

**U-S-PC**

Université Sorbonne  
Paris Cité

Thèse de doctorat

de l'Université Sorbonne Paris Cité

Préparée à l'Université Paris Diderot

université  
**PARIS**  
**DIDEROT**  
PARIS 7

École doctorale n°561 Hématologie Oncogénèse et Biothérapies

UMR1132 BIOSCAR- Equipe Os, cartilage et environnement

**La calpaïne-6 identifie et maintient la population de  
cellules souche des sarcomes osseux en contrôlant les  
processus d'autophagie et de sénescence**

Par **Caroline ANDRIQUE**

Thèse de doctorat Oncogénèse

Dirigée par le Dr Dominique MODROWSKI

Présentée et soutenue publiquement à Paris, le 8 décembre 2017

**Président du jury** : ANRACT Philippe/Professeur/Université Paris Descartes

**Rapporteurs** : TIRODE Franck/Docteur /Université Lyon I

BOUVARD Daniel /Docteur/Université Grenoble Alpes

**Examineurs** : ROMAGNOLO Béatrice/Docteur/Université Paris Descartes

BOUMEDIENE Karim/Professeur/Université de Caen

**Directeur de thèse** : MODROWSKI Dominique/Docteur/Université Paris Diderot



Cette œuvre est mise à disposition selon les termes de la [Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

**Titre :** La calpaïne-6 identifie et maintient la population de cellules souche des sarcomes osseux en contrôlant les processus d'autophagie et de sénescence.

**Résumé :** Les cellules souche cancéreuses contribuent au développement des sarcomes, mais le manque de marqueurs spécifiques empêche leur caractérisation et la possibilité de cibler ce type de cellules. Nous avons utilisé la séquence régulatrice de la calpaïne-6 dans des systèmes rapporteurs pour identifier les cellules exprimant la calpaïne-6. Ces cellules étaient des cellules initiatrices de tumeurs et se comportaient comme des cellules souche, au sommet de la hiérarchie cellulaire. L'expression de la calpaïne-6 dépend d'un programme génique de cellules souche qui implique Oct4, Nanog et Sox2 et est activée par l'hypoxie. L'inhibition de la calpaïne-6 a bloqué le développement tumoral et a induit la diminution du nombre de cellules souche cancéreuses dans les sarcomes osseux. L'expression de la calpaïne-6 était inversement corrélée à l'expression de marqueurs de sénescence mais était associé à un flux autophagique dynamique. L'inhibition de la calpaïne-6 a induit l'entrée des cellules en sénescence et a supprimé le flux autophagique. Nos résultats révèlent que la calpaïne-6 identifie les cellules souche des sarcomes et joue un rôle important dans le maintien des cellules souche cancéreuses en contrôlant les processus d'autophagie et de sénescence. La calpaïne-6 semble être une cible thérapeutique prometteuse pour éradiquer les cellules souche dans les sarcomes.

**Mots Clefs :** Calpaïne-6, Sarcomes osseux, Cellules souche cancéreuses, autophagie, sénescence

---

**Title:** Calpain-6 controls the fate of sarcoma stem cells by promoting autophagy and preventing senescence.

**Abstract:** Cancer stem cells contribute to sarcoma development, but lack of specific markers prevents their characterization and the possibility of targeting. We used the regulatory sequence of calpain-6 in reporter constructions to identify calpain-6-expressing cells. These cells were tumor-initiating cells and behaved like stem cells at the apex of the cellular hierarchy. Calpain-6 expression depended on the stem-cell transcription network that involves Oct4, Nanog, and Sox2 and was activated by hypoxia. Calpain-6 knockdown blocked tumor development and induced depletion of sarcoma stem cells. Calpain-6 was inversely associated with expression of senescence markers but was associated with a dynamic autophagy flux. Calpain-6 knockdown induced cell entry into senescence and suppressed autophagy flux. Our results reveal that calpain-6 identifies sarcoma stem-cell and plays an important role as a regulator of cancer cell fate driving a switch between autophagy and senescence. Calpain-6 may be a promising therapeutic target to eradicate sarcoma stem cells.

**Keywords:** Calpain-6, Bone sarcoma, Cancer stem cells, autophagy, senescence

*« Choisissez un travail que vous aimez et vous n'aurez pas à travailler un seul  
jour de votre vie »*

Confucius

## Remerciements

Tout d'abord, je souhaite remercier le Professeur Martine Cohen-Solal de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire durant ces 4 dernières années. Vous m'avez permis de découvrir le monde de la recherche.

Je tiens particulièrement à remercier le Docteur Dominique Modrowski, pour avoir dirigé ma thèse. Merci de m'avoir permis de participer à des congrès scientifiques, et merci de m'avoir formée techniquement. Merci pour tout, ton soutien, tes conseils et tes idées. Merci de m'avoir appris à prendre confiance en moi. J'espère que tu garderas un bon souvenir de moi et qu'on continuera à échanger.

Je remercie le Professeur Philippe ANRACT pour avoir accepté d'être le président du jury de ma thèse.

Je remercie les docteurs Franck Tirode et Daniel Bouvard pour avoir accepté d'être mes rapporteurs et d'avoir pris le temps d'étudier ma thèse.

Je tiens à remercier le Professeur Karim Boumediene et le Docteur Béatrice Romagnolo pour avoir bien voulu être les examinateurs de ma thèse.

Je remercie tous les membres du laboratoire pour leur aide au cours de ma thèse. Merci Caro, d'avoir su me conseiller en histo, et d'avoir été une oreille attentive. Merci Nath, pour la gestion « presque parfaite » de nos commandes et pour les pauses antillaises. Merci Jacqueline, d'avoir toujours sous la main ce dont on a besoin. Merci Agnès pour ta bonne humeur et tes conseils en statistiques. Merci Eric, d'être toujours disponible et pour les conseils. Merci Sylvain pour tes conseils et ton aide technique.

Merci à tous les étudiants présents au cours de ces 4 dernières années et pour les bons moments passés ensemble.

Yohan, Magali, Morgane, merci de m'avoir supporté, vous êtes devenus plus que des collègues. Merci d'avoir toujours été là pour m'entendre râler et de m'avoir aidé, soutenu et de m'avoir parfois changé les idées. Et vive la Bodega (...) Vous allez me manquer, mais on ne se perd pas de vue.

Mylène, tu vas me manquer. Mon binôme, de pause, de sorties détentes, de tout en fait. Nos fous rires, nos doutes, nos moments de déprime... Je serais toujours là pour toi. On ne sera plus tous les jours ensemble, mais l'amitié, c'est mieux que d'être de simples collègues de travail. <3

Merci à mes parents et ma sœur de m'avoir soutenu dans ces études qui n'en finissaient plus. Je vous aime.

Guillaume, on en a fait des choses ensemble, tu m'a toujours soutenu dans mes projets, la réserve, la thèse... On a déménagé deux fois en trois ans, on construit notre vie et une nouvelle page s'écrit... Merci pour tout, merci d'être toi. Je t'aime.

## Table des matières

Remerciements .....	4
Table des illustrations .....	10
I. Introduction .....	14
I.1. Les sarcomes osseux.....	14
I.1.1. Définition.....	14
I.1.2. Les Ostéosarcomes .....	16
I.1.3. Les chondrosarcomes .....	18
I.1.4. Le sarcome d'Ewing .....	19
I.1.5 Les traitements .....	20
I.1.5.1 Chimiothérapies conventionnelles.....	20
I.1.5.2. Radiothérapie .....	21
I.1.5.3. Nouvelles thérapies.....	21
I.1.6. Origine cellulaire .....	22
I.1.6.1. Origine des ostéosarcomes .....	22
I.1.6.2. Origine des chondrosarcomes.....	24
I.1.6.3. Origine des sarcomes d'Ewing .....	24
I.1.7. Etiologie .....	26
I.1.8. Altérations géniques .....	26
I.1.9. Rôle de l'environnement tumoral.....	28
I.2. Cellules souche cancéreuses .....	31
I.2.1. Concept de cellule souche cancéreuse .....	31
I.2.2. Caractéristiques des cellules souche cancéreuses .....	33
I.2.2.1. Marqueurs Membranaires .....	35
I.2.2.2. Marqueurs métaboliques.....	36

I.2.2.2.1. ALDH1 .....	37
I.2.2.2.2. Cycle de Krebs .....	37
I.2.2.2.3. Détoxification .....	39
I.2.2.2.4. Hypoxie.....	40
I.2.2.3. Signalisation et CSC .....	40
I.2.2.3.1. Signalisation Notch.....	41
I.2.2.3.2. Signalisation HedgeHog.....	42
I.2.2.4. Régulation épigénétique .....	43
I.2.3. Cellules souche et sarcomes osseux .....	47
I.2.3.1. Chondrosarcomes .....	47
I.2.3.2. Sarcomes d’Ewing .....	47
I.2.3.3. Ostéosarcomes.....	48
I.3. Généralités sur les calpaïnes .....	51
I.3.1. Structure .....	51
I.4. La calpaïne-6.....	52
I.4.1. Structure .....	52
I.4.2. Expression .....	53
I.4.3. Régulation de l’expression.....	57
I.4.4. Fonctions.....	59
I.4.4.1. Calpaïne-6 et cytosquelette .....	59
I.4.4.2 Calpaïne-6 et différenciation cellulaire.....	60
I.4.4.3 Calpaïne-6 et tumeurs.....	61
Objectifs du travail .....	66
Chapitre I: La calpaïne-6 contrôle le destin des cellules souche cancéreuses dans les sarcomes osseux en favorisant l’autophagie et en empêchant la sénescence .....	69

I.	Introduction.....	69
II.	Résultats.....	71
III.	Discussion et résultats complémentaires .....	72
III.1.	Calpaïne-6 et capacités tumorales des cellules de sarcome .....	72
III.2.	Fonctions de la calpaïne-6 dans les CSC .....	80
III.2.1.	La calpaïne-6 protège les cellules de la sénescence .....	82
III.2.2.	L'expression de la calpaïne-6 est associée au flux autophagique.....	83
Chapitre 2 : Régulation transcriptionnelle de la calpaïne-6.....		87
I.	Introduction.....	87
II.	Résultats et discussion .....	87
II.1.	Système rapporteur Calp6-P.....	87
II.2.	La calpaïne-6 est une cible directe des facteurs HIF-1 $\pm$ dans les cellules hypoxiques .....	90
II.3.	La calpaïne-6 est une cible directe de NF- $\kappa$ B.....	92
II.3.	L'expression de la calpaïne-6 est contrôlée par les facteurs Oct4, Nanog et Sox2... 95	
I.	Discussion.....	101
II.	Perspectives .....	104
II.1.	Autophagie et développement métastatique .....	104
II.2.	Inhibition des activités de la calpaïne-6 à des fins thérapeutiques .....	106
Liste des Abréviations .....		107
Bibliographie .....		109
ANNEXE 1.....		126
	Liste des présentations des travaux de recherche.....	126
ANNEXE 2.....		127
	Soumission de l'article au journal Cell Stem Cell .....	127

Réponse des éditeurs.....	127
Rebuttal letter.....	128

## Table des illustrations

Figure 1 : Infographie, les sarcomes.....	14
Tableau 1 : les différents types de tumeurs osseuses .....	15
Figure 2 : Coloration Hématoxyline/éosine des trois types d'ostéosarcomes	16
Figure 3 : Incidence des ostéosarcomes selon l'âge et le sexe des patients .....	17
Figure 4 : Taux de survie sur 5 ans de patients atteints d'un ostéosarcome.....	18
Figure 5 : Coloration Hématoxyline/éosine des trois différents grades de chondrosarcome.	19
Figure 6 : Coloration Hématoxyline/éosine de sarcome d'Ewing.....	20
Figure 7 : Modèle de développement de l'ostéosarcome .....	23
Figure 8 : Développement d'un chondrosarcome central .....	24
Figure 9 : Translocation EWS-FLI1 dans le sarcome d'Ewing .....	27
Figure 10 : Contribution du microenvironnement tumorale dans la croissance tumorale et l'invasion.....	29
Figure 11 : Représentation du cercle vicieux qui s'établi entre les cellules tumorales et le tissu osseux .....	30
Figure 12 : Modèles théoriques des cellules souches cancéreuses.....	32
Figure 13 : Modèle de développement hiérarchique d'une tumeur .....	33
Figure 14 : Les principaux marqueurs de surfaces décrivent dans cancers fréquents .....	36
Figure 15 : Détournement du cycle de Krebs par les cellules souche cancéreuses.....	38
Figure 16 : Mise en évidence de la « side population » par l'inhibition des transporteurs de type « ABC » .....	39
Figure 17 : Inhibition de la signalisation Notch impliquée dans le maintien des cellules souche cancéreuses.....	42
Figure 18: Schéma récapitulatif de la régulation épigénétique dans les cellules souche embryonnaires et des cellules différenciées.....	45
Figure 19 : Formation de sphères à partir de cellules issues d'un ostéosarcome primaire ....	49

Figure 20 : Immunohistochimie Nanog et Oct3/4 sur des cellules adhérentes ou des sphères obtenues à partir de biopsies de 5 ostéosarcomes .....	50
Figure 21: Structure des calpaïnes ubiquitaires.....	52
Figure 22 : Comparaison de la structure de la calpaïne-6 avec une calpaïne classique, la calpaïne-1 .....	53
Figure 23: Expression de la calpaïne-6 dans 50 tissus humains.....	54
Figure 24: Expression de la calpaïne-6 chez la souris .....	55
Figure 25: Expression de la calpaïne-6 chez l'homme dans les bases de données.....	56
Figure 26: Expression de la calpaïne-6 dans des tissus humains après la naissance.....	57
Figure 27: L'expression de la calpaïne-6 dans la mandibule est dépendante de l'ET-1 chez la souris .....	58
Figure 28: L'expression de la calpaïne-6 dépend de la voie PI3K/AKT.....	59
Figure 29 : Effet de la surexpression de calpaïne-6 dans les cellules au cours de la division cellulaire .....	60
Figure 30 : La calpaïne-6 : inhibiteur de la différenciation musculaire au cours du développement et de la réparation tissulaire.....	61
Figure 31: Immunohistochimie anti-calpaïne-6 dans les cancers utérins.....	62
Figure 32 : L'expression de la calpaïne-6 est lié à la chimiorésistance des ostéosarcomes ....	63
Figure 33: La calpaïne-6 joue un rôle protecteur dans les cellules d'ostéosarcomes .....	64
Figure 34: Les cellules Calp6-P-GFP+ ont des capacités migratoires accrues.....	73
Figure 35: Activité ALDH1 dans les cellules 143B.....	75
Figure 36: Expression de ABCB1 et ABCG2 dans les cellules 143B Calp6-P-GFP+ .....	76
Figure 37: Side population et expression de la calpaïne-6 .....	76
Figure 38: Les cellules Calp6-P-GFP+ sont au sommet de la hiérarchie cellulaire.....	78
Figure 39: Représentation schématique des deux modes de division d'une cellule souche ..	79
Figure 40: Les cellules Calp6-P-GFP+ se divisent asymétriquement.....	80

Figure 41: Système Double nickase CRISPR/Cas9 .....	81
Figure 42: Implication de la sénescence pendant la réparation tissulaire .....	82
Figure 43: Représentation schématique du processus de macro-autophagie .....	84
Figure 44: Activité transactivatrice de la séquence régulatrice de la calpaïne-6 .....	89
Figure 45: Séquence régulatrice de la calpaïne-6 (Calp6-P) .....	90
Figure 46: Liaison des facteurs HIF-1 $\alpha$ à la séquence régulatrice de la calpaïne-6 .....	91
Figure 47: Effets de l'inhibition de HIF-1 $\alpha$ sur l'induction de l'expression de la calpaïne-6 par l'hypoxie .....	92
Figure 48: Liaison des facteurs NF- $\kappa$ B à la séquence régulatrice de la calpaïne-6.....	92
Figure 49: Liaison des facteurs NF- $\kappa$ B à la séquence régulatrice de la calpaïne-6.....	93
Figure 50: L'hypoxie augmente la réponse à l'ET-1 dans les cellules 143B .....	94
Figure 51: Régulation de la calpaïne-6 par des éléments du microenvironnement des cellules tumorales .....	95
Figure 52: Régulation et autorégulation des facteurs de transcription Nanog, Oct4 et Sox2.	96
Figure 53: Mode d'action des facteurs de cellule souche sur le promoteur du gène inhibiteur de différenciation, (Id3) dans des cellules souche embryonnaires .....	97
Figure 54: Analyse par 3C de la séquence régulatrice de la calpaïne-6.....	98
Figure 55: Les facteurs Oct4, Sox2 et Nanog modulent la liaison de NF $\kappa$ B à la région promotrice de la calpaïne-6 .....	99
Figure 56: La surexpression d'Oct4, Sox2 et Nanog régule la signalisation NF- $\kappa$ B .....	99
Figure 57: Schéma de l'organisation tumoral possible dans les sarcomes osseux.....	104

# Introduction

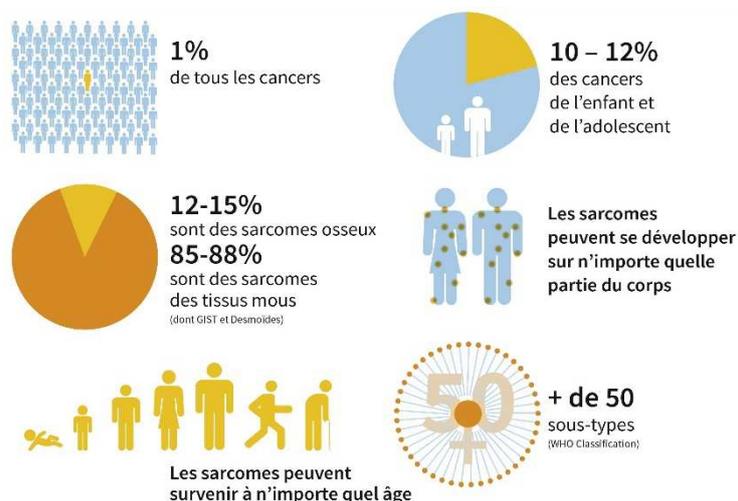
---

## I. Introduction

### I.1. Les sarcomes osseux

#### I.1.1. Définition

Les sarcomes sont des tumeurs rares qui sont d'origine mésenchymateuse et qui affectent les tissus conjonctifs. Au niveau mondial, les sarcomes représentent seulement 1% de tous les types de cancer, mais 10 à 12% des cancers chez l'enfant et l'adolescent. (Figure 1) Ces tumeurs se déclinent en plus de 50 histotypes différents et 150 sous-types moléculaires et le diagnostic ne peut s'établir qu'après une consultation pluridisciplinaire de l'ensemble des données cliniques, radiologiques et anatomo-pathologiques parfois accompagnées de données de biologie moléculaires. ([www.infosarcomes.org](http://www.infosarcomes.org))



**Figure 1 : Infographie, les sarcomes**

Les sarcomes représentent 1% des cancers totaux au niveau mondial. Ce sont 10 à 12% des cancers diagnostiqués chez l'enfant et l'adolescent. Les deux grands types de sarcomes se répartissent en sarcomes osseux (12-15%) et sarcomes des tissus mous (85-88%). Les sarcomes se développent dans n'importe quelle partie du corps et à n'importe quel âge. Il existe selon l'organisation mondiale de la santé plus de 50 sous-types de sarcomes. *D'après [www.infosarcomes.org](http://www.infosarcomes.org)*

La classification actuelle des sarcomes est une classification de l'organisation mondiale de la santé datant de 2013. Celle-ci prend en compte les considérations histologiques et moléculaires des différents types de sarcomes et distingue deux grands types : les sarcomes des tissus mous et les sarcomes osseux. Nous nous intéresserons plus particulièrement à ce dernier type de sarcome qui est lui-même divisé en 9 sous types distincts (tableau 1), ([www.infosarcomes.org](http://www.infosarcomes.org)) (Taran et al., 2017). Une étude du National

Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER, USA) portant sur 3482 cas de sarcomes osseux diagnostiqués entre 1973 et 2004, donne une vue assez détaillée de l'incidence de ces tumeurs. Elle montre notamment que dans la tranche d'âge la plus jeune (0-24 ans), l'ostéosarcome est la tumeur osseuse la plus fréquente (55%), suivi par le sarcome d'Ewing (36%). Les chondrosarcomes sont les deuxièmes sarcomes osseux les plus fréquents mais ils surviennent plus tard chez des patients entre 30 et 50 ans.

