [59] J. Zhang, Y. G. Yan, C. Wang, S. J. Zhang, X. H. Yu, and W. J. Wang, "MicroRNAs in osteosarcoma," *Clin. Chim. Acta*, vol. 444, pp. 9–17, Apr. 2015, doi: 10.1016/J.CCA.2015.01.025.
- [60] Z. Jamali *et al.*, "Autophagy regulation by microRNAs: Novel insights into osteosarcoma therapy," *IUBMB Life*, vol. 72, no. 7, pp. 1306–1321, Jul. 2020, doi: 10.1002/IUB.2277.
- [61] D. Zheng *et al.*, "A Novel Six Metastasis-Related Prognostic Gene Signature for Patients With Osteosarcoma," *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 9, Jul. 2021, doi: 10.3389/fcell.2021.699212.
- [62] T. Ying, J. ling Dong, C. Yuan, P. Li, and Q. Guo, "The lncRNAs RP1-261G23.7, RP11-69E11.4 and SATB2-AS1 are a novel clinical signature for predicting recurrent osteosarcoma," *Biosci. Rep.*, vol. 40, no. 1, Jan. 2020, doi: 10.1042/BSR20191251.
- [63] Y. Shi *et al.*, "A risk signature-based on metastasis-associated genes to predict survival of patients with osteosarcoma," *J. Cell. Biochem.*, vol. 121, no. 7, pp. 3479–3490, Jul. 2020, doi: 10.1002/jcb.29622.
- [64] W. Qi, Q. Yan, M. Lv, D. Song, X. Wang, and K. Tian, "Prognostic Signature of

- Osteosarcoma Based on 14 Autophagy-Related Genes," *Pathol. Oncol. Res.*, vol. 27, Jul. 2021, doi: 10.3389/pore.2021.1609782.
- [65] F. Jiang *et al.*, "A Hypoxia Gene-Based Signature to Predict the Survival and Affect the Tumor Immune Microenvironment of Osteosarcoma in Children," *J. Immunol. Res.*, vol. 2021, pp. 1–13, Jul. 2021, doi: 10.1155/2021/5523832.
- [66] M. Yang, X. Ma, Z. Wang, T. Zhang, and Y. Hua, "Identification of a novel glycolysis-related gene signature for predicting the prognosis of osteosarcoma patients," *Aging (Albany. NY)*, vol. 13, no. 9, pp. 12896–12918, May 2021, doi: 10.18632/aging.202958.
- [67] K. W. Xiao *et al.*, "Construction and Validation of a Macrophage-Associated Risk Model for Predicting the Prognosis of Osteosarcoma," *J. Oncol.*, vol. 2021, 2021, doi: 10.1155/2021/9967954.
- [68] M. Ehnman, W. Chaabane, F. Haglund, and P. Tsagkozis, "The Tumor Microenvironment of Pediatric Sarcoma: Mesenchymal Mechanisms Regulating Cell Migration and Metastasis," *Curr. Oncol. Rep.*, vol. 21, no. 10, Oct. 2019, doi: 10.1007/S11912-019-0839-6.
- [69] Z. X. Chong, S. K. Yeap, and W. Y. Ho, "Unraveling the roles of miRNAs in regulating epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in osteosarcoma," *Pharmacol. Res.*, vol. 172, p. 105818, Oct. 2021, doi: 10.1016/J.PHRS.2021.105818.
- [70] J. Wang *et al.*, "Exosomal PD-L1 and N-cadherin predict pulmonary metastasis progression for osteosarcoma patients," *J. Nanobiotechnology*, vol. 18, no. 1, Dec. 2020, doi: 10.1186/s12951-020-00710-6.
- [71] R. Jiang, C. Zhang, G. Liu, R. Gu, and H. Wu, "MicroRNA-126 Inhibits Proliferation, Migration, Invasion, and EMT in Osteosarcoma by Targeting ZEB1," *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 118, no. 11. Wiley-Liss Inc., pp. 3765–3774, Nov. 01, 2017, doi: 10.1002/jcb.26024.