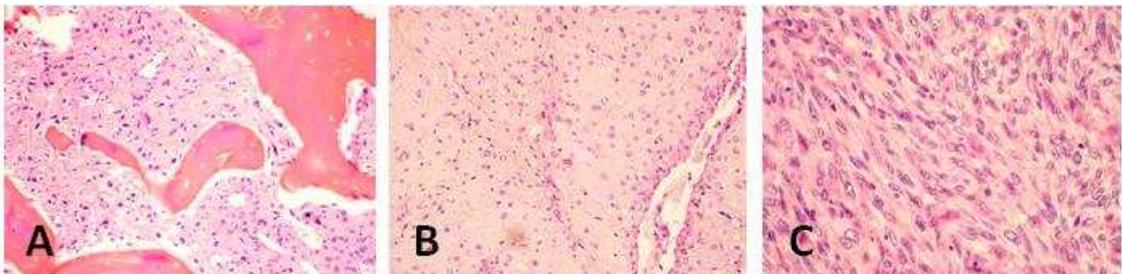
Aspects histologiques des cellules et de la matrice tumorale	Tumeur	Localisation	Fréquence d'apparition
Formation de substance osseuse par les cellules tumorales	Ostéosarcomes	Métaphyse des os longs, pelvis	35%
Formation de cartilage et sans formation primitive de substance osseuse	Chondrosarcomes	Pelvis, extrémités proximales des os longs	26%
Petites cellules rondes	Sarcome d'Ewing	Os longs	16%
Chorde embryonnaire	Chordome	Vertèbres	8%
Les cellules tumorales forment des fibres	Histiocytofibrome malin	Genou, fémur distale, tibia proximal, os du tronc et du pelvis	6%
	Fibrosarcome	Métaphyse des os longs	
Cellules monoocléées et cellules géantes de types ostéoclastiques uniformément réparties	Sarcome à cellules géantes	Sacrum, extrémités des os longs	5%
Cellules fusiformes dérivées d'os qui s'organisent comme un muscle lisse	Léiomyosarcome des os	Autour du genou	4%
Cellules d'aspect endothélial	Hémangiome	Vertèbres, os du crâne et de la face, os longs	2%
	Angiosarcome	Tous les os	
Type histologique non défini	Kyste aneurismale osseux	Os longs et vertèbres	1%

**Tableau 1 : les différents types de tumeurs osseuses**

Ce tableau reprend les 9 différents types de tumeurs osseuses selon la classification de l'organisation mondiale de la santé datant de 2002 et mis à jour en 2013. Les différents types de tumeurs sont déterminés selon le type histologique des cellules et de la matrice qui les compose. *D'après Fletcher et al., 2002*

### I.1.2. Les Ostéosarcomes

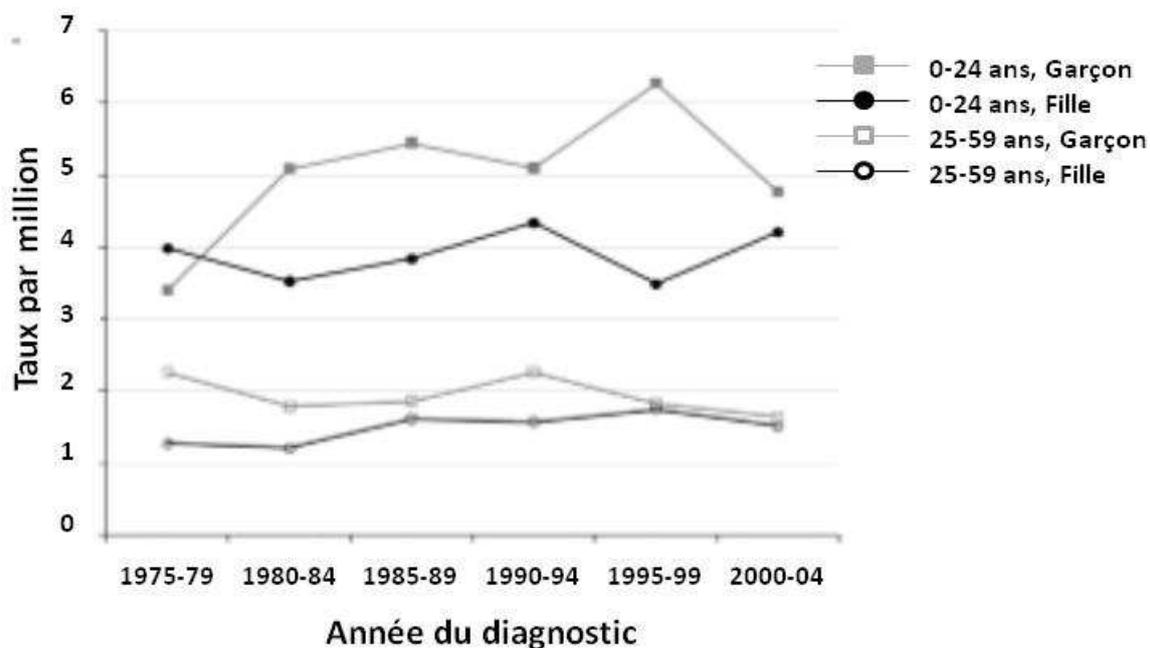
Les ostéosarcomes sont définis comme étant des tumeurs primaires intra médullaires de haut grade, contenant des cellules qui produisent une matrice ostéoïde. (Fletcher et al., 2002) . Les ostéosarcomes se développent préférentiellement dans les os longs, tels que le tibia, le fémur ou l'humérus. Il existe quelques cas de développement dans le crâne, le pelvis et la mâchoire. Les cellules des ostéosarcomes peuvent être fusiformes, ovoïdes, rondes, mono ou multi nucléées, petites ou géantes. Les tumeurs sont souvent très hétérogènes et contiennent deux ou trois formes de cellules. Les ostéosarcomes sont caractérisés par la production d'une matrice extracellulaire qui apparait dense et colorée en rose par la coloration hématoxyline/éosine ce qui indique qu'elle est composée principalement de collagène. Le type d'ostéosarcome est déterminé selon la composition protéique de la matrice on distingue trois types d'ostéosarcome selon les protéines dominantes, les ostéosarcomes ostéoblastiques, les ostéosarcomes chondroblastiques et les ostéosarcomes fibroblastiques. (Fletcher et al., 2002) (Figure 2)



**Figure 2 : Coloration Hématoxyline/éosine des trois types d'ostéosarcomes**

- (A) Ostéosarcome ostéoblastique,
- (B) Ostéosarcome chondroblastiques,
- (C) Ostéosarcome fibroblastique. *D'après photos de l'association française des internes et assistants de pathologies*

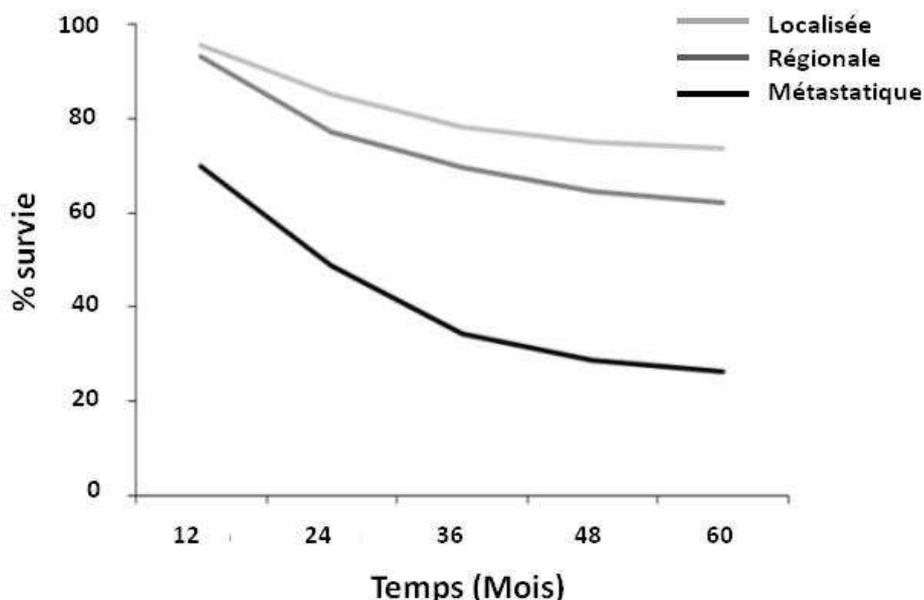
L'incidence des ostéosarcomes est de 4,4 cas pour 1 million de personnes âgées de 0-24 ans au niveau mondial. L'ostéosarcome se développent plus chez les garçons que chez les filles (ratio garçon/fille=1,34). Cependant le développement semble plus précoce chez les filles (12ans) que chez les garçons (16ans). (Figure 3)



**Figure 3 : Incidence des ostéosarcomes selon l'âge et le sexe des patients**

Ces courbes représentent l'incidence de l'ostéosarcome entre 1975 et 2004 au niveau mondial. D'après Mirabello L et coll. 2009

Au diagnostic 15-20% des patients présentent des métastases pulmonaires et 40% en développent à des stades plus tardifs de la maladie. (Taran et al., 2017) Les poumons sont les sites les plus fréquents d'apparition des métastases qui restent la principale cause de mortalité chez les patients. Un an après le diagnostic, le taux de survie des patients avec une maladie localisée est de 90% et ce taux est fortement diminué (70%) lorsque les patients développent des métastases. Après 5 ans le taux de survie est de 60% dans le cas d'une tumeur localisée et de 20% en présence de métastases. (Figure 4)

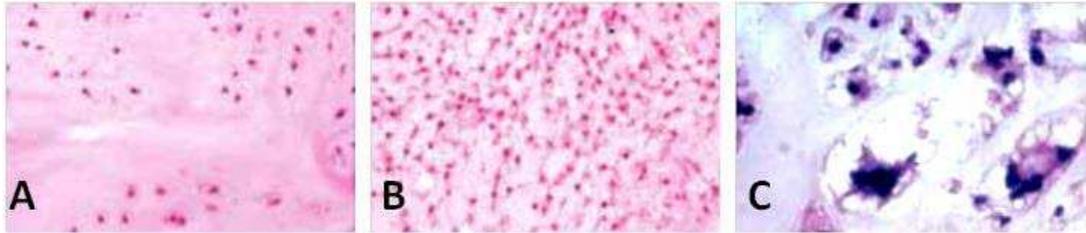


**Figure 4 : Taux de survie sur 5 ans de patients atteints d'un ostéosarcome**

Ces courbes représentent le taux de patients entre 0 et 24 ans survivant au cours des 60 mois suivant le diagnostic selon le type de tumeur (localisée, métastatique). D'après *Mirabello L et coll. 2009*

### 1.1.3. Les chondrosarcomes

Les chondrosarcomes se définissent comme étant des tumeurs du cartilage hyalin dans lesquels la matrice a un aspect myxoïde et dans lesquels peut survenir des ossifications ou des calcifications. Le terme chondrosarcome est utilisé pour désigner des tumeurs malignes hétérogènes au niveau histologique. On peut définir deux sous types de chondrosarcomes, les chondrosarcomes primaires et les chondrosarcomes périostiques. (Fletcher et al., 2002) La majorité de ces tumeurs prolifère lentement et forme rarement de métastases. (Jamil et al., 2010) Elles sont le plus fréquemment retrouvées dans le pelvis, la partie proximale du fémur et de l'humérus ou dans la partie distale du fémur, ainsi que dans les côtes. On distingue trois niveaux de malignité dans les chondrosarcomes, définis par les changements histologiques dus à l'évolution de la tumeur. Le grade I, est caractérisé par une cellularité faible avec des cellules ressemblant à des chondrocytes avec des noyaux hyperchromatiques et de rares fois binucléées. Le grade II, est caractérisé par une cellularité plus abondante, des noyaux toujours hyperchromatiques et plus gros. Le grade III est lui caractérisé de la même façon que le grade II, mais des mitoses sont facilement détectables. Des tumeurs des trois grades peuvent générer des nodules cartilagineux dans la moelle osseuse, et les tumeurs peuvent s'infiltrer dans l'os et englober des travées osseuses saines. (Figure 5)



**Figure 5 : Coloration Hématoxyline/éosine des trois différents grades de chondrosarcome**

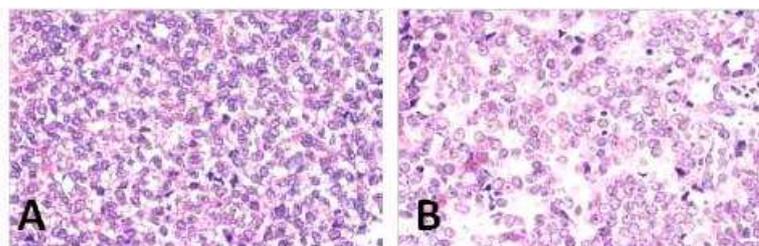
- (A) Chondrosarcome de grade I, peu de cellules, matrice ayant un aspect de cartilagineux,  
 (B) Chondrosarcome de grade II, cellularité abondante, matrice avec un aspect cartilagineux,  
 (C) Chondrosarcome de grade III, cellularité abondante, noyaux hyperchromatiques. *D'après Fletcher et coll., 2002*

Les chondrosarcomes représentent la deuxième tumeur osseuse la plus fréquente (20-27% de toutes les tumeurs osseuses primaires et malignes). Les patients ont le plus souvent entre 30 et 60 ans. (Gelderblom et al., 2016)

Aux Etats Unis, le taux de survie à 5 ans des patients atteints de chondrosarcomes de stade II ou III est de 53%, et il existe un fort taux de récives. Ces récives sont la plupart du temps d'un stade plus élevé que la tumeur primaire. (Fletcher et al., 2002)

#### **I.1.4. Le sarcome d'Ewing**

Le sarcome d'Ewing est défini comme étant une tumeur à petites cellules rondes montrant différents degrés de différenciation. Ces cellules sont prises dans un stroma épars. Sur le plan histologique, les cellules sont de petite taille, avec de petits noyaux. Le cytoplasme des cellules peut contenir des agrégats de glycogène. (Fletcher et al., 2002) (Figure 6) Tout comme l'ostéosarcome, cette tumeur est plus fréquente chez les garçons et il se développe essentiellement dans la diaphyse des os longs mais aussi au niveau du pelvis. Environ 15% des sarcomes apparentés à des sarcomes d'Ewing se développent dans des sites extra osseux. (Balamuth et al., 2010; Riggi & Stamenkovic, 2007)



**Figure 6 : Coloration Hématoxyline/éosine de sarcome d'Ewing**

Ces deux colorations hématoxyline/éosine mettent en évidence la forme ronde et petite des cellules composant les sarcomes d'Ewing et le stroma peut présent. *D'après Fletcher et coll., 2002*

Entre 1973 et 2004 l'incidence était de 2,93 cas pour un million de personnes aux Etats Unis. Cette incidence est estimée à 3,260 cas pour un million en 2017 d'après l'American National Cancer Institute.

Toujours d'après l'American National Cancer Institute, la chance de survie à 5 ans des patients présentant une tumeur localisée est de 67,7% en 2017. Mais tout comme l'ostéosarcome, ce taux chute aux alentours de 20-25% lorsque les patients présentent des métastases. (Taran et al., 2017) Le sarcome d'Ewing, tout comme l'ostéosarcome, métastase le plus souvent dans les poumons.

## **I.1.5 Les traitements**

### ***I.1.5.1 Chimiothérapies conventionnelles***

Les sarcomes osseux sont traités par une chimiothérapie néo adjuvante qui a pour but de réduire la taille de la tumeur avant la résection chirurgicale. Les patients reçoivent ensuite une seconde chimiothérapie selon la réponse au premier traitement. Actuellement, les principaux agents de chimiothérapie sont la doxorubicine et l'ifosmamide, le méthothrexate et la cisplatine, en mono thérapie ou en thérapie combinée.

La doxorubicine permet une inhibition de l'ADN polymérase et de la topoisomérase II, et peut également induire des dommages à l'ADN en générant des radicaux libres. (Borst et al., 2000) L'ifosfamamide quant à lui se lie directement à l'ADN, entraînant une inhibition de la transcription et de la réplication de l'ADN, ce qui conduit à l'apoptose. D'autres traitements tels que la cisplatine et le méthothrexate sont également utilisés. La cisplatine agit comme l'ifosfamamide en se fixant à l'ADN et en inhibant sa réplication et sa transcription, le

méthotrexate quant à lui inhibe la synthèse des folates impliqués eux-mêmes dans la synthèse d'ADN. (Borst et al., 2000; Ifergan et al., 2003)

### *1.1.5.2. Radiothérapie*

Les ostéosarcomes et les chondrosarcomes sont considérés comme des tumeurs radiorésistantes, il y a donc très peu d'études concernant la radiothérapie et ses effets. Cependant, certaines études ont montré que la radiothérapie pouvait être bénéfique dans des cas de tumeurs résiduelles après résection. (Kager et al., 2010) Mais les doses utilisées doivent être élevées (80Grays) ce qui n'est pas possible pour l'ensemble des tumeurs qui se trouvent trop proches d'axes vasculo-nerveux ne pouvant pas être exposés à des doses si fortes et selon le guide des procédures de radiothérapies externe français de 2007, il existe un risque de fracture osseuse au-dessus de 50 grays. Il existe également une radiothérapie ciblée utilisant le Samarium-153-éthylènediamine tétra méthylène phosphonate, cependant, à la suite de cette thérapie, il est souvent nécessaire d'effectuer une greffe de moelle osseuse étant donnée la toxicité élevée de cet isotope radioactif. (Markiewicz et al., 2011) Les sarcomes d'Ewing sont radiosensibles, et la radiothérapie est utilisée en complément de la chimiothérapie. Une étude récente comparant des patients ayant été opérés et traités par radiothérapie ou des patients ayant reçu uniquement un traitement par radiothérapie montre que la radiothérapie combinée à la résection augmente la survie sans récives, mais que la radiothérapie seule n'est pas suffisante. (Miller et al., 2017)

### *1.1.5.3. Nouvelles thérapies*

Ces dernières années des stratégies innovantes de traitement ont été testées. (Kansara et al., 2014) L'étude OS2006 visait à étudier l'impact du zolédronate, un bisphosphonate, associé à la chimiothérapie et à la chirurgie. L'idée était de cibler les interactions entre les cellules tumorales et le tissu osseux sain. Cette étude française, réalisée par le groupe « sarcome français » n'a pas montré d'amélioration de la survie à trois ans sans rechute, ni de la survie globale des patients traités avec le zolédronate et la chimiothérapie, comparés aux patients traités uniquement avec la chimiothérapie. (Piperno-Neumann et al., 2016)

EURAMOS (groupe d'étude Américain et Européen sur l'ostéosarcome) a tenté de déterminer si l'addition d'interféron IFN- $\pm$ 2b à une thérapie postopératoire avec de la

Doxorubicine, du Cisplatine et du méthothrexate améliorerait la survie des patients comparée à une chimiothérapie cisplatine seule. Aucun bénéfice en termes de survie sans récurrence ou de survie globale après 6 ans n'a été démontré. (Bielack et al., 2015)

Des études pré-cliniques ont par ailleurs ciblé le Programmed Cell Death Ligand 1 (PDL1) qui est un facteur impliqué dans la suppression des effets cytotoxiques des lymphocytes CD8. Jackson K. Shen et coll, ont montré une faible association entre le niveau d'expression de PDL1 dans les tumeurs et la survie globale des patients, notamment, la survie des patients ayant une tumeur n'exprimant pas ou peu PDL1 semble être plus importante. (Shen et al., 2015) Une étude clinique est actuellement en cours utilisant un anti-PDL1 en France, c'est le protocole PEMBROSARC. Une seconde étude clinique Espagnole et Italienne combinant le Nivolumab, un autre anti-PDL1 et le Sunitinib un inhibiteur de tyrosine-kinase vient d'être mise en place.

Malgré les progrès de la chirurgie et la mise en place de ces programmes de chimiothérapies très agressives, le taux de survie et le nombre de patients développant des métastases n'évoluent plus depuis des décennies. Il est donc crucial de continuer à explorer la biologie des tumeurs osseuses pour envisager de nouveaux traitements.

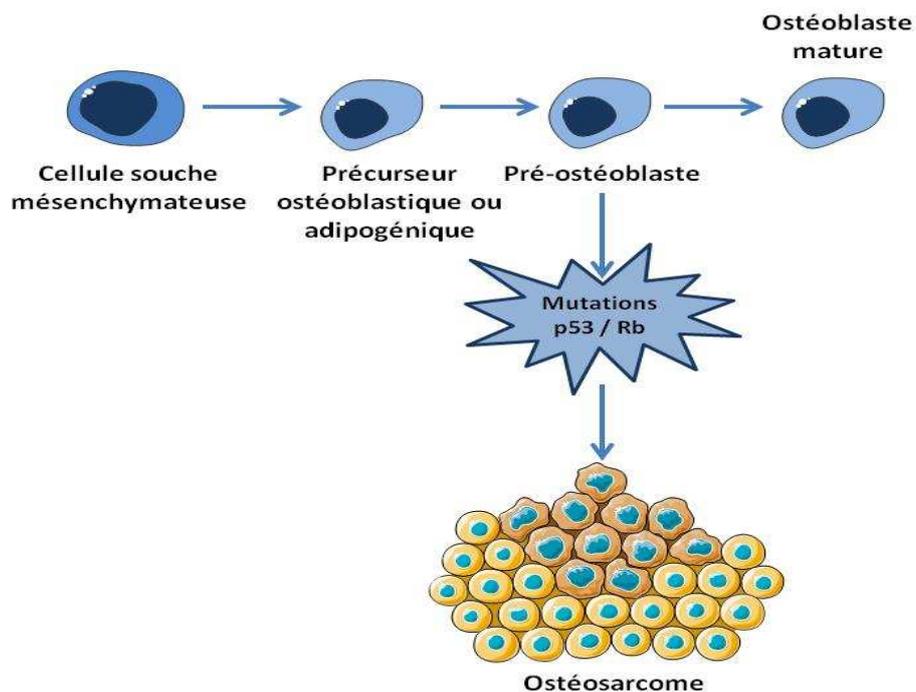
### **I.1.6. Origine cellulaire**

Pour comprendre les phases précoces de leur développement il serait notamment important de déterminer quelle est l'origine cellulaire des différents sarcomes osseux. Si l'origine la plus probable semble être les cellules souche mésenchymateuses parce que ces cellules peuvent donner tous les types cellulaires composant le squelette, les ostéoblastes, les chondrocytes et les adipocytes, de nombreuses données contredisent cette théorie.

#### ***I.1.6.1. Origine des ostéosarcomes***

Il est établi que la lignée ostéoblastique est issue de la différenciation des cellules souche mésenchymateuses (Figure 7). Les différents facteurs impliqués et les promoteurs contrôlant l'expression de ces facteurs au cours de ce processus ont été identifiés et cela a permis d'établir différents modèles de souris dans lesquelles des mutations transformantes ont été réalisées dans des populations cellulaires particulières. Notamment, les gènes *p53* et/ou *Rb* ont été modifiés soit dans des cellules souche mésenchymateuses soit dans des

cellules plus différenciées. Des études *in vivo* de xénogreffe ont montré que 60% des souris chez lesquelles on a induit une mutation perte de fonction de *p53* dans des cellules souche mésenchymateuses grâce en les croisant avec des souris *prx1-CRE* ont développé des tumeurs osseuses avec un phénotype très indifférencié (Lin et al., 2009). En utilisant des doubles mutations *p53* et *Rb* (souris *Prx1-CRE – p53<sup>fl/fl</sup>* et *pRb<sup>fl/fl</sup>*) l'apparition de tumeurs osseuses chute à 29%. Rubio et coll. ont utilisé des cellules souche mésenchymateuses dérivées de la moelle osseuse induite dans la voie de différenciation ostéoblastique et mutées pour *p53* ou *pRb* et ont montré que ces cellules donnaient des tumeurs proches de l'ostéosarcome (Rubio et al., 2013). Cela suggère que les cellules à l'origine de l'ostéosarcome sont des cellules plus différenciées du type pré-ostéoblaste. Le modèle de genèse de l'ostéosarcome est donc qu'une cellule pré-ostéoblastique avec perte de fonction de *p53* et *pRb* entraîne le développement d'une tumeur de type ostéosarcomateuse. (Mutsaers & Walkley, 2014) (Figure 7)



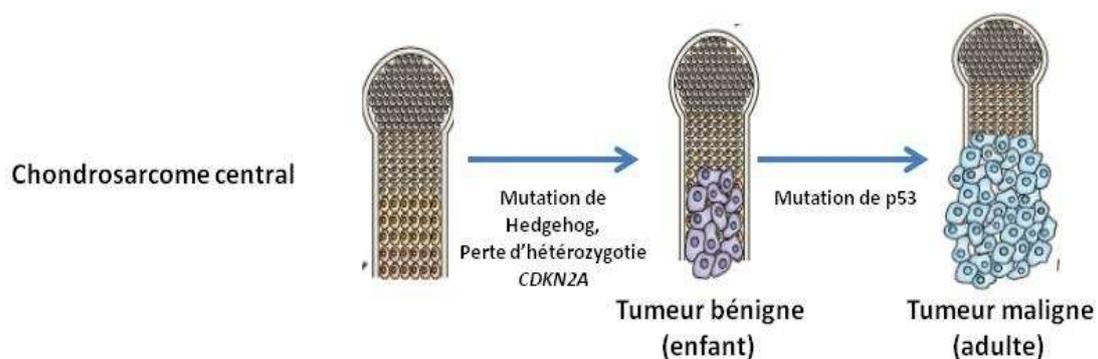
**Figure 7 : Modèle de développement de l'ostéosarcome**

Ce modèle propose que les cellules de type pré-ostéoblastes acquièrent des mutations telles que *p53* ou *pRb*, ce qui entraîne le développement d'une tumeur de type ostéosarcomateuse. D'après Mutsaers, A et coll, 2014

### 1.1.6.2. Origine des chondrosarcomes

L'origine cellulaire des chondrosarcomes résulte d'une transformation maligne des cellules cartilagineuses pendant l'ossification endochondrale, mais les mécanismes moléculaires menant à la tumeur sont étudiés depuis peu de temps.

Récemment, il a été mis en évidence que les chondrosarcomes primaires résultent de la transformation de cellules chondrocytaires suite à une mutation du gène Hedgehog, ce qui conduit à une tumeur bénigne chez l'enfant, puis à l'accumulation d'autres mutations telles que *p53* au cours des années. Cette accumulation de mutation aboutie à une tumeur maligne chez l'adulte. (Figure 8) Moins de 15% des chondrosarcomes conventionnels se développent à la surface de l'os, résultant pour la plupart du temps, d'une transformation maligne à l'intérieur de la coiffe du cartilage, d'un ostéochondrome préexistant, on parle donc de chondrosarcomes secondaires périphériques. Les chondrosarcomes secondaires sont caractérisés par une forte perte d'hétérozygotie de la région 9p 12-22. Une très faible minorité de chondrosarcomes (moins de 1%) se développent à la surface de l'os, peuvent être d'origine périostale. On parle de chondrosarcome périostal. (Gelderblom et al., 2016) Mais dans tous les cas, il s'agit de cellules chondrocytaires malignes.



**Figure 8 : Développement d'un chondrosarcome central**

Transformation de cellules chondrocytaires suite à une mutation du gène Hedgehog et/ou une perte d'hétérozygotie du gène *CDKN2A* (*p16*), ce qui conduit à une tumeur bénigne chez l'enfant, puis à l'accumulation d'autres mutations telles que *p53* au cours des années. Cette accumulation de mutation aboutie à une tumeur maligne chez l'adulte. D'après Bovée et coll., 2010

### 1.1.6.3. Origine des sarcomes d'Ewing

L'aspect histologique des sarcomes d'Ewing a amené James Ewing à penser que les cellules avaient une origine endothéliale. (Ewing, 1921). Depuis plusieurs autres hypothèses ont été avancées, notamment les travaux de Lawlor et coll., (Lawlor et al., 1998) qui mettent

en évidence l'expression de *GRP* dans des lignées cellulaires ou des tumeurs primaires exprimant la protéine chimère *EWS-FLI1*. Ce gène est exprimé dans les cellules du cerveau, les cellules neuroendocrines du pancréas et pas dans d'autres cancers pédiatriques à petites cellules rondes. Cela suggère que les cellules des tumeurs d'Ewing pourraient être issues de la crête neurale. Cette hypothèse est appuyée par les travaux de Cavazzana et coll., qui montrent que des cellules d'Ewing forment des structures semblables à des neurites quand elles sont cultivées en présence de NGF (Nerve Growth Factor) qui induit la différenciation neurale. (Cavazzana et al., 1987) Une autre hypothèse basée sur l'expression par les cellules d'Ewing de protéines de jonctions serrées évoque une origine épithéliale. (Schuetz et al., 2005) Mais plus récemment des articles montrent l'implication des cellules souche mésenchymateuses dans le développement du sarcome d'Ewing. Castillero-Trejo et coll., ont montré que des cellules dérivées d'os murin infectées avec un rétro-virus codant pour *EWS-FLI1* étaient capables d'induire des tumeurs chez la souris. (Castillero-Trejo et al., 2005). Riggi et coll., ont également montré que des cellules souche mésenchymateuses murines immortalisées et exprimant la protéine de fusion *EWS-FLI1* sont capables d'initier une tumeur semblable à un sarcome d'Ewing quand elles sont transplantées chez des souris. (Riggi et al., 2005) Ces auteurs ont également mis en évidence un programme génique commun entre des cellules souche mésenchymateuses humaines exprimant *EWS-FLI1*, et des cellules de sarcome d'Ewing. (Riggi et al., 2008) Cependant, les conclusions de Riggi et coll. ont été contestés par Kovar et coll., qui ont argumenté que dans cette étude l'inhibition de *EWS-FLI1* n'a pas permis de restaurer un phénotype de cellules souche mésenchymateuses. (Kovar & Bernard, 2006) Cependant, Tirode et coll. ont montré que l'inhibition de la protéine de fusion *EWS-FLI1* dans des cellules de sarcome d'Ewing permet de restaurer les caractéristiques des cellules à l'origine du sarcome d'Ewing et une réponse aux différents programmes de différenciation (Tirode et al., 2007). Ils ont montré que les lignées cellulaires de sarcome d'Ewing dans lesquels l'expression d'*EWS-FLI1* a été inhibée, présentent un profil génétique de cellule souche mésenchymateuse et expriment les marqueurs CD44, CD54, CD59 et CD73. (Tirode et al., 2007) De plus les cellules d'Ewing modifiées sont capables de se différencier en adipocyte, chondrocyte et ostéoblastes. Ce dernier article conforte donc l'hypothèse selon laquelle des cellules souche mésenchymateuses sont à l'origine du développement du sarcome d'Ewing.

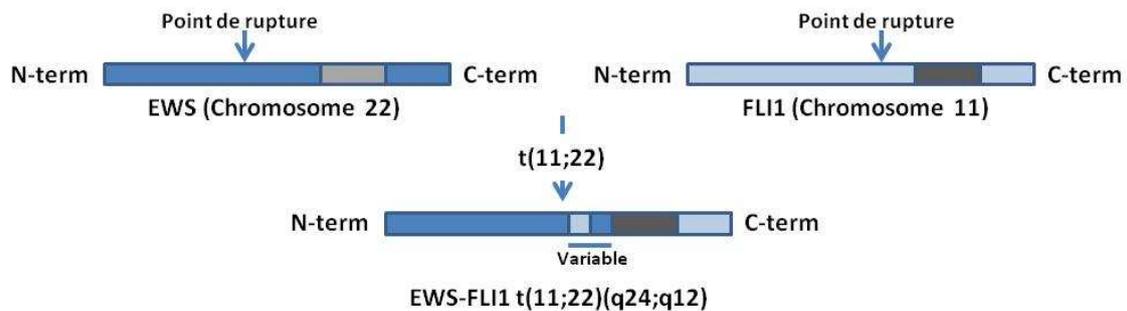
L'ensemble de ces données suggèrent que la transformation de différents types de cellules pourrait aboutir à la formation de tumeurs osseuses et ainsi contribuer à la diversité génétique de ces tumeurs. (Sheffield et al., 2017)

### I.1.7. Etiologie

Un autre obstacle empêche de bien comprendre comment les tumeurs osseuses se développent. Dans la majorité des cas l'étiologie de la maladie n'est pas connue. Les seuls facteurs de risque environnementaux connus sont les radiations ionisantes qui causent 3% des ostéosarcomes et peuvent apparaître 30 ans après l'exposition. Cette exposition explique donc plus probablement le développement des ostéosarcomes chez les adultes que chez les enfants. Certaines maladies héréditaires peuvent prédisposer au développement des ostéosarcomes, c'est le cas des rétinoblastomes, des syndromes de Rothmund–Thomson, de Li Fraumeni et du syndrome de Werner, ce qui suggère que les mutations géniques associées à ces maladies telles que *RB1*, *RECQL4*, *TP53*, *WRN*, peuvent jouer un rôle dans l'apparition des tumeurs osseuses primaires. (Kansara et al., 2014) Des efforts importants ont été consacrés ces dernières années pour déchiffrer les altérations géniques des sarcomes osseux.

### I.1.8. Altérations géniques

Le développement du sarcome d'Ewing est plus simple à décrire sur le plan génétique. En effet, il est caractérisé par une seule et unique mutation génétique, une translocation qui aboutit à une fusion de gènes. Dans 85% des cas, il s'agit ici d'une fusion *EWSR1-FLI1*. (Figure 9) Dans 10 à 15% des cas, cette translocation mène à une fusion *EWSR1-ERG*. (Mutsaers & Walkley, 2014). La conséquence sur le développement tumoral de *EWSR1-FLI1* est difficile à étudier, en effet de par la toxicité de la fusion, il n'existe pas de modèle de souris reproduisant la maladie. Cependant, l'expression de la fusion dans une lignée cellulaire murine, entraîne une indépendance des cellules vis-à-vis du support de culture et une accélération de la croissance tumorale dans des souris immunodéprimées. (Riggi & Stamenkovic, 2007)



**Figure 9 : Translocation EWS-FLI1 dans le sarcome d'Ewing**

*EWS* se situe sur le chromosome 22 et *FLI1* sur le chromosome 11. Lors de la translocation, les exons 5-9 ou 6-9 de *FLI1* peuvent être inclus sur le chromosome 22. Ce qui aboutit à une protéine de fusion EWS-FLI1. D'après Riggi et coll, 2007

*EWSR1-FLI1* est un activateur du proto-oncogène *c-myc* (Antonescu et al., 1998), il est également impliqué dans la sur activation de la voie Notch. (Ida K, 1995) De même *EWSR1-FLI1* semble être impliqué dans le contrôle du récepteur II du Transforming growth factor beta (T $\beta$ R-II), un potentiel gène suppresseur de tumeur. On observe également la présence d'une altération de *p53* dans 11% des cas de sarcome d'Ewing. (Alava et al., 2000)

Un modèle de développement des chondrosarcomes propose qu'il existe des changements génétiques précoces et tardifs. Les changements précoces interviennent dans des gènes impliqués dans les processus de prolifération et de différenciation du chondrocyte alors que les changements tardifs affectent des gènes impliqués dans le développement et la progression tumorale menant à une transformation maligne. (Samuel et al., 2014) Environ 50% des chondrosarcomes sont associés à une mutation gain de fonction dans le gène de l'isocitrate déshydrogénase 1 ou 2 (*IDH1* ou *IDH2*), pendant la phase de changements précoces. (Amary et al., 2011) L'amplification des proto-oncogènes *c-myc*, *c-fos* et *c-jun* a été rapportée ainsi que la mutation des gènes suppresseurs de tumeur *p53* et *pRb* lors des changements tardifs. (Castresana et al., 1998)

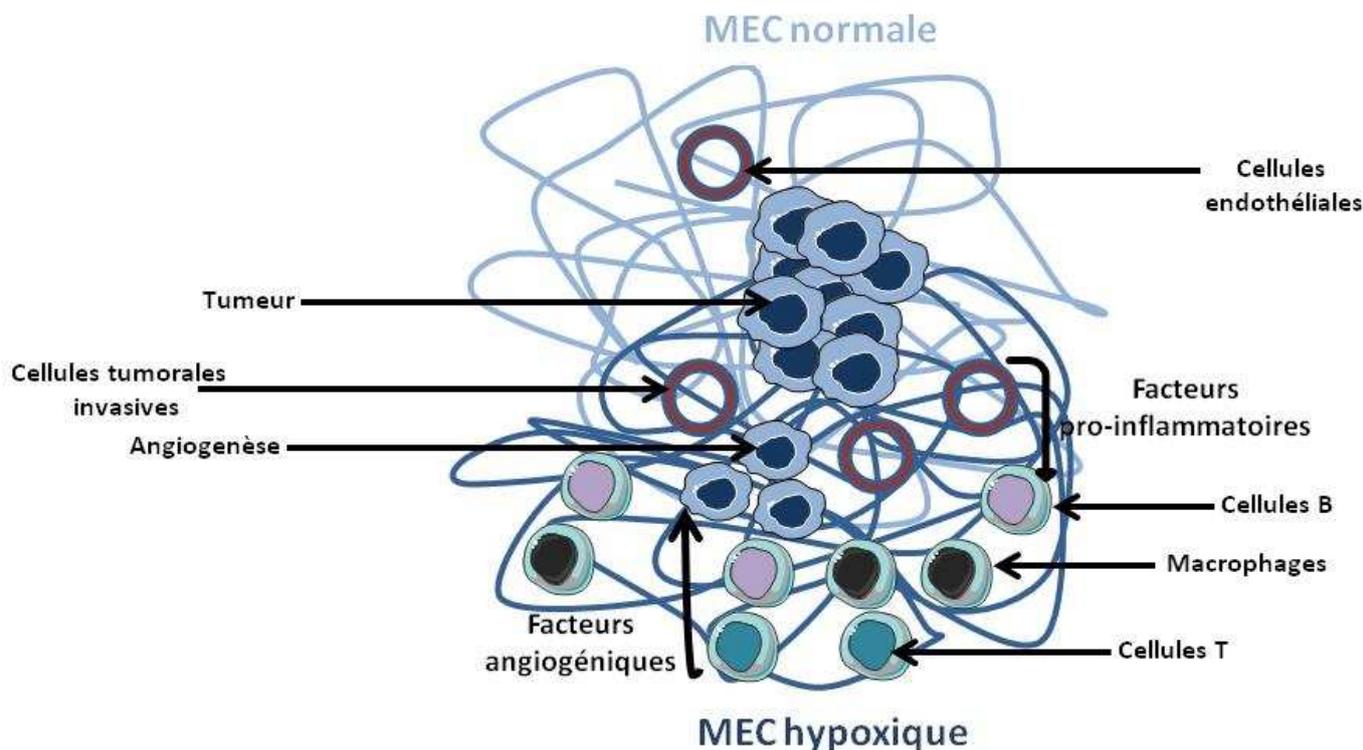
Les ostéosarcomes sont plus complexes sur le plan génétique, en effet les caryotypes analysés montrent de très nombreuses altérations géniques et chromosomiques. Il est donc difficile de savoir si une de ces altérations est à l'origine de son développement ou une conséquence d'une déstabilisation du génome. Par exemple, des mutations de *p53* et/ou du gène *MDM2* sont fréquemment observées. (Onda et al., 1996) Des altérations de *c-fos*, *c-myc*, *pRb* et *p16<sup>INK4A</sup>* sont également rapportées dans de nombreux cas d'ostéosarcomes.

(Letson & Muro-Cacho, 2001) Une analyse par microarray comparant des patients ayant un ostéosarcome mais ne présentant pas de métastases comparées à des patients présentant des métastases au moment de l'analyse ou en ayant développés après montre une association entre le développement de métastases et un panel de gènes impliqués dans l'activation des cellules T et B, ainsi que des récepteurs à chimiokines impliquées dans la migration cellulaire telle que CXCR4. (Namløs et al., 2012) Deux articles plus récents montrent l'implication d'ERK1 et STAT3 et la voie YAP/TAZ-intégrine  $\beta$ -1 dans la résistance aux chimiothérapies. (Bouvier et al., 2016; Salas et al., 2014) Cependant aucune de ces altérations géniques ne suffit à expliquer à elle seule le développement des ostéosarcomes.

Il est à noter que beaucoup des altérations géniques mises en évidence dans les sarcomes osseux ne sont pas spécifiques et sont présentes dans de nombreuses tumeurs. La localisation privilégiée dans certaines zones osseuses avec un remodelage intense et la survenue plus importante chez des patients jeunes en croissance suggèrent que le microenvironnement osseux joue un rôle particulier dans le développement des tumeurs osseuses.