- [72] H. Yao, G. Hou, Q. Y. Wang, W. Bin Xu, H. Q. Zhao, and Y. C. Xu, "LncRNA SPRY4-IT1 promotes progression of osteosarcoma by regulating ZEB1 and ZEB2 expression through sponging of miR-101 activity," *Int. J. Oncol.*, vol. 56, no. 1, pp. 85–100, 2020, doi: 10.3892/IJO.2019.4910.
- [73] T. Feng *et al.*, "The microRNA-708-5p/ZEB1/EMT axis mediates the metastatic potential of osteosarcoma," *Oncol. Rep.*, vol. 43, no. 2, pp. 491–502, 2020, doi: 10.3892/or.2019.7452.
- [74] S. T. Zhu, X. Wang, J. Y. Wang, G. H. Xi, and Y. Liu, "Downregulation of miR-22 Contributes to Epithelial-Mesenchymal Transition in Osteosarcoma by Targeting Twist1," *Front. Oncol.*, vol. 10, Apr. 2020, doi: 10.3389/fonc.2020.00406.
- [75] Y. Chen, J. Li, J. K. Xiao, L. Xiao, B. W. Xu, and C. Li, "The lncRNA NEAT1 promotes the epithelial-mesenchymal transition and metastasis of osteosarcoma cells by sponging miR-483 to upregulate STAT3 expression," *Cancer Cell Int.*, vol. 21, no. 1, Dec. 2021, doi: 10.1186/S12935-021-01780-8.
- [76] S. Zhang *et al.*, "miR-766-3p Targeting BCL9L Suppressed Tumorigenesis, Epithelial-

- Mesenchymal Transition, and Metastasis Through the β -Catenin Signaling Pathway in Osteosarcoma Cells," *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 8, Oct. 2020, doi: 10.3389/fcell.2020.594135.
- [77] H. Wang and P. Zhang, "lncRNA-CASC15 promotes osteosarcoma proliferation and metastasis by regulating epithelial-mesenchymal transition via the Wnt/ β -catenin signaling pathway," *Oncol. Rep.*, vol. 45, no. 5, May 2021, doi: 10.3892/or.2021.8027.
- [78] H. Kovar, L. Bierbaumer, and B. Radic-Sarikas, "The YAP/TAZ Pathway in Osteogenesis and Bone Sarcoma Pathogenesis," *Cells 2020, Vol. 9, Page 972*, vol. 9, no. 4, p. 972, Apr. 2020, doi: 10.3390/CELLS9040972.
- [79] F. Calvo *et al.*, "Mechanotransduction and YAP-dependent matrix remodelling is required for the generation and maintenance of cancer-associated fibroblasts.," *Nat. Cell Biol.*, vol. 15, no. 6, pp. 637–46, Jun. 2013, doi: 10.1038/ncb2756.
- [80] M. Pavel *et al.*, "Contact inhibition controls cell survival and proliferation via YAP/TAZ-autophagy axis," *Nat. Commun.*, vol. 9, no. 1, Dec. 2018, doi: 10.1038/s41467-018-05388-x.
- [81] L. Xiang *et al.*, "HIF-1 α and TAZ serve as reciprocal co-activators in human breast cancer cells," *Oncotarget*, vol. 6, no. 14, pp. 11768–78, May 2015, doi: 10.18632/oncotarget.4190.
- [82] B. Zhao and Y. Lv, "Suspension state and shear stress enhance breast tumor cells EMT through YAP by microRNA-29b," *Cell Biol. Toxicol.*, Oct. 2021, doi: 10.1007/s10565-021-09661-6.
- [83] G. Di Benedetto, S. Parisi, T. Russo, and F. Passaro, "YAP and TAZ mediators at the crossroad between metabolic and cellular reprogramming," *Metabolites*, vol. 11, no. 3, Mar. 01, 2021, doi: 10.3390/metabo11030154.
- [84] X. Varelas, "The hippo pathway effectors TAZ and YAP in development, homeostasis and disease," *Dev.*, vol. 141, no. 8, pp. 1614–1626, 2014, doi: 10.1242/DEV.102376.
- [85] S. Jansen, R. Gosens, T. Wieland, and M. Schmidt, "Paving the Rho in cancer metastasis: Rho GTPases and beyond," *Pharmacology and Therapeutics*, vol. 183, Pharmacol Ther, pp. 1–21, Mar. 01, 2018, doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.09.002.