### **I.1.9. Rôle de l'environnement tumoral**

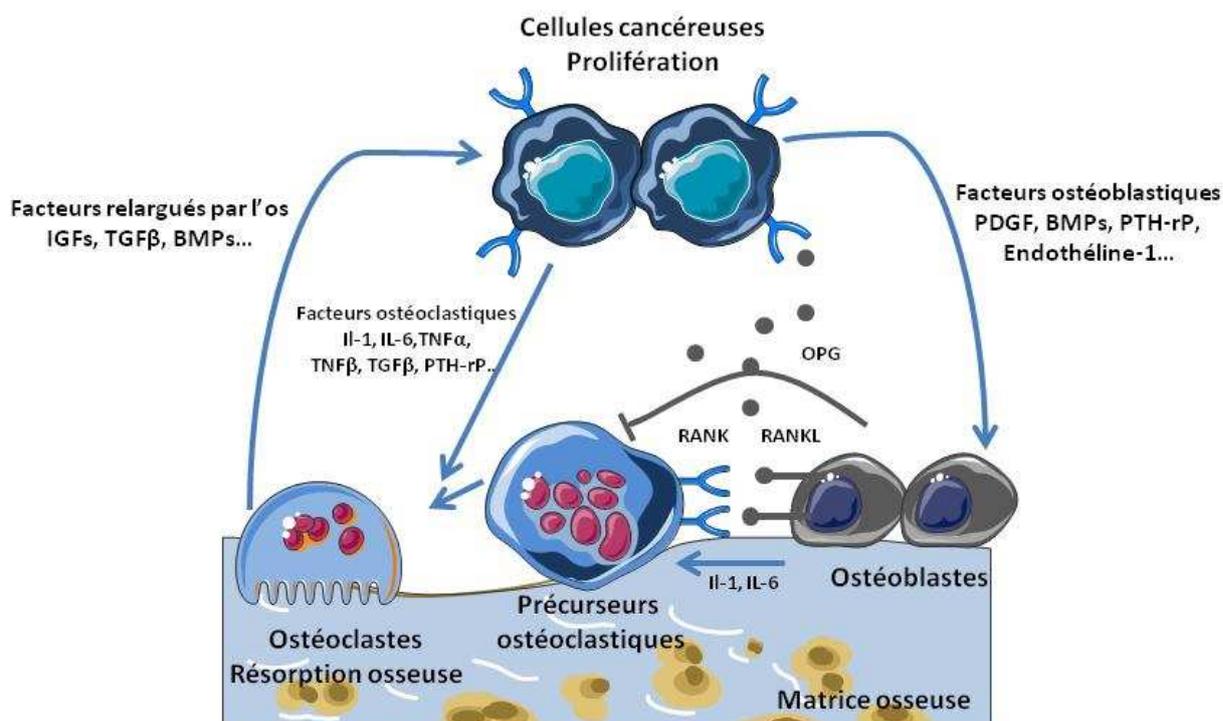
La théorie du « seed and soil » de Paget en 1889 a fixé les bases d'un rôle majeur de l'environnement dans le développement tumoral. Même si cette théorie a été développée pour expliquer le mode de dissémination des cellules du cancer du sein, elle est applicable à l'environnement osseux et en particulier à la niche hématopoïétique qui représente un sol fertile (« soil ») pour les cellules tumorales (« seeds »). Les travaux de Bissel en 1982 ont montré que l'environnement est aussi important que les altérations géniques dans le développement des cancers. La niche hématopoïétique est d'autant plus favorable qu'elle représente un réservoir de cellules immunitaires, vasculaires, et de cellules souches mésenchymateuses qui produisent des protéines matricielles et des facteurs solubles (facteurs de croissance, chimiokines, cytokines, enzymes) nécessaires à la croissance tumorale. (Liao et al., 2015)(Figure 10)



**Figure 10 : Contribution du microenvironnement tumorale dans la croissance tumorale et l'invasion**

Les fibroblastes associés à la tumeur ainsi que les cellules du système immunitaire induisent la production de facteurs pro-angiogéniques (tels que EGF, TGF $\beta$ , des chimiokines), notamment en réponse à l'hypoxie. Le microenvironnement tumoral permet des interactions spécifiques avec les récepteurs à la surface des cellules tumorales (intégrines, cadhérines) qui participent au processus invasif. MEC : matrice extracellulaire *D'après Allen et coll., 2011*

Un autre aspect du tissu osseux est la capacité des cellules tumorales à modifier et à détourner les mécanismes qui régulent le remodelage osseux pour induire une augmentation de la lyse de l'os sain et/ou adopter un phénotype ostéogénique (Allen & Jones, 2011). Ce processus est un cercle vicieux qui met en jeu de multiples facteurs présents dans le tissu osseux et qui sont libérés lors de la résorption osseuse et stimulent la croissance tumorale. (Figure 11) Ces facteurs induisent non seulement la prolifération des cellules tumorales mais également leur survie en activant des voies de signalisation impliquant PI3K, des MAP kinases et NF $\kappa$ B. (Brown et al., 2007; Lamoureux et al., 2010)



**Figure 11 : Représentation du cercle vicieux qui s'établit entre les cellules tumorales et le tissu osseux**

La différenciation et l'activité des ostéoclastes dépendent de l'équilibre entre le RANKL et l'OPG qui sont produits par les cellules ostéoblastiques et les cellules stromales. Les cellules tumorales expriment des facteurs activant les ostéoclastes tels que PTHrP, IL-6, IL-11 et TNF- $\alpha$ . Ces facteurs induisent la résorption osseuse et la libération de facteurs de croissance tels que TGF- $\beta$ , BMPs, IGF-1 qui à leur tour stimulent la croissance tumorale. *D'après Lamoureux et coll., 2010*

Ainsi, les cellules tumorales produisent des facteurs « ostéolytiques » dont la PTHrP (ParaThyroid Hormone-Related Protein), l'IL-6, l'IL-11 et des TNF $\pm$  et <sup>2</sup> et /ou des facteurs qui activent les cellules ostéoblastiques comme le VEGF (Vascular endothelial growth factor), PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) et l'endothéline 1. La stimulation des cellules ostéoblastiques induit également la sécrétion d'une grande quantité d'IL-6. Ces différents facteurs modifient l'équilibre RANKL/ Ostéoprotégérine (OPG) à la faveur du RANKL qui est produit par les cellules ostéoblastiques et aussi par les cellules tumorales. RANKL est un des facteurs majeurs supportant la différenciation et l'activité des ostéoclastes (Fizazi et al., 2003). La lyse osseuse augmentée permet la libération des facteurs de croissance piégés dans la matrice comme le TGF<sup>2</sup>. Certains, médiateurs de la signalisation Wnt comme DKK1 (DicKkopf 1) participent à cet enchaînement d'évènements en inhibant la différenciation des cellules ostéoblastiques et en contribuant à perturber la formation osseuse normale.

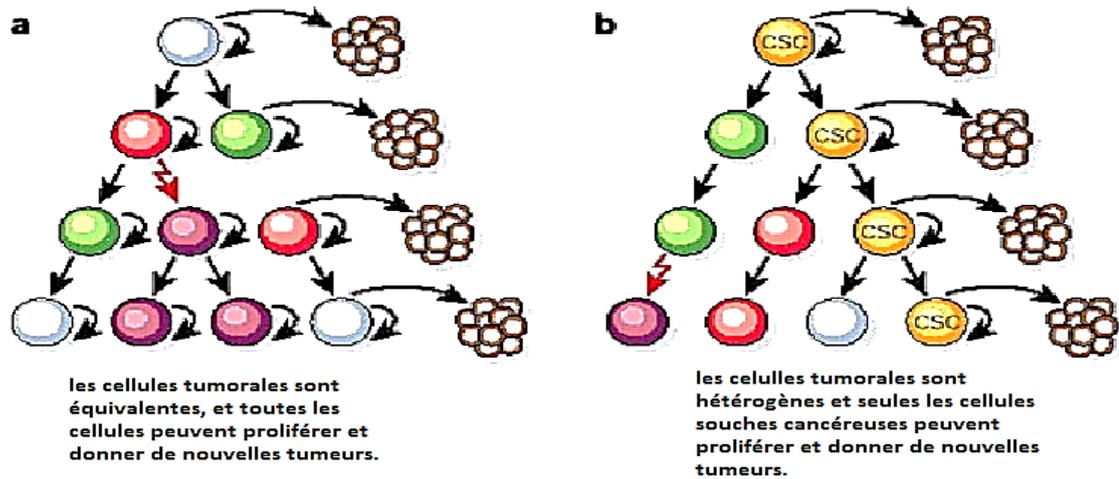
Malgré le développement de ce type de tumeurs chez des sujets jeunes, chez lesquels le remodelage osseux actif dû à la croissance favorise la présence de facteurs de croissance permettant la différenciation des cellules souche mésenchymateuses, les conditions initiales déterminant le développement tumoral ne sont pas connues.

Certains aspects du développement des sarcomes osseux ne sont expliqués par les altérations géniques communes à toutes les cellules tumorales ou les interactions avec le tissu osseux sain. Notamment, il existe une hétérogénéité génétique ou épigénétique intra-tumorale à laquelle s'ajoutent de fortes variations de réponse au traitement. Des récurrences locales ou métastatiques peuvent se développer longtemps après la résection même chez de bons répondeurs. Cela conduit à envisager une progression tumorale qui pourrait impliquer des cellules souche cancéreuses (CSC).

## **I.2. Cellules souche cancéreuses**

### **I.2.1. Concept de cellule souche cancéreuse**

L'hétérogénéité tumorale et ses implications importantes dans le développement des cancers ont été décrites il y a presque un siècle par les pathologistes. Par exemple, bien que de nombreuses cellules soient capables d'échapper à la tumeur, seulement peu d'entre elles sont capables de former des métastases (Mehlen & Puisieux, 2006). Deux modèles ont été proposés pour expliquer le potentiel hétérogène des cellules tumorales : le modèle stochastique qui prédit qu'une population particulière de cellules cancéreuses subit un ensemble de mutations pour acquérir un caractère malin notamment la capacité de former des métastases. Le modèle hiérarchique met en jeu des cellules rares qui ont des propriétés de cellule souche et qui sont à l'origine de la tumeur primaire et des métastases. (Figure 12) (Lacerda et al., 2010; Schulenburg et al., 2010; Tannishtha et al., 2001)



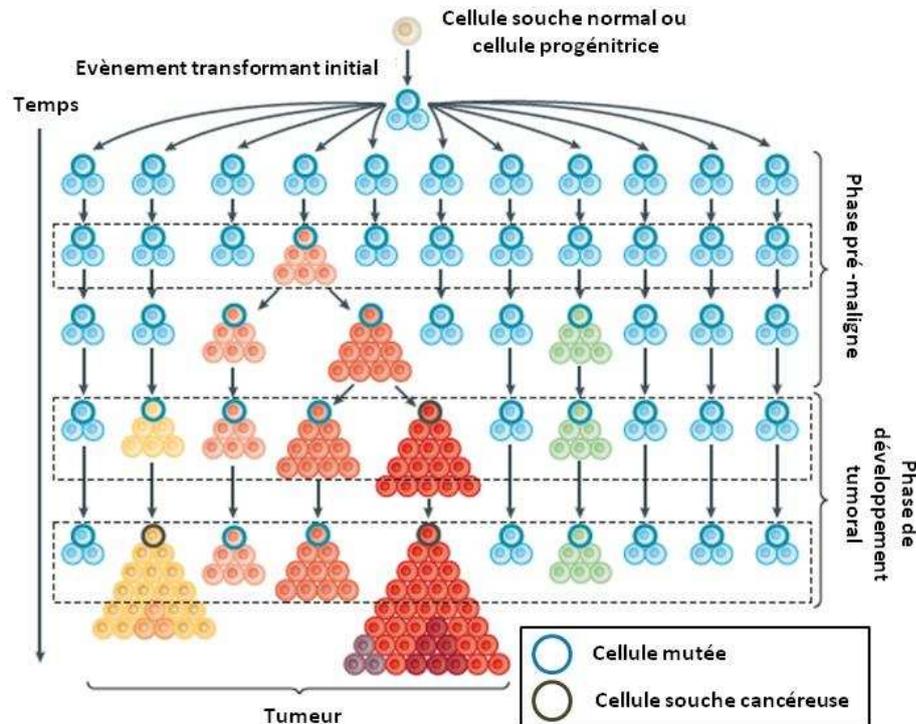
**Figure 12 : Modèles théoriques des cellules souches cancéreuses**

Les tumeurs sont composées de différents types cellulaires. Les deux théories divergent sur l'origine de ces différents types cellulaires. Selon le modèle stochastique, toutes les cellules sont équivalentes mais leur devenir est influencé par des facteurs intrinsèques et extrinsèques. Ainsi toutes les cellules peuvent potentiellement devenir des cellules souches cancéreuses. Au contraire, selon le modèle hiérarchique, les cellules sont toutes différentes et seulement une population donnée est capable d'initier la croissance tumorale. Ce sont donc des cellules identifiables et isolables grâce à des marqueurs spécifiques. *D'après Tannishtha et al., 2001*

Ce modèle introduit donc le concept de cellule souche cancéreuse (CSC) qui est basé sur les connaissances accumulées sur le rôle des cellules souche au cours de l'embryogenèse ou dans le renouvellement du système hématopoïétique et d'autres tissus adultes. Ce concept implique que la tumeur se développe comme les organes sains à partir de cellules capables de s'auto renouveler et avec des capacités de différenciation multiples.

Valent et coll, (Valent et al., 2012) ont récemment proposé un modèle actualisé du développement tumoral à partir des CSC. Ce groupe de travail a proposé, qu'un évènement initial, tel qu'une mutation dans une cellule souche normale, ou une cellule progénitrice entraîne une prolifération anormale de cellules dites pré-malignes. Cela correspond au stage d'hyperplasie des tumeurs mammaires Il peut survenir dans un deuxième temps des évènements transformant (modification de l'environnement, nouvelles mutations, modifications épigénétiques...) qui vont induire un nouveau comportement de certaines cellules pré-malignes qui est lié à l'acquisition de caractéristiques de cellules souche. La présence de ce type de cellules conférerait le caractère malin à la tumeur. (Figure 13) Ce modèle montre que les deux modèles historiques ne sont pas forcément exclusifs et que le concept de cellule souche doit être pris comme un ensemble de variations environnementales, métaboliques, géniques et épigénétiques conduisant une cellule

précancéreuse à acquérir un phénotype de cellule souche. Cette cellule souche cancéreuse sera la cellule initiatrice de tumeur et participera à la création d'une hiérarchie au sein de la tumeur, favorisant l'hétérogénéité tumorale.



**Figure 13 : Modèle de développement hiérarchique d'une tumeur**

Dans ce modèle actualisé du développement tumoral, un évènement initial dans une cellule saine lui confère un avantage prolifératif et un caractère pré-malin. Cette phase peut correspondre à une la phase d'hyperplasie dans les tumeurs mammaires. Mais c'est l'accumulation d'autres évènements transformant qui confère des caractéristiques souches à certaines cellules pré-malignes. C'est la présence de cellules « souche » qui confère le caractère malin à la tumeur. *D'après Valent et al., 2012*

### I.2.2. Caractéristiques des cellules souche cancéreuses

Une cellule souche est une cellule indifférenciée capable de s'auto renouveler et donner naissance à un ou plusieurs types de cellules différenciées. Les capacités des cellules souche sont dues à une activité télomérase accrue, l'activation de voies de signalisation anti-apoptotiques, l'augmentation de l'activité des transporteurs membranaires, de meilleures capacités de migration cellulaire, de survie en l'absence d'adhésion à un substrat, et de résistance à l'hypoxie (Lapidot et al., 1994). On comprend comment l'acquisition de telles propriétés par une cellule cancéreuse peut contribuer à l'induction d'une malignité accrue

c'est à dire au développement de métastases et à l'augmentation de la résistance aux traitements.

De plus, les CSC partagent les défauts géniques des autres cellules de la tumeur et présentent donc aussi des caractéristiques propres qui les distinguent des cellules souche normales. Les CSC diffèrent ainsi par des critères inhérents à la transformation cancéreuse comme la prolifération anarchique ainsi qu'une capacité de différenciation souvent réduite. De plus, l'activité télomérase, bien que présente, peut-être modifiée. (Virmani AK et al., 2001) En fait, les CSC possèdent au moins quatre des sept traits suivants qui sont nécessaires à la transformation tumorale (Hanahan & Weinberg, 2011) :

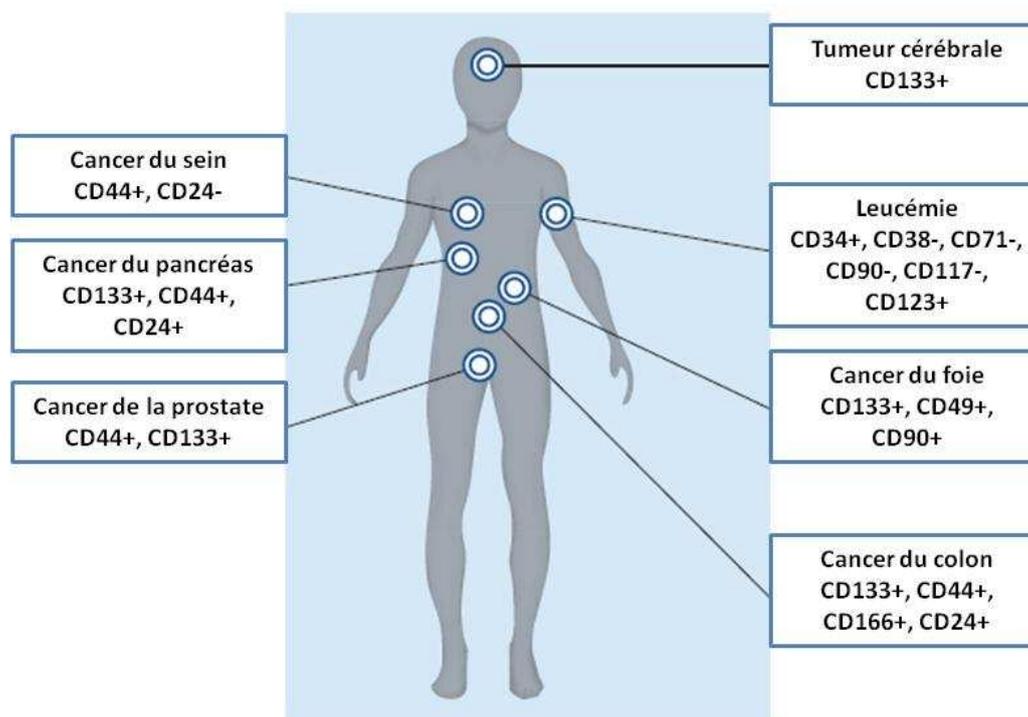
1. L'autosuffisance en facteurs de croissance,
2. L'insensibilité aux facteurs inhibiteurs de croissance,
3. L'échappement à l'apoptose,
4. Le potentiel de réplication illimité,
5. Le maintien de l'angiogenèse,
6. L'invasion tissulaire et métastase,
7. L'instabilité du génome

Liste à laquelle il faut ajouter des capacités de réparation de l'acide désoxyribonucléique (ADN) accrues, l'influence du microenvironnement et des modifications épigénétiques.

Cependant, un point reste à éclaircir qui est la fréquence des CSC dans la tumeur. Est-ce que, comme les cellules souche normales, les CSC constituent une fraction très minoritaire du tissu (Lapidot et al., 1994). Cela pourrait être dépendant du type de tumeur, de l'origine cellulaire et des altérations géniques ? La rareté potentielle de ces cellules constitue une vraie difficulté pour les caractériser et trouver des moyens spécifiques pour les cibler. Plusieurs études ont cherché à déterminer des marqueurs membranaires ou métaboliques spécifiques des CSC.