- [86] H. L. Li *et al.*, "A review: hippo signaling pathway promotes tumor invasion and metastasis by regulating target gene expression," *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, vol. 147, no. 6, Springer, pp. 1569–1585, Apr. 17, 2021, doi: 10.1007/s00432-021-03604-8.
- [87] Y. Tang and S. J. Weiss, "Snail/Slug-YAP/TAZ complexes cooperatively regulate mesenchymal stem cell function and bone formation," *Cell Cycle*, vol. 16, no. 5, Cell Cycle, pp. 399–405, Mar. 04, 2017, doi: 10.1080/15384101.2017.1280643.
- [88] Z. Sun *et al.*, "Tenascin-C promotes tumor cell migration and metastasis through integrin α 9 β 1-Mediated YAP inhibition," *Cancer Res.*, vol. 78, no. 4, pp. 950–961, Feb. 2018, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-1597.
- [89] K. Yudoh, H. Matsui, M. Kanamori, K. Ohmori, T. Yasuda, and H. Tsuji, "Characteristics

- of high and low laminin-adherent dunn osteosarcoma cells selected by adhesiveness to laminin," *Tumor Biol.*, vol. 17, no. 6, pp. 332–340, Jan. 1996, doi: 10.1159/000217997.
- [90] A. Gvozdenovic *et al.*, "Targeting $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ and $\alpha\text{v}\beta\text{5}$ integrins inhibits pulmonary metastasis in an intratibial xenograft osteosarcoma mouse model," *Oncotarget*, vol. 7, no. 34, pp. 55141–55154, 2016, doi: 10.18632/oncotarget.10461.
- [91] C. Zanduetta *et al.*, "Matrix-Gla protein promotes osteosarcoma lung metastasis and associates with poor prognosis," *J. Pathol.*, vol. 239, no. 4, pp. 438–449, Aug. 2016, doi: 10.1002/PATH.4740.
- [92] T. Kitamura, B. Z. Qian, and J. W. Pollard, "Immune cell promotion of metastasis," *Nature Reviews Immunology*, vol. 15, no. 2. Nat Rev Immunol, pp. 73–86, Jan. 23, 2015, doi: 10.1038/nri3789.
- [93] Y. Han *et al.*, "Tumor-associated macrophages promote lung metastasis and induce epithelial-mesenchymal transition in osteosarcoma by activating the COX-2/STAT3 axis," *Cancer Lett.*, vol. 440–441, pp. 116–125, Jan. 2019, doi: 10.1016/j.canlet.2018.10.011.
- [94] C. Maloney *et al.*, "Gefitinib inhibits invasion and metastasis of osteosarcoma via inhibition of macrophage receptor interacting serine-threonine kinase 2," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 19, no. 6, pp. 1340–1350, Jun. 2020, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-19-0903.
- [95] A. Nardin, M. Lefebvre, K. Labroquere, O. Faure, and J. Abastado, "Liposomal Muramyl Tripeptide Phosphatidylethanolamine: Targeting and Activating Macrophages for Adjuvant Treatment of Osteosarcoma," *Curr. Cancer Drug Targets*, vol. 6, no. 2, pp. 123–133, Feb. 2006, doi: 10.2174/156800906776056473.
- [96] P. A. Meyers, "Muramyl Tripeptide-Phosphatidyl Ethanolamine Encapsulated in Liposomes (L-MTP-PE) in the Treatment of Osteosarcoma," in *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 1257, Adv Exp Med Biol, 2020, pp. 133–139.
- [97] A. Gomez-Brouchet *et al.*, "CD163-positive tumor-associated macrophages and CD8-positive cytotoxic lymphocytes are powerful diagnostic markers for the therapeutic stratification of osteosarcoma patients: An immunohistochemical analysis of the biopsies from the French OS2006 phase 3 trial," *Oncoimmunology*, vol. 6, no. 9, Sep. 2017, doi: 10.1080/2162402X.2017.1331193.