### *1.2.2.1. Marqueurs Membranaires*

Les premières recherches concernant l'isolation de CSC par des marqueurs membranaires ont été réalisées dans les leucémies. Dick et coll., ont alors montré que certaines cellules de leucémie myéloïde aigüe exprimaient à leur surface l'antigène CD34 tout comme les cellules souche mésenchymateuses normales, mais perdaient l'expression du CD38. Ils ont également montré que les cellules CD34+/CD38- étaient à la tête de la hiérarchie cellulaire et étaient responsable du développement des leucémies myéloïdes aigües. (Dick JE, 1997) Dans le cas des tumeurs solides, c'est dans les cancers du sein que les marqueurs de surfaces ont été étudié en premier, Al-Hajj et coll., ont montré que des cellules présentant un phénotype CD44+/CD24- étaient à l'origine du développement tumoral dans des souris NOD/SCID. (Al-Hajj et al., 2003) Dans le cancer du côlon, il a été montré que seules les cellules exprimant l'antigène CD133 sont capables de former des tumeurs chez la souris. Plus récemment certains auteurs ont montré que le CD44 pouvait également être utilisé pour identifier des CSC dans le cancer du côlon. (O'Brien et al., 2007; Ricci-Vitiani et al., 2007) Depuis ces mêmes marqueurs ont été identifiés dans d'autres types de tumeurs tels que dans les cancers de la prostate, du pancréas, du foie, et il a également été montré qu'il est nécessaire d'associer ces marqueurs entre eux pour pouvoir identifier plus facilement les CSC. (Figure 14)



**Figure 14 : Les principaux marqueurs de surfaces décrivent dans cancers fréquents**

Les différents marqueurs utilisés sont souvent identiques dans toutes les tumeurs, mais associés différemment selon le type de tumeur. *D'après Murar & Vaidya, 2015*

Il est à noter que ces marqueurs ne sont absolument pas spécifiques des CSC et ne peuvent donc pas servir à cibler ses dernières par une chimiothérapie. C'est pourquoi d'autres études se sont intéressées aux marqueurs métaboliques des cellules souche cancéreuse.

### *1.2.2.2. Marqueurs métaboliques*

Le premier à avoir émis l'hypothèse que les cellules cancéreuses sont caractérisées par un métabolisme particulier est Warburg en 1920, l'effet Warburg correspond à l'observation selon laquelle la plupart des cellules cancéreuses produisent de l'énergie grâce à un fort taux de glycolyse suivie d'une fermentation d'acide lactique dans le cytosol, plutôt que grâce à la respiration mitochondriale comme cela se passe dans la majorité des cellules normales (Warburg Otto, 1925). De plus, de nombreux travaux ont montré que des CSC de gliomes, de cancers du sein et de cancers du côlon, n'utilisent pas les mêmes voies métaboliques que les autres cellules cancéreuses. Cela leur confère une plus grande adaptabilité à l'environnement et une plus grande résistance aux traitements. (Wong et al., 2017)

#### I.2.2.2.1. ALDH1

Les Aldéhyde Déshydrogénases (ALDH) forment une famille d'isoenzymes cytosoliques responsables de la détoxification des aldéhydes intracellulaires en acides carboxyliques, et de l'oxydation du rétinol en acide rétinoïque. Ces enzymes jouent notamment un rôle critique dans la différenciation des cellules souche hématopoïétiques, en effet l'acide rétinoïque agit comme facteur de transcription, contrôlant des processus biologiques tels que la prolifération, la différenciation, l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. (Balicki, 2007; Douville et al., 2009; Marcato et al., 2011)

Dans le cancer du sein, il a été mis en évidence que des cellules cancéreuses de sein exprimant l'aldéhyde déshydrogénase 1 (ALDH1), étaient capables d'initier et de maintenir des xénogreffes chez la souris. Les tumeurs issues de ces xénogreffes montrent une organisation hiérarchique, avec à leur sommet les cellules exprimant ALDH1. (Charafe-Jauffret et al., 2013) Ce qui fait d'ALDH1 un marqueur robuste de cellules souche cancéreuses dans le cancer du sein. Ce marqueur a été utilisé pour isoler des CSC dans de nombreux types de cancer comme par exemple le cancer de la prostate. (Al-Hajj et al., 2003)

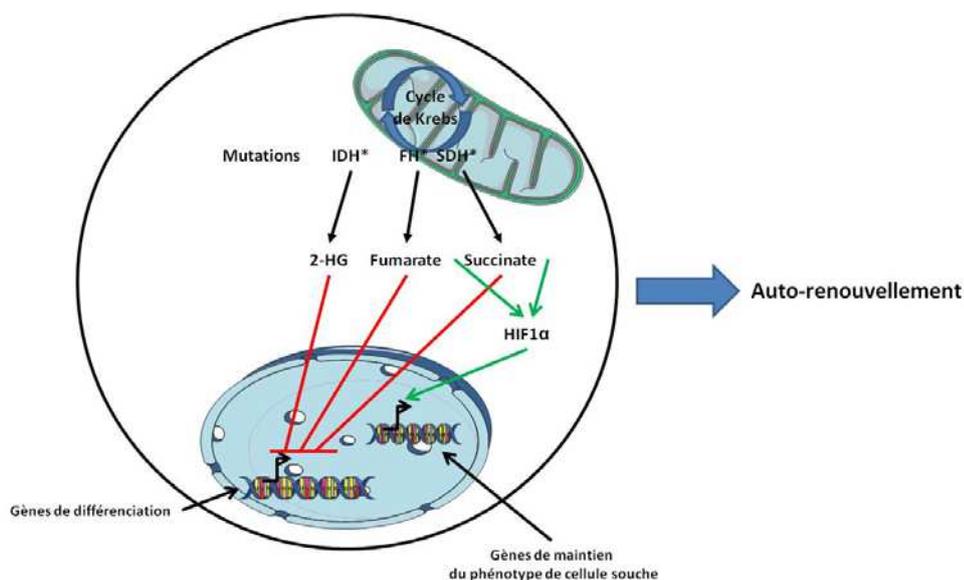
Cependant, l'utilisation de l'activité ALDH comme marqueur de CSC comporte également des limites et est controversée. (Neumeister & Rimm, 2010) En effet, l'analyse de l'activité ALDH sur coupes fixées est impossible, certaines des études cliniques sont donc réalisées en analysant la présence de la protéine ALDH. Bien qu'il ait été montré que l'expression d'ALDH1 est un facteur de mauvais pronostic dans le cancer du sein (Charafe-Jauffret et al., 2010), l'étude de Resetkova et coll., indique une absence de corrélation entre l'expression d'ALDH1 et la survie globale des patients ayant un cancer du sein, après une thérapie adjuvante. (Resetkova et al., 2010) Enfin, il semble qu'une distinction entre les différents isoformes d'ALDH soit nécessaire, les isoformes responsables de l'activité ALDH semblant dépendre du type tumoral et du tissu étudié. (Marcato et al., 2011)

#### I.2.2.2.2. Cycle de Krebs

Les modifications du métabolisme du glucose dans les cellules cancéreuses sont utilisées depuis longtemps notamment pour imager les tumeurs. (Lee et al., 2016) De plus, Le détournement du cycle de Krebs, pourrait permettre aux cellules cancéreuses de maintenir leurs propriétés souche. Ainsi, des mutations gains de fonction de l'isocitrate

déshydrogénase I ou 2 trouvées dans les gliomes favorisent la production d'hydroxyglutarate à la place de l'alpha cétooglutarate. L'hydroxyglutarate se lie aux membres de la famille des 5-méthylcytosine hydroxylases et permet l'hyperméthylation de l'ADN et la répression de certains gènes impliqués dans la différenciation cellulaire. (Ward et al., 2010; Xu et al., 2011) Par ailleurs, il a été montré que des mutations perte de fonction de la succinate déshydrogénase et de la fumarate déshydrogénase favorisent l'accumulation du succinate et du fumarate, qui permettent également l'hyperméthylation et l'inhibition de gènes impliqués dans la différenciation cellulaire et la transition épithélio-mésenchymateuse. (Letouzé et al., 2013) La production de ces oncométabolites favorise donc un phénotype indifférencié et augmente la population type CSC. (Lee et al., 2016)

De plus, l'accumulation d'hydroxyglutarate, de succinate, et de fumarate stabilise les facteurs HIF (hypoxia inducible factor). Ces facteurs sont connus pour favoriser l'expression de gènes impliqués dans le maintien de cellules souche tels qu'*Oct4*, *Sox2*, *Nanog*, *Snail* et *Twist* (Figure 15)

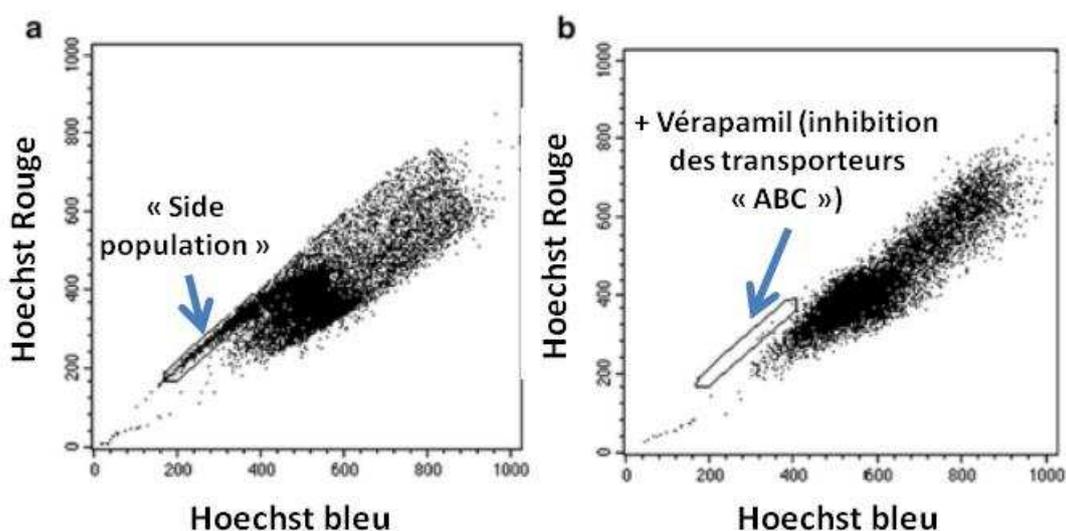


**Figure 15 : Détournement du cycle de Krebs par les cellules souche cancéreuses**

Dans les cellules souche cancéreuses, notamment dans les gliomes, des mutations de l'isocitrate déshydrogénase (IDH), de la fumarate hydrogénase (FH) et de la succinate déshydrogénase (SDH) permettent l'accumulation d'hydroxyglutarate (2-HG), de fumarate et de succinate et bloquent le cycle de Krebs. Le 2-HG, le fumarate et le succinate bloquent les facteurs de transcription permettant la transcription de gènes de différenciation cellulaire. Le fumarate et le succinate permettent également de stabiliser les facteurs HIF1 $\alpha$ . HIF1 $\alpha$  peut alors être transloqué au noyau et servir de facteur de transcription pour des gènes impliqués dans le maintien du phénotype de cellule souche indifférenciée et l'auto-renouvellement. D'après NLee et al., 2016

### I.2.2.2.3. Détoxification

Il a été montré que les CSC peuvent avoir une capacité accrue à exclure les agents de chimiothérapies. Elles expriment de grandes quantités de transporteurs ABC (Adenosine triphosphate binding cassette) tels qu'*ABCB1*, *ABCG2*, *ABCB5*. (Moitra et al., 2011) Les transporteurs ABC permettent de faire passer des substrats à travers la membrane plasmique via l'hydrolyse de l'ATP. Il a été démontré que des souris KO pour les transporteurs *ABCB1* ou *ABCG2* étaient plus sensibles aux agents toxiques, ce qui suggérerait que les transporteurs ABC pouvaient jouer un rôle dans la protection des cellules souche contre les agents toxiques. (Schinkel et al., 1994) Le rôle important des transporteurs ABC dans les CSC est illustré par le fait que des cellules tumorales de thyroïde, des poumons ou du sein qui sont présentes dans la « side population » ont des caractéristiques de CSC. (Chiba et al., 2006; Haraguchi et al., 2006; Ho et al., 2007; Kondo et al., 2004; Mitsutake et al., 2007; Szotek et al., 2006; Wang et al., 2007; Wu et al., 2007) La « side population » est composée de cellules capables d'exclure des marqueurs fluorescents comme Hoechst ou la rhodamine. Cette exclusion dépend des transporteurs ABC (*ABCG2* pour le Hoechst et *ABCB1* pour la rhodamine) (Figure 16). (Hirschmann-Jax et al., 2004)



**Figure 16 : Mise en évidence de la « side population » par l'inhibition des transporteurs de type « ABC »**

Les cellules cancéreuses sont incubées avec le marqueur fluorescent Hoechst et en présence ou en absence d'un inhibiteur des transporteurs de type « ABC », le vérapamil. En comparant les deux « dot plot », on peut observer une population cellulaire spécifique (la « side population » ayant la capacité à exclure le Hoechst, cette population n'apparaissant plus lorsque l'on inhibe les transporteurs « ABC » D'après Hirschmann-Jax et al., 2004

#### **I.2.2.2.4. Hypoxie**

Dans une tumeur, il a été montré que toutes les cellules n'ont pas le même apport en O<sub>2</sub>, en effet, certaines zones tumorales sont largement hypoxiques. Il est établi que l'hypoxie influence le comportement des cellules souche saines et cancéreuses. Par exemple, inhiber HIF-1 $\pm$  ou HIF-2 $\pm$  conduit à un défaut de production des cellules souche hématopoïétiques. (Adelman et al., 1999) De plus, comme évoqué avant, l'activation des facteurs HIF favorise l'expression des gènes impliqués dans les programmes spécifiques des CS tels qu'Oct4, Klf4 et Sox2 dans des cellules de cancer des poumons. (Iida et al., 2012) Il a été également montré que dans les gliomes, l'hypoxie via HIF1 $\pm$  augmente le nombre de cellules CD133+. (Soeda et al., 2009) Dans le cancer du sein, il a été mis en évidence que l'hypoxie permet l'augmentation du nombre de cellules ayant la capacité de former des sphères, mais également le nombre de cellules ayant une activité ALDH1 élevée. (Iriando et al., 2015)

D'autre part, les CSC possèdent des caractéristiques qui leur permettent de répondre différemment au manque d'O<sub>2</sub>. Ainsi, la réponse UPR (Unfolded Protein Response) est inhibée dans les CSC ce qui empêche le stress hypoxique d'activer ce processus pour induire l'apoptose. (Bi et al., 2005) Il a été montré que dans les CSC, l'inhibition de la réponse UPR est d'ailleurs associée à une augmentation de la croissance tumorale. Les facteurs HIF permettent également l'activation de voies de signalisation comme la voie Notch qui jouent un rôle dans le maintien du phénotype de cellule souche. (Gustafsson et al., 2005)

Les CSC sont donc capables de détourner des voies métaboliques diverses pour favoriser la croissance tumorale et maintenir leurs caractéristiques. Les marqueurs métaboliques présentent donc un intérêt thérapeutique pour cibler spécifiquement les CSC. Cependant les mécanismes mis en jeu sont également importants dans les cellules souche normales et pourraient être altérées de façon irréversible chez les patients traités. Il serait donc intéressant de mettre en évidence des cibles plus spécifiques des CSC.

#### ***I.2.2.3. Signalisation et CSC***

Les CSC sont caractérisées par un programme épigénétique et génique qui semble dépendre d'une signalisation et de facteurs de transcription qui contrôlent le maintien de la pluri potentialité et le renouvellement des cellules souches embryonnaires. Notamment, les

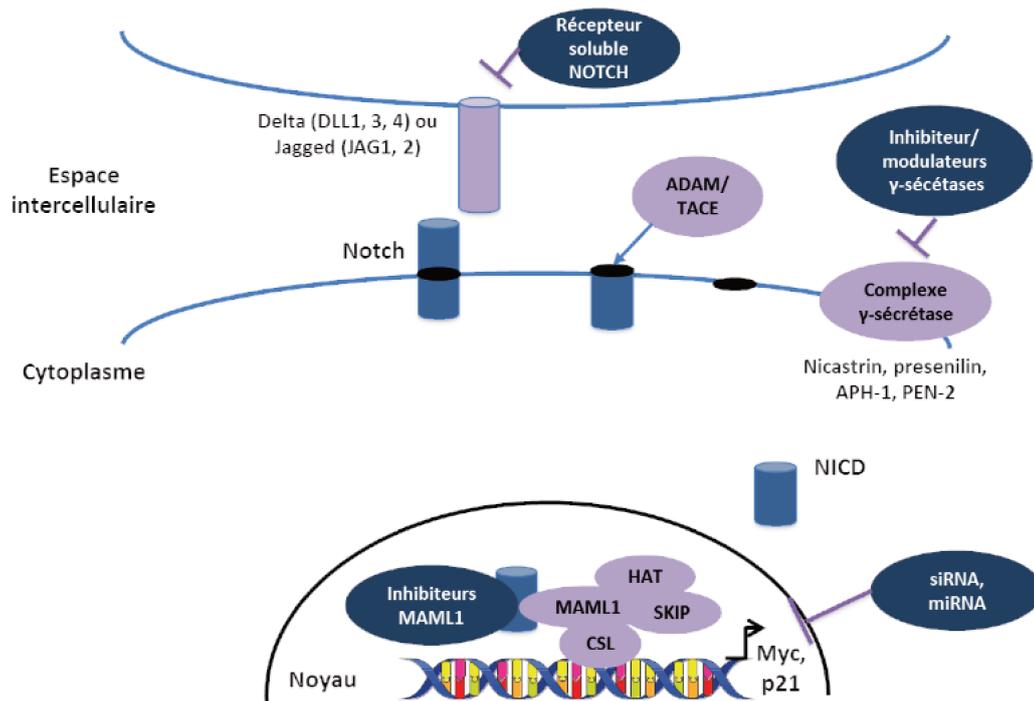
signalisations induites par les facteurs Hedgehog et Notch semblent jouer des rôles clé dans les CSC. (Takebe et al., 2011)

#### I.2.2.3.1. Signalisation Notch

Le signal Notch est initié par la liaison d'un ligand transmembranaire au récepteur Notch d'une cellule adjacente. Cette liaison entraîne la libération de l' $\gamma$ -sécrétase. Cette enzyme, responsable du clivage protéolytique du récepteur Notch, produit le fragment cytosolique NICD25 (Zhu et al., 2012). Le NICD est transloqué dans le noyau où il interagit avec le facteur transcriptionnel CBF1 qui active, à son tour, les gènes *HES* et *HEY*. Chez les vertébrés, il existe au moins 4 récepteurs Notch, 5 ligands (*JAG1*, *JAG 2*, *DLL1*, *DLL3*, *DLL4*) et des molécules effectrices telles que *HES1-6* ; *HEY1*. (Figure 17)

Une mutation Notch a été mise en évidence chez la drosophile au début du XXe siècle. La perte totale des fonctions de Notch entraînait un phénotype embryonnaire létal, caractérisé par une surproduction de neurones (Poulson, 1937). En effet, le signal Notch régule l'auto renouvellement et la différenciation des cellules souches neurales normales (Fan, 2010). Durant le développement, l'activité du signal Notch des cellules exprimant le ligand diminue, tandis que celle des cellules exprimant le récepteur Notch augmente. Généralement, les cellules responsables de l'envoi du signal subissent une différenciation. Au contraire, les cellules recevant le signal restent dans un état indifférencié. Ce phénomène est appelé spécification latérale.

Il a été montré que des inhibiteurs du complexe enzymatique de la  $\gamma$ -sécrétase (IGS (Inhibitors of the Gamma Secretase) ou un anticorps monoclonal anti-Notch4 permettent de supprimer la croissance des CSC issues de cancers mammaires (Farnie, 2007). De même, l'inhibition de Notch supprime sélectivement les CSC issues de médulloblastomes (Fan et al., 2006). De plus, un traitement avec des IGS ou la suppression de Notch-1 ou -2 augmentent la mort cellulaire induite par irradiation spécifiquement dans des CSC de gliome, mais pas dans la tumeur entière (Wang et al., 2011). Le rôle de Notch coopérant avec STAT3 et le TGF $\beta$  pour la maintenance des CSC a été mis en évidence dans d'autres types de cancers, notamment dans les carcinomes hépatiques. (Hoey et al., 2009)



**Figure 17 : Inhibition de la signalisation Notch impliquée dans le maintien des cellules souche cancéreuses**

A-Signalisation par Notch : l'activation de Notch est induite par la liaison de ligands membranaires (Delta ou Jagged) lors des contacts cellule-cellule. Après internalisation et protéolyse de l'hétérodimère Notch (par les complexes ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase) et  $\gamma$ -sécrétase), un fragment soluble (NICD (Notch intracellular domain)) est libéré dans le cytoplasme. NICD passe dans le noyau où il sert d'activateur de la transcription des gènes cibles de Notch tel que Myc et p21. Cette figure présente les inhibiteurs potentiels de l'activité de Notch. *D'après Takebe et coll., 2011*

#### I.2.2.3.2. Signalisation HedgeHog

Dans les cellules souche, la voie de signalisation Hedgehog est initiée par l'un de ses trois ligands Sonic Hedgehog (SHh), Desert Hedgehog (Dhh) ou Indian Hedgehog (Ihh), se fixant au récepteur PTCH. En l'absence de ligand, le récepteur membranaire inhibe la protéine SMO. La liaison du ligand au récepteur PTCH lève cette inhibition, conduisant ainsi à l'activation des facteurs de transcription Gli1, Gli2 et Gli3. Gli1 agit comme un activateur transcriptionnel à l'inverse de Gli3 qui agit comme un répresseur transcriptionnel. Quant à Gli2, il peut activer ou réprimer un gène en fonction des modifications post-transcriptionnelles et post-traductionnelles. Cette voie de signalisation induit la sécrétion de facteurs de croissance cellulaire tels l'IGF2 et le VEGF. (Olive et al., 2010) La protéine Hedgehog est impliquée dans la polarisation des segments lors du développement

embryonnaire. Elle régule la prolifération, la migration et la différenciation cellulaires de nombreuses espèces. (Choy & Cheng, 2012)

Des études ont montré que des dérégulations de la signalisation Hedgehog sont impliquées dans beaucoup de tumeurs humaines incluant le glioblastome, les cancers mammaire et pancréatique et la leucémie myéloïde chronique (LMC). (Chu et al., 2014; Ko et al., 2015)

Dans les CSC, des travaux ont mis en évidence que l'inhibition de la voie par le dysfonctionnement de SMO inhibe l'expression de la protéine de fusion BCR-ABL exprimée dans les LMC. (Dierks et al., 2008) De plus, des antagonistes de la protéine SMO tels que la cyclopamine et 5E1 inhibent l'auto-renouvellement et induit la différenciation terminale des cellules. Le signal Hedgehog active la voie PI3K/ AKT, particulièrement dans le cycle cellulaire et la survie (Merchant, 2010).

La modification de voies de signalisation peut donc être un moyen d'identifier des CSC. Cependant ses voies sont activées dans plusieurs types cellulaires et il est difficile de concevoir des traitements ciblant ces voies dans les CSC sans affecter les cellules saines.

#### ***1.2.2.4. Régulation épigénétique***

Selon Riggs & Porter, les mécanismes épigénétiques sont "*des changements dans l'expression des gènes qui sont héréditaires lors de la mitose et/ou de la méiose, et qui ne résultent pas de modifications de la séquence de l'ADN*". Ces mécanismes incluent

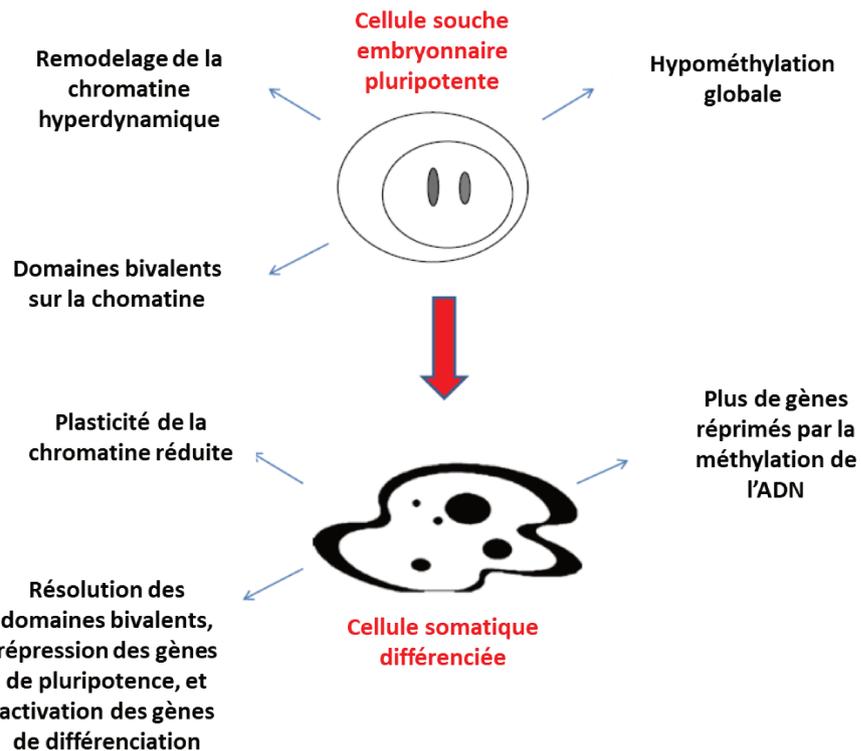
- des méthylations de l'ADN par les enzymes de type DNMT (DNA-MethylTransferase) qui assurent soit le maintien du profil épigénétique au cours des divisions cellulaires soit la répression ou l'induction de l'expression de gènes de différenciation.
- des modifications post-traductionnelles de la queue des histones. Les histones sont des petites protéines, riches en acides aminés basiques, responsables de la modulation de l'ADN. Elles forment un complexe octamérique autour duquel s'enroule le brin d'ADN pour former le nucléosome, unité de base du matériel génétique (Li, 2002). Il existe 5 familles d'histones : H1, H2A, H2B, H3 et H4. L'extrémité amino-terminale de la queue des histones subie des modifications post-traductionnelles dont les plus étudiées sont la méthylation, l'acétylation,

la phosphorylation, l'ubiquitination et la sumoylation. Ces modifications modulent l'expression des gènes soit directement soit par recrutement de complexes protéique ou enzymatique (Bannister & Kouzarides, 2011). Cependant, des variants d'histones, codés par d'autres gènes que les histones classiques peuvent s'associer à l'ADN et ainsi permettre la répression de la transcription des gènes associés à ces variants d'histones.

- l'intervention des long non-coding RNA (lncRNA) et de miRNAs

Dans les cellules souche embryonnaires (CSE), la régulation épigénétique joue un rôle important pour favoriser l'accès des facteurs de transcription aux différents gènes de différenciation au cours du développement embryonnaire.

Il a été montré que 76% des îlots CpG sont méthylés dans les CSE, mais la méthylation globale est plus faible que dans les cellules différenciées. En effet, la méthylation de l'ADN est restreinte à des zones principalement impliquées dans la différenciation cellulaire. (Armstrong, 2012) Ainsi, les gènes impliqués dans la différenciation sont spécifiquement réprimés. Cela contribue au maintien de la pluripotence. (Weber et al., 2007) les CSE présentent des séquences d'ADN liées à l'histone H3 comportant une acétylation ou une méthylation de la lysine 4 de (H3K4me), une marque d'activation de la transcription ainsi que des triples méthylations de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me) qui est une marque répressive de transcription. Ces régions de la chromatine sont appelées « domaines bivalents ». Elles sont fréquentes dans les régions des gènes impliqués dans la différenciation cellulaire. Au cours de la différenciation cellulaire, la déméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 dans les régions promotrice des gènes de différenciation permet l'expression des gènes de différenciation. (Szutorisz et al., 2005) (Figure 18)



**Figure 18: Schéma récapitulatif de la régulation épigénétique dans les cellules souche embryonnaires et des cellules différenciées**

*D'après Armstrong, 2012*

Il a été montré que certaines cellules cancéreuses possèdent des signatures épigénétiques similaires aux cellules souche embryonnaires, ce qui laisse penser que les régulations épigénétiques pourraient jouer un rôle dans le renouvellement, la croissance tumorale et/ou la hiérarchie cellulaire au sein des tumeurs. (Stergachis et al., 2013)

De plus, les membres du Cancer Genome Atlas Research Network ont identifié des mutations récurrentes du gène DNMT3, ainsi que des modifications de méthylation sur les gènes IDH1 et 2 chez la majorité des patients atteints de leucémies myéloïdes aiguës. Leurs résultats suggèrent que des changements épigénétiques pourraient être à l'origine du développement des leucémies myéloïdes aiguës. (Cancer Genome Atlas Research Network, 2013) Les recherches de Lu et coll., ont confirmé que DNMT3 jouait un rôle important dans l'initiation des cancers hématologiques, en effet la substitution de l'Arginine par une histidine en position 882 de la protéine DNMT3 est une mutation fréquemment observée. Pour étudier le rôle de cette mutation, ils ont introduit cette mutation dans des cellules souche hématopoïétiques murine, soit seule, soit associée avec une seconde mutation telle qu'une mutation du gène IDH1. Leurs résultats montrent que la mutation de DNMT3 seule

est capable d'initier la transformation des cellules souche hématopoïétiques en cellules malignes et que la mutation DNMT3 couplée à une autre mutation est capable d'initier le développement d'une leucémie myéloïde aigue chez la souris. (Lu et al., 2016). De plus des souris irradiées puis transplantées avec des cellules DNMT3 Ko développent toutes des cancers hématopoïétiques. (Mayle et al., 2015)

D'autre part, la méthylase EZH2 est surexprimé dans de nombreux types de cancer tels que le cancer de la prostate, du sein ou de la vessie (Crea et al., 2012; Tan et al., 2014). Et son expression est associée à un mauvais pronostic, à la formation de métastases, à la chimiorésistance et à l'agressivité de la tumeur. (Tan et al., 2014). Dans les cancers du sein, la surexpression d'EZH2, entraîne une activation du promoteur de Notch1 et entraîne une augmentation du nombre de cellules ayant une forte activité ALDH1 et capables de former des sphères in vitro. De plus in vivo la surexpression d'EZH2 entraîne une augmentation du nombre de cellules CD44+, CD24-. Ce qui suggère que la surexpression d'EZH2 permet d'augmenter le nombre de cellules initiatrices de tumeurs dans les cancers du sein. (Gonzalez et al., 2014) Au contraire, dans les glioblastomes, il a été montré que l'inhibition d'EZH2 réduisait le nombre de cellules capables de former des sphères in vitro et retardait la croissance tumorale in vivo. (Suvà et al., 2009)

Ainsi des modifications des histones semblent jouer un rôle dans le maintien du pool de cellules souche cancéreuses.

Certains mécanismes épigénétiques sont apparus comme des cibles thérapeutiques potentielles pour favoriser la différenciation cellulaire dans les cancers. Par exemple les di- et tri-méthylation de la lysine 27 de l'histone 3 (H3K27me2 et H3K27me3) dans les régions promotrices des gènes sont associées à la répression génique. Cette triple méthylation permettant la répression de l'expression de nombreux gènes, notamment des gènes comme Sox2 et CD133, ce qui a pour effet de diminuer le nombre de cellules CD133+ dans les gliomes. (Tao et al., 2014)

Il a également été montré que l'hypo méthylation de la lysine 4 de l'Histone H3 entraînait une différenciation des cellules souche leucémique via l'histone déméthylase KDM5B. (Wong et al., 2015)

L'ensemble des études ci-dessus suggèrent que les régulations épigénétiques dans les cellules souche cancéreuses peuvent jouer un rôle important dans le maintien de la population de CSC au sein des tumeurs, mais également dans l'établissement de la hiérarchie cellulaire au sein des tumeurs en réprimant les gènes impliqués dans le phénotype de CSC.

Actuellement, plusieurs « épidroques » sont en cours d'essais cliniques ou déjà utilisés en compléments des traitements classiques. Sont testés notamment des inhibiteurs de la méthylase EZH2, des inhibiteurs de déméthylase, des inhibiteurs de HDAC ou de DNMT.

### **I.2.3. Cellules souche et sarcomes osseux**

Etant donné l'intérêt à cibler des CSC pour contrôler le développement tumoral, il est important de trouver des marqueurs fonctionnels et de comprendre les mécanismes de régulations de ces CSC dans les différents types de cancers. Si la présence de CSC est bien documentée dans les tumeurs hématopoïétiques et dans les cancers épithéliaux, dans les sarcomes en général, et dans les sarcomes osseux la présence de CSC est peu documentée.

#### ***I.2.3.1. Chondrosarcomes***

Le développement des chondrosarcomes comprend une phase pendant laquelle les cellules tumorales ont une faible malignité puis une évolution vers des stades plus agressifs qui sont associés à des altérations géniques comme celle qui altère *p53*. Ces données pourraient être en faveur d'un développement tumoral impliquant l'apparition de CSC comme dans le modèle proposé par Valent et coll.,. De plus, le marqueur de surface, CD133, a permis d'identifier des cellules de chondrosarcome ayant des capacités à former des sphères, qui expriment des facteurs de transcriptions de cellules souche embryonnaires (Nanog, Oct4, Sox2), et qui sont capables de reformer une tumeur après une xénogreffe chez la souris. (Tirino et al., 2011)

#### ***I.2.3.2. Sarcomes d'Ewing***

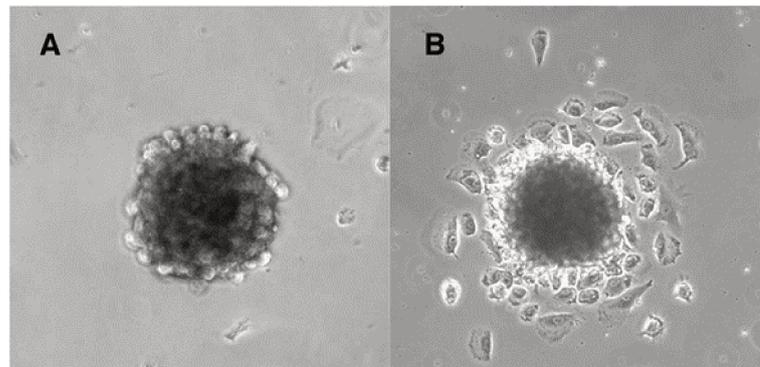
Dans les sarcomes d'Ewing, plusieurs auteurs ont montré la présence de cellules ayant des caractéristiques de cellules souche cancéreuses. Notamment, Suvà et coll., qui en séparant deux populations de cellules (CD133+ et CD133-) ont montré que seules les cellules CD133+ sont capables de former des tumeurs après implantation chez la souris NOD/SCID.

(Suva et al., 2009) Cornaz-Buros et coll., ont également utilisé le marqueur de surface CD133+ pour mettre en évidence des cellules souche cancéreuses dans les sarcomes d'Ewing. Dans le même article, ils montrent également que des cellules issues de tumeurs primaires humaines cultivées en sphères expriment des gènes associés aux cellules souche tels que Nanog et Oct4. (Cornaz-Buros et al., 2014) Yang et coll., ont également montrés que des cellules de sarcome d'Ewing peuvent être isolées de par leurs capacités à exclure le Hoechst. Ces cellules appartenant à la « side population », sont plus invasives, plus résistantes aux traitements grâce à une surexpression du transporteur ABCG2 et capables de recréer l'hétérogénéité de la tumeur. (Yang et al., 2010) De même, une autre équipe a mis en évidence une population cellulaire ayant une activité ALDH1 élevée, cette population cellulaire, exprime le facteur de transcription Nanog, et est plus tumorigène in vivo. De plus cette population devient plus sensible aux traitements de chimiothérapies lorsque la protéine de fusion EWS-FLI1 est inhibée. Ces résultats montrent qu'il existe une population cellulaire ayant des caractéristiques de CSC dans les sarcomes d'Ewing, et qu'une part de leur caractère souche est liée à la protéine de fusion EWS-FLI1. (Awad et al., 2010) De plus, il a été montré qu'une lignée cellulaire de sarcome d'Ewing peut être reprogrammée avec le même programme utilisé pour obtenir des iPS. Les cellules reprogrammées expriment de la même façon le facteur chimérique EWS-FLI1 mais ont une chimiorésistance accrue. Ces cellules peuvent aussi être « redifférenciées » en ciblant des voies de signalisation tels que PI3K/AKT/mTor et MAPK/ERK ce qui permet de resensibiliser les iPS. (Moore et al., 2015) Ainsi les cellules d'Ewing peuvent acquérir un caractère plus agressif en adoptant un phénotype de cellules souche.

### ***1.2.3.3. Ostéosarcomes***

Dans les ostéosarcomes les recherches concernant les cellules souche cancéreuses ont été initiées par Gibbs et coll., Cette équipe a isolé des cellules capables de se renouveler et de former des clones sphériques sur des supports non adhésifs et en absence de sérum, à partir d'ostéosarcomes obtenus chez des patients non traités et à partir de la lignée cellulaire MG63. (Gibbs et al., 2005a) (Figure 19) De plus, Zhang et coll., ont montré que lorsque les sphères sont cultivées en présence de facteurs de croissances permettant la différenciation en ostéoblastes, en chondrocyte ou en adipocyte, on parvient à obtenir les

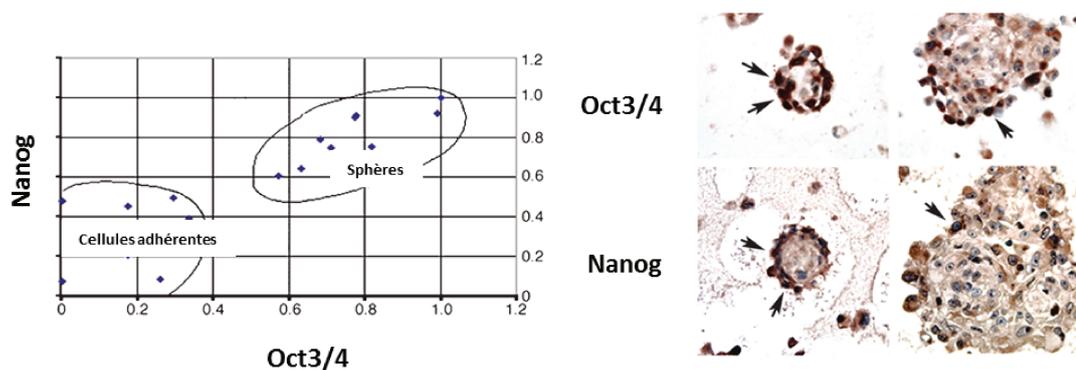
trois types cellulaires ce qui montre la multipotence des cellules formant des sphères. (Zhang et al., 2013)



**Figure 19 : Formation de sphères à partir de cellules issues d'un ostéosarcome primaire**

- (A) Sphères obtenues à partir de cellules d'une tumeur primaire, les cellules sont cultivées sur un support non adhérent et dans un milieu ne contenant pas de facteurs de croissance.
- (B) Lorsque les sphères sont remises sur un support non adhérent, les cellules qu'elles contiennent sont capables de réadhérer.

Depuis, des cellules ayant des caractéristiques de CSC ont été isolées à partir de différentes lignées cellulaires. Comme attendu, une population cellulaire particulière a été caractérisée par sa faculté à exclure le Hoechst 33342 à partir de tumeurs humaines. (Yang et al., 2011) En effet, les CSC dérivées des ostéosarcomes présentent une forte expression du transporteur ABCG2. Des CSC ont également été identifiées dans des lignées cellulaires sélectionnées par un agent de chimiothérapie. (Tonami et al., 2011) Certains auteurs ont pu isoler une population cellulaire ayant des propriétés de CSC grâce à des marqueurs de surface tels que Stro-1 et CD117. (Adhikari et al., 2010) Les CSC isolées d'ostéosarcome expriment également Oct4, Nanog, Stat3 et Sox2. (Figure 20) (Gibbs et al., 2005a; Tonami et al., 2011) Les cellules CD133<sup>+</sup> dans les tumeurs solides possèdent également des caractéristiques de CSC. (Tirino et al., 2008) Pourtant il est à noter que les CSC isolées par leur capacité à exclure le Hoechst n'expriment pas différemment les marqueurs CD133, CD117 ou CD44 par rapport aux autres cellules tumorales. Ce résultat souligne bien le besoin de trouver des marqueurs spécifiques qui soient non seulement des marqueurs de reconnaissance, mais également des marqueurs fonctionnels. (Brown, Tellez-Gabriel, & Heymann, 2017)



**Figure 20 : Immunohistochimie Nanog et Oct3/4 sur des cellules adhérentes ou des sphères obtenues à partir de biopsies de 5 ostéosarcomes**

Les sphères obtenues à partir des biopsies d'ostéosarcomes expriment plus les facteurs de transcriptions Nanog et Oct3/4 connus pour réguler le phénotype de cellule souche embryonnaire que les cellules cultivées sur un support adhérent.