- [98] E. P. Buddingh *et al.*, "Tumor-infiltrating macrophages are associated with metastasis suppression in high-grade osteosarcoma: A rationale for treatment with macrophage activating agents," *Clin. Cancer Res.*, vol. 17, no. 8, pp. 2110–2119, Apr. 2011, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2047.
- [99] C. Dumars *et al.*, "Dysregulation of macrophage polarization is associated with the metastatic process in osteosarcoma," *Oncotarget*, vol. 7, no. 48, pp. 78343–78354, 2016, doi: 10.18632/oncotarget.13055.
- [100] Y. Zhou *et al.*, "Single-cell RNA landscape of intratumoral heterogeneity and immunosuppressive microenvironment in advanced osteosarcoma," *Nat. Commun.*, vol. 11, no. 1, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41467-020-20059-6.

- [101] J. Niu *et al.*, “Identification of Potential Therapeutic Targets and Immune Cell Infiltration Characteristics in Osteosarcoma Using Bioinformatics Strategy,” *Front. Oncol.*, vol. 10, Aug. 2020, doi: 10.3389/fonc.2020.01628.
- [102] C. W. Wong *et al.*, “Apoptosis: An early event in metastatic inefficiency,” *Cancer Res.*, vol. 61, no. 1, pp. 333–338, Jan. 2001, Accessed: Oct. 13, 2021. [Online]. Available: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/11196183/>.
- [103] S. E. Bonner and E. Willms, “Intercellular communication through extracellular vesicles in cancer and evolutionary biology,” *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, Aug. 2021, doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2021.08.006.
- [104] R. Macklin *et al.*, “Extracellular vesicles secreted by highly metastatic clonal variants of osteosarcoma preferentially localize to the lungs and induce metastatic behaviour in poorly metastatic clones,” *Oncotarget*, vol. 7, no. 28, pp. 43570–43587, 2016, doi: 10.18632/ONCOTARGET.9781.
- [105] L. Zhong *et al.*, “Rab22a-NeoF1 fusion protein promotes osteosarcoma lung metastasis through its secretion into exosomes,” *Signal Transduct. Target. Ther.*, vol. 6, no. 1, Dec. 2021, doi: 10.1038/s41392-020-00414-1.
- [106] A. Mazumdar *et al.*, “Osteosarcoma-derived extracellular vesicles induce lung fibroblast reprogramming,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 15, pp. 1–20, Aug. 2020, doi: 10.3390/ijms21155451.
- [107] A. Mazumdar *et al.*, “Exploring the role of osteosarcoma-derived extracellular vesicles in pre-metastatic niche formation and metastasis in the 143-b xenograft mouse osteosarcoma model,” *Cancers (Basel)*, vol. 12, no. 11, pp. 1–19, Nov. 2020, doi: 10.3390/cancers12113457.
- [108] “NINETEENTH CENTURY FOUNDATIONS OF CANCER RESEARCH. ORIGINS OF EXPERIMENTAL RESEARCH - PubMed.” <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/14106160/> (accessed Sep. 23, 2021).
- [109] “The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889 - PubMed.” <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/2673568/> (accessed Sep. 23, 2021).
- [110] N. Krishnamoorthy, S. S. Desai, B. Rekhi, and N. A. Jambhekar, “A clinico-morphological study of 95 cases of sarcomas with metastases to the lungs,” *Indian J. Cancer*, vol. 48, no. 3, pp. 335–338, Jul. 2011, doi: 10.4103/0019-509X.84942.
- [111] D. Wang *et al.*, “Multiregion sequencing reveals the genetic heterogeneity and evolutionary history of osteosarcoma and matched pulmonary metastases,” *Cancer Res.*, vol. 79, no. 1, pp. 7–20, Jan. 2019, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-1086.
- [112] H. Xu *et al.*, “Genetic and clonal dissection of osteosarcoma progression and lung metastasis,” *Int. J. Cancer*, vol. 143, no. 5, pp. 1134–1142, Sep. 2018, doi: 10.1002/IJC.31389.
- [113] N. H. Stoecklein and C. A. Klein, “Genetic disparity between primary tumours, disseminated tumour cells, and manifest metastasis,” *International Journal of Cancer*, vol. 126, no. 3, Int J Cancer, pp. 589–598, Feb. 01, 2010, doi: 10.1002/ijc.24916.