Actuellement, un effort important est consacré à la compréhension des mécanismes régulant ces CSC pour pouvoir les cibler et améliorer les traitements. Notamment une étude de Lee et coll., a montré que les facteurs de transcriptions Oct4 et Nanog sont très importants dans le maintien du phénotype de CSC dans l'ostéosarcome mais également que les gènes MDR1 et DHFR sont impliqués dans la résistance des CSC d'ostéosarcomes. (Lee et al., 2017) De même Zou et coll., ont montré qu'un micro ARN le miR-34a était sous exprimé dans les ostéosarcomes, ce micro ARN a pour fonction d'inhiber Sox2 et la restauration de son expression dans les CSC d'ostéosarcome permet de diminuer le nombre de cellules capable de former des sphères et de diminuer la tumorigénicité des cellules U2OS. (Zou et al., 2017)

En résumé, les critères retenus pour qualifier des cellules des sarcomes osseux de CSC sont leur capacité à former des sphères en culture et à être plus tumorigènes *in vivo*. (Gibbs et al., 2005) Mais les données disponibles ne montrent de façon définitive une organisation hiérarchique des tumeurs à partir de cellule souche. La principale difficulté est le manque de spécificité des marqueurs utilisés. Finalement jusqu'à présent on n'a pas mis en évidence de cibles thérapeutiques spécifiques des CSC des sarcomes. (Fujiwara & Ozaki, 2016)

Etant donné le lien attendu entre les CSC et la malignité des cellules tumorales, nous avons émis l'hypothèse que des facteurs impliqués dans la chimiorésistance ou la progression métastatique pouvaient être des marqueurs potentiels de CSC. Ainsi, nous nous

sommes intéressés au cours de ce travail à une calpaïne atypique encore très peu étudiée, la calpaïne-6.

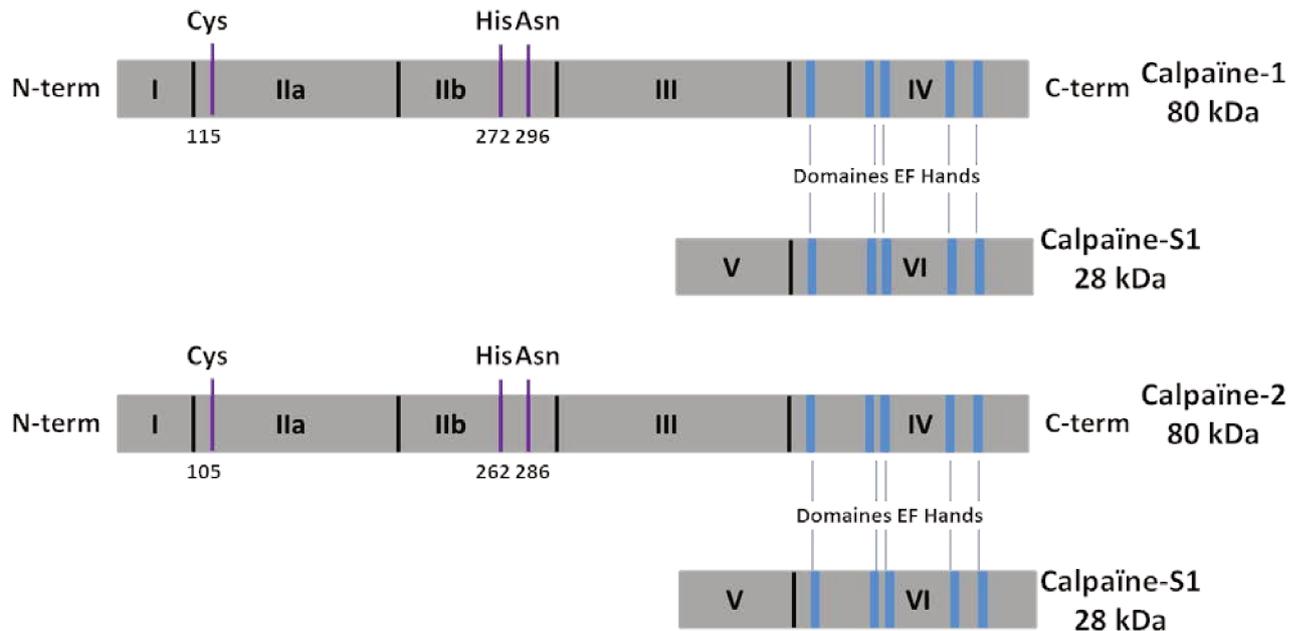
### **I.3. Généralités sur les calpaïnes**

Les calpaïnes forment une famille de protéases intracellulaires, dépendantes du calcium. Quinze isoformes de calpaïnes ont été décrites chez les mammifères selon leur expression (ubiquitaire ou localisée) ou selon la présence de motifs protéiques spécifiques appelés EF-Hands qui sont capables de lier les ions calcium. (Ludovic Leloup and Alan Wells, 2010)

#### **I.3.1. Structure**

Les calpaïnes ubiquitaires ou typiques sont composées d'une sous unité catalytique composée de 4 domaines fonctionnels (I à IV). Le domaine I, situé en N-terminal, est clivé par autolyse lorsque les calpaïnes sont activées par le calcium. Le domaine II ou domaine catalytique, est divisé en deux sous domaines par le sillon du site actif dépendant de trois résidus (cystéine, histidine et asparagine). Le domaine III est un domaine de régulation impliqué dans le changement de conformation lors de l'activation de l'enzyme et contient des sites de phosphorylation et de liaison aux phospholipides. Enfin, le domaine IV contient cinq motifs EF hand qui permettent la liaison au calcium et l'activation des calpaïnes. (Storr et al., 2011)

Les calpaïnes 1 et 2 peuvent s'associer à une sous unité régulatrice la calpaïne S1 et ainsi former des hétérodimères. Cette dernière étant composée de deux domaines (V et VI). (Figure 21 ) (Storr et al., 2011)



**Figure 21: Structure des calpaïnes ubiquitaires**

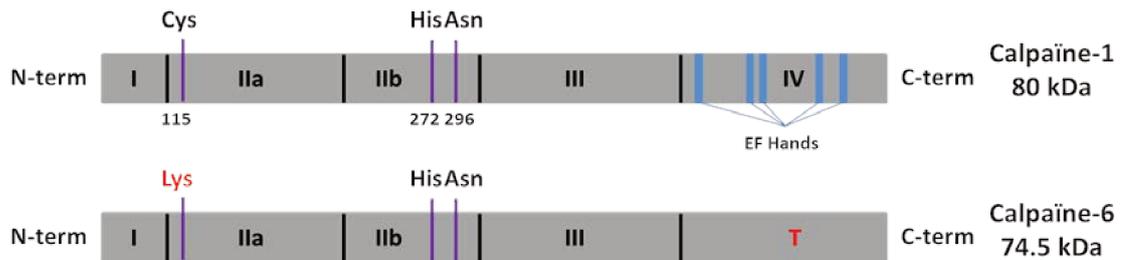
La calpaïne-1 et la calpaïne-2 sont des sous unités catalytiques de 80kDa qui contiennent les domaines protéases ainsi que le domaine IV constitué de domaines EF-Hands. La calpaïne S1 est une sous unité régulatrice de 28kDa qui s'associe à la calpaïne-1 ou la calpaïne-2 pour former un hétérodimère. *D'après Ludovic Leloup et al., 2010*

## I.4. La calpaïne-6

Bien que le système des calpaïnes classiques soit le mieux décrit, plusieurs autres calpaïnes, comme la calpaïne-6, sont exprimées de façon plus spécifique dans certains tissus.

### I.4.1. Structure

Le gène de la calpaïne-6 (*CAPN6*) aussi appelé *CAPNX* ou *Calpamoduline* est situé sur le chromosome X en position q23. La calpaïne-6 est une calpaïne atypique, car le résidu cystéine du site actif est remplacé par une lysine chez l'homme (Figure 22). Cette différence laisse supposer que la calpaïne-6 ne possède pas d'activité protéolytique (Dear et al., 1997). Une autre caractéristique qui différencie la calpaïne-6 des calpaïnes classiques est la région C terminale, celle-ci ne possède pas d'homologie avec le domaine IV des calpaïnes classiques et ne possède pas de domaine *EF-hand*. Cela suggère que la calpaïne-6 n'est pas capable de lier le calcium. Ce domaine est appelé soit domaine T parce qu'il présente une homologie avec *Caenorhabditis elegans*, soit domaine C2 parce qu'il est comparable aux domaines C2 des Protéine Kinase C (PKC) (Croall & Ersfeld, 2007).



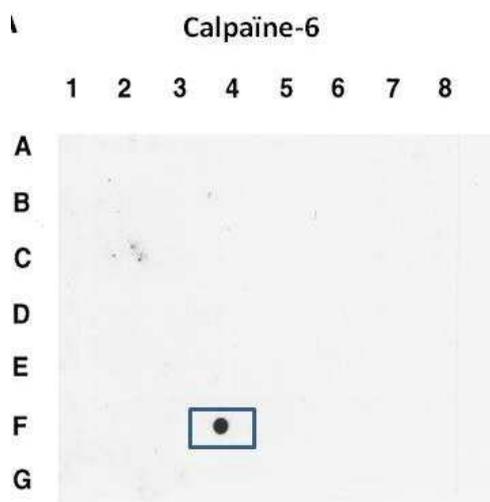
**Figure 22 : Comparaison de la structure de la calpaïne-6 avec une calpaïne classique, la calpaïne-1**

La calpaïne-1 est une calpaïne classique, elle possède 4 domaines, le domaine I, pro-domaine, le domaine II qui est le domaine catalytique, et les domaines III et IV qui sont des domaines d'interaction avec le calcium et divers partenaires moléculaires via les EF hands.

La calpaïne-6 a une structure similaire à celle des calpaïnes classiques mais le résidu cystéine (115) du site actif est remplacé par une lysine. Une autre caractéristique qui différencie la calpaïne-6 des calpaïnes classiques est la région C terminale, celle-ci ne possède pas d'homologie avec le domaine IV des calpaïnes classiques et ne possède pas de domaine *EF-hand*. D'après Croall & Ersfeld, 2007

#### I.4.2. Expression

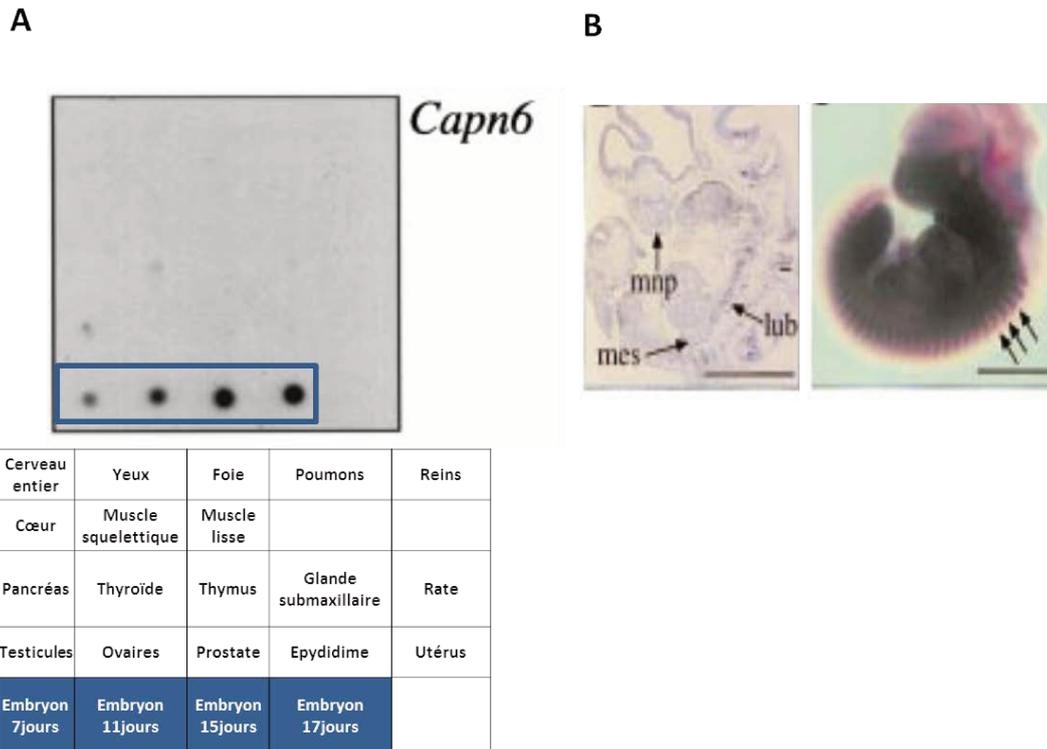
La calpaïne-6 possède une distribution plus restreinte que les calpaïnes classiques. Initialement la calpaïne-6 a été mise en évidence dans le placenta chez l'Homme (Figure 23) et dans les ébauches des membres, au niveau de l'arc pharyngé et du muscle cardiaque au cours du développement chez la souris. (Figure 24) (Dear et al., 1997; Dear & Boehm, 1999)



	1	2	3	4	5	6	7	8
A	Cerveau entier	Amygdale	Noyau caudé	Cervelet	Cortex cérébral	Lobe frontal	Hippocampe	Bulbe rachidien
B	Lobe occipital	Putamen	Locus niger	Lobe temporal	Thalamus	Noyau subthalamique	Moelle épinière	
C	Cœur	Aorte	Muscle squelettique	Côlon	Vessie	Utérus	Prostate	Estomac
D	Testicules	Ovaires	Pancreas	Glande pituitaire	Glandes surrénales	Thyroïde	Glandes salivaires	Glandes mammaires
E	reins	Foie	Petit intestin	Rate	Thymus	Leucocyte	Nœud lymphatique	Moelle osseuse
F	Appendice	Poumons	Trachée	Placenta				
G	Cerveau foetal	Cœur foetal	Rein foetal	Foie foetal	Rate foetale	Thymus foetal	Poumons foetal	

**Figure 23: Expression de la calpaïne-6 dans 50 tissus humains**

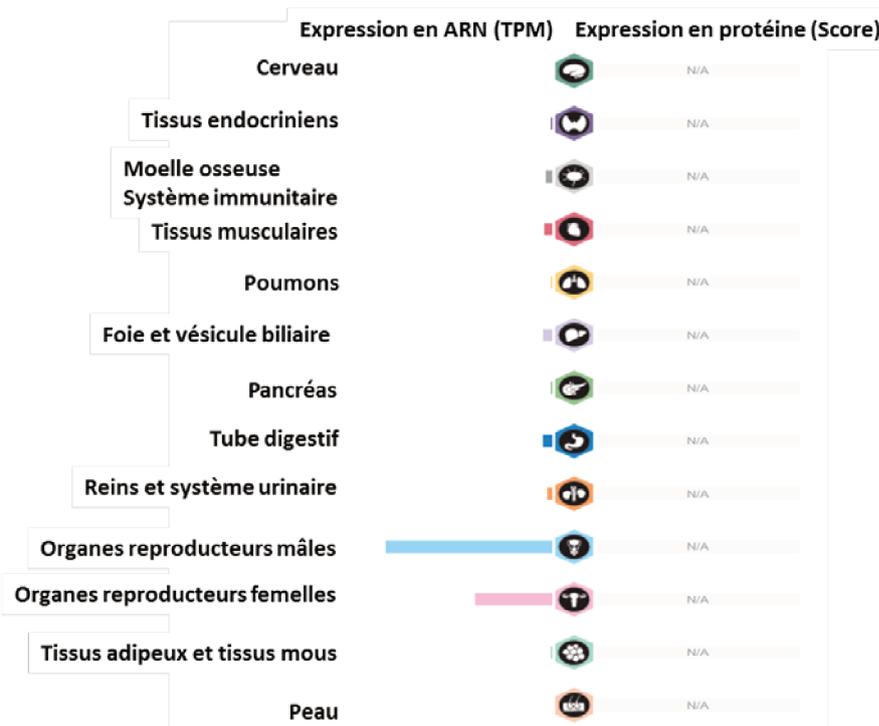
Northern Blot montrant l'expression de la calpaïne-6 dans 50 tissus humains. L'emplacement précis des différents ARN sur la membrane est montré dans le tableau. *D'après Dear et al., 1997*



**Figure 24: Expression de la calpaïne-6 chez la souris**

- (A) Northern Blot montrant l'expression de la calpaïne-6 dans différents tissus murins. L'emplacement précis des différents ARN sur la membrane est montré dans le tableau
- (B) Hybridation in situ de la calpaïne-6 chez l'embryon de souris, la première photo montre une coupe sagittale (mnp : museau en formation, lub : bourgeon pulmonaire, mes : mésonéphros), la deuxième photo montre un montage in toto, les flèches indiquant les somites. *D'après Dear & Boehm, 1999*

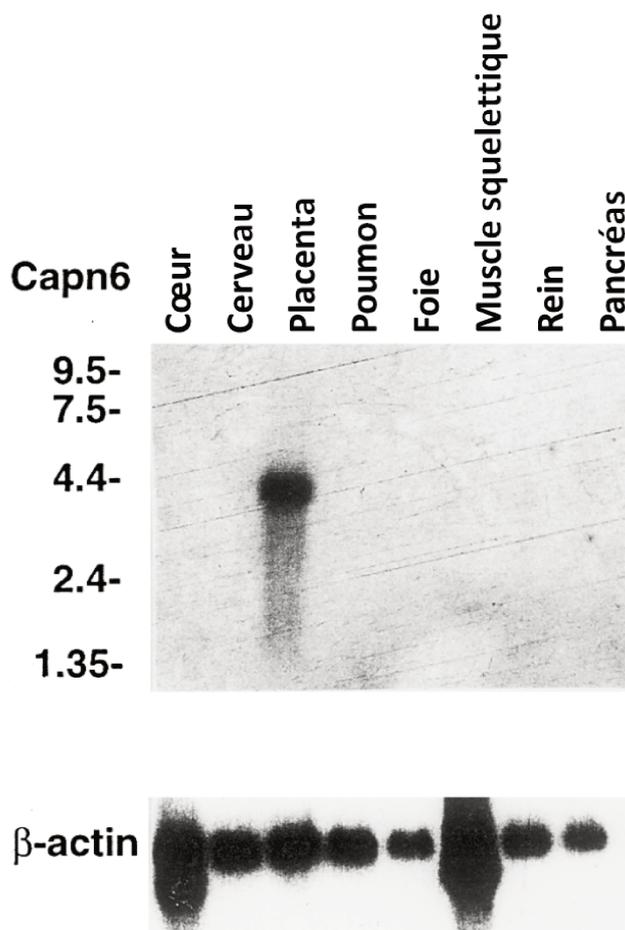
Actuellement, les bases de données telles que GTEx ou Protein Atlas montrent une expression de la calpaïne-6 dans certains tissus humains tels que les organes reproducteurs mâles et femelles chez l'humain. (Figure 25) Cependant ces bases de données sont principalement basées sur l'expression en ARN et ne montrent pas d'expression de la protéine. De plus, dans les tissus sains notamment l'utérus, l'expression de la protéine n'a pas été mise en évidence.



**Figure 25: Expression de la calpaïne-6 chez l'homme dans les bases de données**

Les différentes bases de données génomiques montrent une expression en ARN de la calpaïne dans certains tissus, notamment les organes reproducteurs mâles et femelles, cependant, l'expression protéique de la calpaïne-6 n'est pas mise en évidence dans ces tissus. *D'après [www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org)*

Dear et coll., ont montré que l'expression de la calpaïne-6 diminue fortement et rapidement après la naissance chez l'Homme. Ainsi son expression est extrêmement faible dans les cellules normales adultes. (Figure 26) (Dear et al., 1997) Chez la souris, l'expression de la calpaïne-6 pourrait être moins restreinte après la naissance, mais elle a été détectée surtout dans des conditions pathologiques ou dans des cultures cellulaires. Ainsi, la calpaïne-6 peut être induite dans des macrophages dans un contexte inflammatoire (Miyazaki et al., 2016).



**Figure 26: Expression de la calpaïne-6 dans des tissus humains après la naissance**

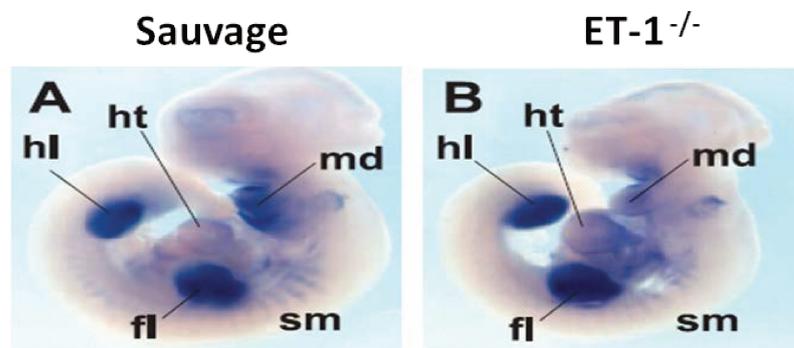
Northern Blot montrant l'expression de la calpaïne-6 dans différents tissus humains après la naissance. D'après Dear et al., 1997

Finalement après la naissance, la calpaïne n'est pas ou plus exprimée mais son expression peut être retrouvée dans certaines cellules cancéreuses. Ainsi, elle a été mise en évidence dans des cellules de tumeurs utérines ou hépatiques (Liu et al., 2015; Skubitz & Skubitz, 2003; Lee SJ, 2003). Nous avons également mis en évidence cette protéine dans des cellules d'ostéosarcome. (Marion et al., 2012) Dans les cellules tumorales la calpaïne-6 est présente au niveau nucléaire et cytoplasmique. Cette localisation nucléaire semble être un autre élément qui la distingue des calpaïnes classiques qui sont majoritairement présentes dans le cytoplasme et à la membrane plasmique. (Lee et al., 2008).