- [114] C. A. Klein, "Parallel progression of primary tumours and metastases," *Nature Reviews Cancer*, vol. 9, no. 4. pp. 302–312, Apr. 2009, doi: 10.1038/nrc2627.
- [115] S. Gambera *et al.*, "Clonal dynamics in osteosarcoma defined by RGB marking," *Nat. Commun.*, vol. 9, no. 1, Dec. 2018, doi: 10.1038/s41467-018-06401-z.
- [116] Y. Liu *et al.*, "Single-Cell Transcriptomics Reveals the Complexity of the Tumor Microenvironment of Treatment-Naive Osteosarcoma," *Front. Oncol.*, vol. 11, Jul. 2021, doi: 10.3389/fonc.2021.709210.
- [117] C. P. Couturier *et al.*, "Single-cell RNA-seq reveals that glioblastoma recapitulates a normal neurodevelopmental hierarchy," *Nat. Commun.*, vol. 11, no. 1, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41467-020-17186-5.
- [118] X. W. Pan *et al.*, "Identification of a novel cancer stem cell subpopulation that promotes progression of human fatal renal cell carcinoma by single-cell RNA-seq analysis," *Int. J. Biol. Sci.*, vol. 16, no. 16, pp. 3149–3162, 2020, doi: 10.7150/ijbs.46645.
- [119] J. Tian, X. Li, M. Si, T. Liu, and J. Li, "CD271+ Osteosarcoma Cells Display Stem-Like Properties," *PLoS One*, vol. 9, no. 6, p. e98549, Jun. 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0098549.
- [120] C. P. Gibbs *et al.*, "Stem-like cells in bone sarcomas: implications for tumorigenesis.," *Neoplasia*, vol. 7, no. 11, pp. 967–76, Nov. 2005, Accessed: Mar. 04, 2015. [Online]. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1502023&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [121] C. Andrique *et al.*, "Calpain-6 controls the fate of sarcoma stem cells by promoting autophagy and preventing senescence.," *JCI insight*, vol. 3, no. 17, Sep. 2018, doi: 10.1172/jci.insight.121225.
- [122] H. He, J. Ni, and J. Huang, "Molecular mechanisms of chemoresistance in osteosarcoma (review)," *Oncology Letters*, vol. 7, no. 5. Oncol Lett, pp. 1352–1362, 2014, doi: 10.3892/ol.2014.1935.
- [123] N. Chandimali *et al.*, "Brm270 targets cancer stem cells and augments chemosensitivity in cancer (Review)," *Oncology Letters*, vol. 20, no. 4. Oncol Lett, Oct. 01, 2020, doi: 10.3892/ol.2020.11964.
- [124] A. Marion, F.-X. Dieudonné, A. Patiño-Garcia, F. Lecanda, P. J. Marie, and D. Modrowski, "Calpain-6 is an endothelin-1 signaling dependent protective factor in chemoresistant osteosarcoma," *Int. J. Cancer*, vol. 130, no. 11, pp. 2514–2525, Jun. 2012, doi: 10.1002/ijc.26246.
- [125] Y. Li, M. Xian, B. Yang, M. Ying, and Q. He, "Inhibition of KLF4 by Statins Reverses Adriamycin-Induced Metastasis and Cancer Stemness in Osteosarcoma Cells," *Stem Cell Reports*, vol. 8, no. 6, pp. 1617–1629, Jun. 2017, doi: 10.1016/j.stemcr.2017.04.025.
- [126] D. A. Lawson *et al.*, "Single-cell analysis reveals a stem-cell program in human metastatic breast cancer cells," *Nat.* 2015 5267571, vol. 526, no. 7571, pp. 131–135,

Sep. 2015, doi: 10.1038/NATURE15260.

- [127] D. C. Radisky and M. A. LaBarge, "Epithelial-Mesenchymal Transition and the Stem Cell Phenotype," *Cell Stem Cell*, vol. 2, no. 6, pp. 511–512, Jun. 2008, doi: 10.1016/J.STEM.2008.05.007.
- [128] S. A. Mani *et al.*, "The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells," *Cell*, vol. 133, no. 4, pp. 704–715, May 2008, doi: 10.1016/j.cell.2008.03.027.
- [129] P. I *et al.*, "Fat1 deletion promotes hybrid EMT state, tumour stemness and metastasis," *Nature*, vol. 589, no. 7842, pp. 448–455, Jan. 2021, doi: 10.1038/S41586-020-03046-1.
- [130] C. Z *et al.*, "IL-1 β inflammatory response driven by primary breast cancer prevents metastasis-initiating cell colonization," *Nat. Cell Biol.*, vol. 20, no. 9, pp. 1084–1097, Sep. 2018, doi: 10.1038/S41556-018-0173-5.
- [131] Y. J, L. J, H. L, H. J, and L. Q, "TNF- α /miR-155 axis induces the transformation of osteosarcoma cancer stem cells independent of TP53INP1," *Gene*, vol. 726, Feb. 2020, doi: 10.1016/J.GENE.2019.144224.
- [132] X. M *et al.*, "miR-382 inhibits osteosarcoma metastasis and relapse by targeting Y box-binding protein 1," *Mol. Ther.*, vol. 23, no. 1, pp. 89–98, Jan. 2015, doi: 10.1038/MT.2014.197.
- [133] M. Rodriguez-Torres and A. L. Allan, "Aldehyde dehydrogenase as a marker and functional mediator of metastasis in solid tumors," *Clinical and Experimental Metastasis*, vol. 33, no. 1. Clin Exp Metastasis, pp. 97–113, Jan. 01, 2016, doi: 10.1007/s10585-015-9755-9.
- [134] D. G. Fuja, N. C. Rainusso, R. L. Shuck, L. Kurenbekova, L. A. Donehower, and J. T. Yustein, "Transglutaminase-2 promotes metastatic and stem-like phenotypes in osteosarcoma.," *Am. J. Cancer Res.*, vol. 8, no. 9, pp. 1752–1763, 2018, Accessed: Oct. 13, 2021. [Online]. Available: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/30323968/>.
- [135] W. Zhang *et al.*, "Adaptive Fibrogenic Reprogramming of Osteosarcoma Stem Cells Promotes Metastatic Growth," *Cell Rep.*, vol. 24, no. 5, pp. 1266-1277.e5, Jul. 2018, doi: 10.1016/j.celrep.2018.06.103.
- [136] D. J. Silver, M. Sinyuk, M. A. Vogelbaum, M. S. Ahluwalia, and J. D. Lathia, "The intersection of cancer, cancer stem cells, and the immune system: Therapeutic opportunities," *Neuro. Oncol.*, vol. 18, no. 2, pp. 153–159, Feb. 2016, doi: 10.1093/neuonc/nov157.
- [137] D. Pardoll, "Cancer and Immune System: Basic Concepts and Targets for Intervention," *Seminars in Oncology*, vol. 42, no. 4. W.B. Saunders, pp. 523–538, Aug. 01, 2015, doi: 10.1053/j.seminoncol.2015.05.003.
- [138] F. Concha-Benavente, R. Srivastava, S. Ferrone, and R. L. Ferris, "Immunological and clinical significance of HLA class I antigen processing machinery component defects in malignant cells," *Oral Oncol.*, vol. 58, pp. 52–58, Jul. 2016, doi:

10.1016/j.oraloncology.2016.05.008.

- [139] Y. Wu, M. Chen, P. Wu, C. Chen, Z. P. Xu, and W. Gu, "Increased PD-L1 expression in breast and colon cancer stem cells," *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, vol. 44, no. 5, pp. 602–604, May 2017, doi: 10.1111/1440-1681.12732.
- [140] J. Wei *et al.*, "Glioblastoma Cancer-Initiating Cells Inhibit T-Cell Proliferation and Effector Responses by the Signal Transducers and Activators of Transcription 3 Pathway," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 9, no. 1, pp. 67–78, Jan. 2010, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-09-0734.
- [141] E. Jachetti *et al.*, "Tenascin-C protects cancer stem-like cells from immune surveillance by arresting T-cell activation," *Cancer Res.*, vol. 75, no. 10, pp. 2095–2108, May 2015, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2346.