### I.4.3. Régulation de l'expression

La calpaïne-6 a été mise en évidence comme une cible de la signalisation induite par l'endothéline 1 (ET-1). (Tonami et al., 2007) Ces auteurs ont montré que l'expression de la

calpaïne-6 est supprimée spécifiquement dans la mandibule au cours du développement chez des souris *ET-1*<sup>-/-</sup>. (Figure 27)

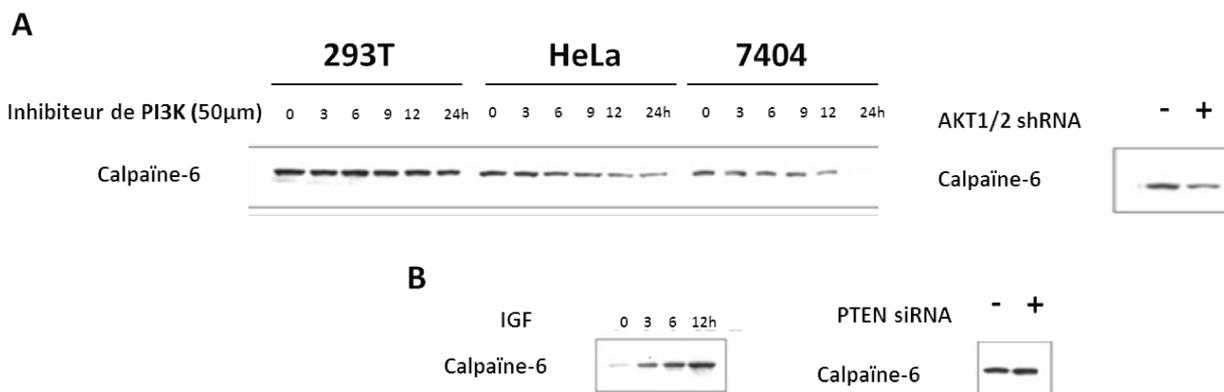


**Figure 27: L'expression de la calpaïne-6 dans la mandibule est dépendante de l'ET-1 chez la souris**

(A) et (B) Montage in toto d'embryons de souris sauvage ou *ET-1*<sup>-/-</sup>; on peut observer que la calpaïne-6 est exprimée dans le cœur et les bourgeons des membres (cartilage) chez la souris sauvage. L'expression de la calpaïne-6 est diminuée spécifiquement dans les ébauches cartilagineuses de la souris *ET-1*<sup>-/-</sup> (B). (ht : heart, hl : bourgeon des pattes postérieures, md : mandibule, sm : somites, fl : bourgeon des membres antérieurs) D'après Tonami et al., 2007

Une autre étude de notre laboratoire a confirmé que l'expression de la calpaïne-6 est modulée par l'ET-1 dans des cellules d'ostéosarcome, cette cytokine induisant les voies de signalisation impliquant ERK1/2, PI3K/AKT et NFκB. (Marion et al., 2012) Ce travail avait également montré que cette signalisation et l'expression de la calpaïne-6 est contrôlée par un protéoglycane de surface, le syndécan-2.

Ces résultats étaient cohérents avec ceux de Liu et coll., qui avaient utilisé différentes lignées cancéreuses et des fibroblastes embryonnaires pour montrer que la calpaïne-6 est régulée par la voie PI3K/AKT (Figure 28). (Liu et al., 2011) En effet, l'inhibition de PI3K ou la suppression d'AKT induit une diminution de l'expression de la calpaïne-6. Alors que la stimulation de cette voie par des facteurs de croissance comme l'IGF-1, ou par l'inactivation de PTEN conduit à une augmentation de l'expression de la calpaïne-6. Ces auteurs ont montré que la signalisation PI3K/AKT module la transcription du gène CAPN6 notamment en activant les facteurs de transcription Ap1, Oct-1 et FoxD3 mais aussi augmente le niveau de la protéine en inhibant sa dégradation. (Liu et al., 2011)



**Figure 28: L'expression de la calpaïne-6 dépend de la voie PI3K/AKT**

- (A) L'inhibition de PI3K ou AKT entraîne une diminution de l'expression de la calpaïne-6 dans des lignées cancéreuses et dans des fibroblastes (Western Blot)
- (B) La stimulation de la voie PI3K/AKT par de l'IGF ou l'inhibition de PTEN entraîne une augmentation de l'expression de la calpaïne-6 (Western Blot). *D'après Liu et al., 2011*

Hong et coll., ont par ailleurs montré que la calpaïne-6 était supprimée par un glucocorticoïde dans des macrophages différenciés en ostéoclastes sans déterminer les mécanismes impliqués. L'expression de la calpaïne-6 est aussi augmentée dans des macrophages par des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$ . (Miyazaki et al., 2016).

Enfin, récemment, Liu et coll., ont démontré que la calpaïne-6 est une cible du micro ARN-449a (miR-449a). (Liu et al., 2015)

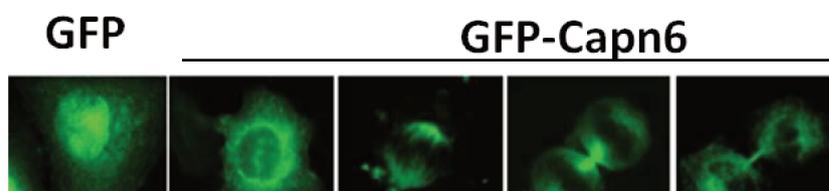
#### I.4.4. Fonctions

Aucun substrat de la calpaïne-6 n'a été découvert. De ce fait, la calpaïne-6 pourrait soit ne pas posséder d'activité catalytique, soit posséder une activité différente.

##### I.4.4.1. Calpaïne-6 et cytosquelette

Tonami et coll., sont les principaux acteurs des études existantes sur les fonctions de la calpaïne-6. Ce groupe a tout d'abord montré que la calpaïne-6 est un facteur stabilisateur du réseau de microtubules au cours de la division cellulaire. (Tonami et al., 2007) En utilisant un plasmide codant pour une protéine fusionnée avec la GFP, ils ont pu montrer comment la surexpression de calpaïne-6 perturbe la cytodiérese (étape terminale de la division cellulaire conduisant à la séparation des deux cellules filles) et induit la présence de cellules multi nucléés. (Figure 29) A l'inverse, l'inhibition de l'expression de la calpaïne-6 par des siRNA dans des cellules fibroblastiques induit une perturbation de l'organisation des microtubules

et une mobilité cellulaire accrue. Enfin, cette étude montre que la calpaïne-6 interagit avec les microtubules par son domaine III, et augmente l'acétylation de la tubuline- $\alpha$  et la résistance au nocodazole. La calpaïne-6 semble donc impliquée dans la régulation de la dynamique des microtubules et dans l'organisation du cytosquelette.



**Figure 29 : Effet de la surexpression de calpaïne-6 dans les cellules au cours de la division cellulaire**

Des cellules HeLa, ont été transfectées soit avec un plasmide codant pour la GFP, soit avec un plasmide codant pour la protéine de fusion Calpaïne-6-GFP. Au cours de la division cellulaire, la surexpression de calpaïne a pour effet de bloquer la phase terminale de la division. Les cellules résultant de ces divisions anormales sont multinucléées. *D'après Tonami et al., 2007*

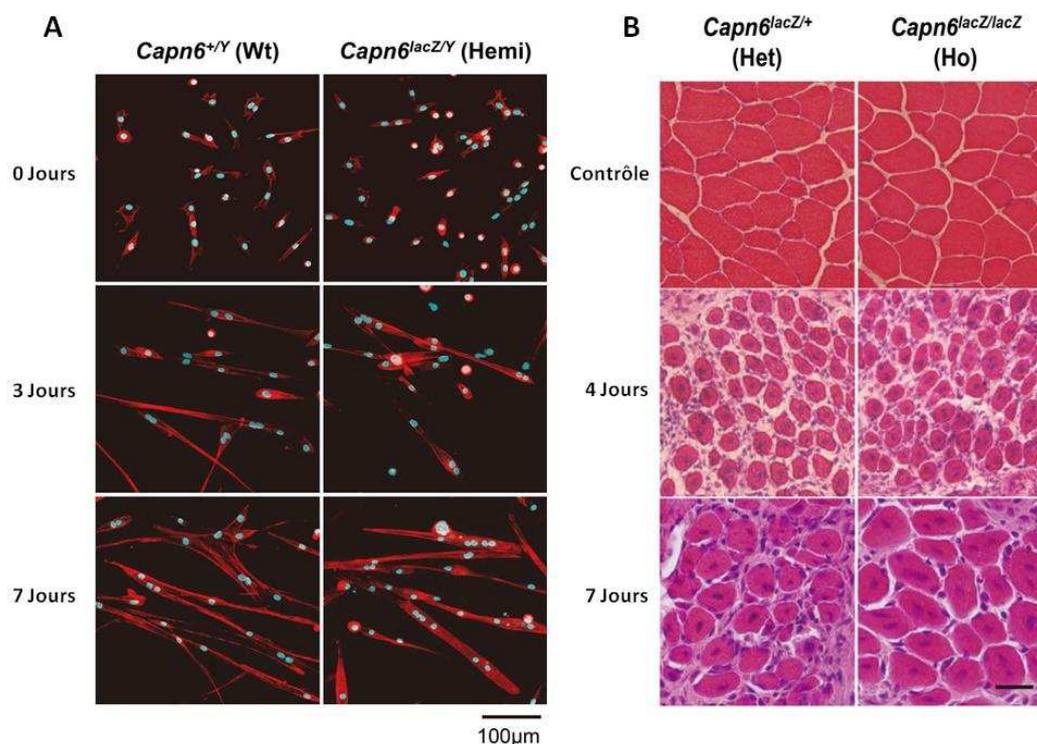
Par ailleurs, il a été rapporté que la dexaméthasone qui bloque fortement l'expression de la calpaïne-6 dans des macrophages induit également une inhibition de la stabilité des microtubules et de leur acétylation. (Hong et al., 2011).

La calpaïne-6 est aussi un régulateur indirect de la signalisation importante dans l'organisation et la dynamique du cytosquelette. Ainsi, il a été montré que l'inhibition de la calpaïne-6 induit l'activation de *Rac1* et la formation de lamellipode ; Cette activation étant dépendante de GEF-H1, facteur qui est libéré lors de la dépolymérisation des microtubules (Tonami et al., 2011). D'autre part, dans le cadre de l'étude des mécanismes de l'athérosclérose, Miyazaki et coll., ont montré que la calpaïne-6 induite dans des macrophages par le  $\text{TNF}\alpha$  était responsable d'une hyper pinocytose résultant d'une perturbation de la signalisation *Rac1*. (Miyazaki et al., 2016)

#### ***1.4.4.2 Calpaïne-6 et différenciation cellulaire***

Tonami et coll., ont développé une souris dans laquelle le gène de la calpaïne-6 a été supprimé et remplacé par le gène *lacZ* (*Capn6<sup>lacZ/Y</sup>*). Les muscles des souris déficientes en calpaïne-6 se développent plus rapidement que ceux des souris sauvages. (Figure 30A). De plus chez les souris *Capn6<sup>lacZ/Y</sup>* adultes les fibres musculaires se régénèrent plus vite après l'induction d'une lésion par injection de cardiotoxine que chez les souris sauvages. (Figure 30B) L'ensemble de ces résultats suggèrent que la calpaïne-6 pourrait-être un inhibiteur de

la différenciation des cellules musculaires au cours du développement et au cours de la réparation tissulaire chez la souris. (Tonami et al., 2013)

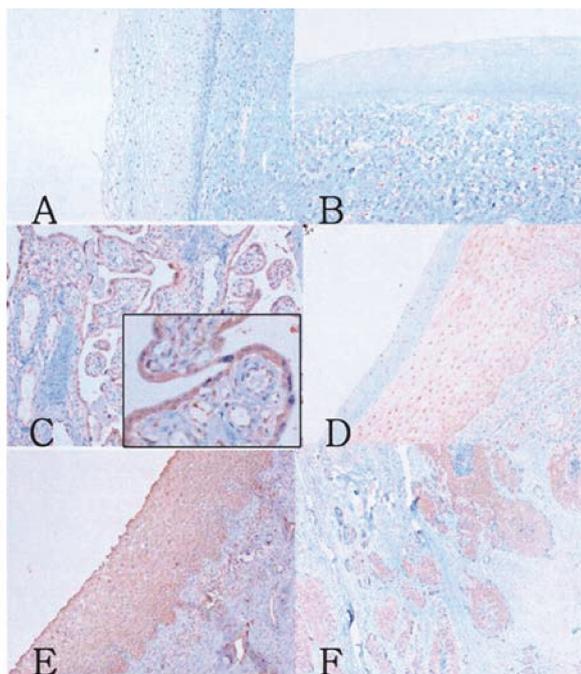


**Figure 30 : La calpaïne-6 : inhibiteur de la différenciation musculaire au cours du développement et de la réparation tissulaire**

- (A) Cellules primaire musculaire de souris sauvages ou de souris hétérozygotes Calp6<sup>LacZ/Y</sup>. Les cellules sont cultivées dans un milieu de différenciation pour cellules musculaires. Après 5 jours de cultures le nombre de noyaux dans les myofibrilles obtenues à partir des cellules de souris Calp6<sup>LacZ/Y</sup> est plus important que celui des myofibrilles obtenues à partir de cellules sauvages.
- (B) Analyse histologique des muscles de souris homozygotes KO calpaïne-6 ou hétérozygotes 4 et 7 jours après injection de cardiotoxine (lésion musculaire) ou de PBS (contrôle). 4 jours après la lésion, la régénération musculaire est visible dans les deux groupes de souris. Cependant, dans le groupe KO total, le nombre de noyaux présents dans les cellules musculaires est plus important 7 jours après la lésion musculaire. *D'après Tonami et al., 2013*

#### 1.4.4.3 Calpaïne-6 et tumeurs

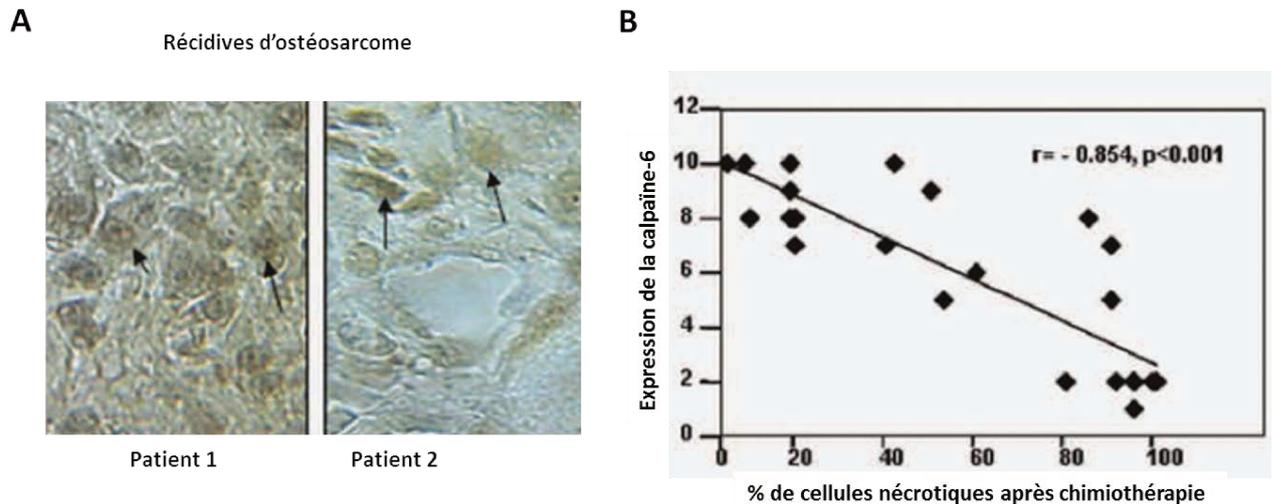
Lee et coll., ont montré grâce à des études immunohistochimiques que l'expression de la calpaïne-6 était liée au grade des tumeurs utérines (Figure 31). (Lee et al., 2008)



**Figure 31: Immunohistochimie anti-calpaïne-6 dans les cancers utérins**

- (A) Epithélium cervical sain,
- (B) Epithélium cervical sain, dans les deux cas, aucun marquage n'est visible,
- (C) Placenta,
- (D) Lésion intraépithéliale squameuse de bas grade,
- (E) Lésion intraépithéliale squameuse de haut grade,
- (F) Carcinome invasif. *D'après Lee et al., 2008*

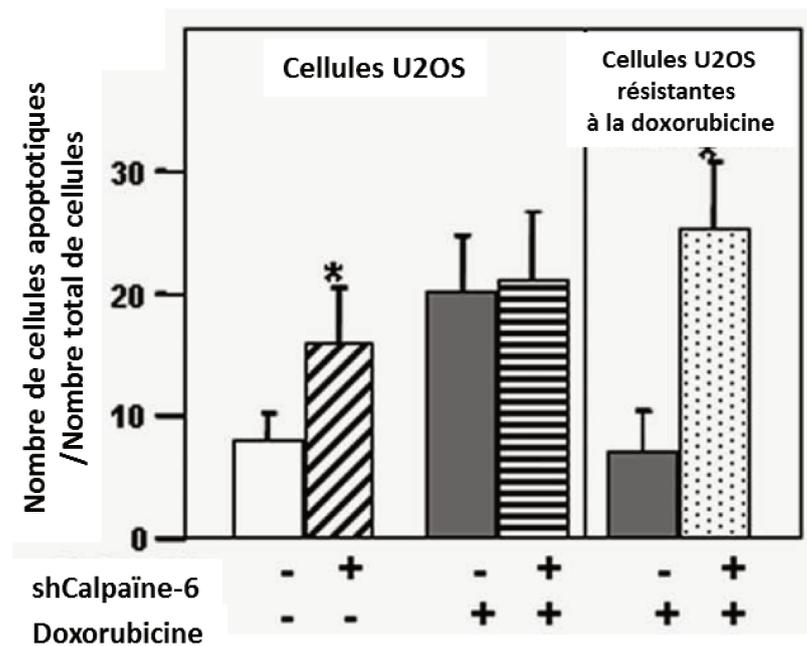
Marion et coll., ont mis en évidence une forte expression de la protéine dans des tumeurs qui sont des récives d'ostéosarcomes et que l'expression de la calpaïne-6 est inversement corrélée à la réponse des patients aux traitements de chimiothérapies. (Figure 32) (Marion et al., 2012)



**Figure 32 : L'expression de la calpaïne-6 est lié à la chimiorésistance des ostéosarcomes**

- (A) Analyse immunohistochimique anti-calpaïne-6 sur des TMA issus de récurrences d'ostéosarcomes
- (B) L'expression de la calpaïne-6 dans les tumeurs primaires osseuses est inversement corrélée à la réponse des patients aux traitements de chimiothérapie. (% de cellules nécrotiques dans les tumeurs) *D'après Marion et al., 2012*

De façon cohérente, la calpaïne-6 semble avoir un rôle protecteur dans les cellules cancéreuses. Dans les cancers utérins, il a été montré que la calpaïne-6 protège de l'apoptose induite par la cisplatine en inhibant l'expression de la caspase-3. (Rho et al., 2008) Cependant le mécanisme par lequel la calpaïne-6 inhibe la caspase-3 n'a pas été mis en évidence. Dans les ostéosarcomes, *in vitro*, l'inhibition de la calpaïne-6 par des shRNA a permis d'augmenter la réponse des cellules d'ostéosarcome à la doxorubicine (Figure 33). (Marion et al., 2012)



**Figure 33: La calpaïne-6 joue un rôle protecteur dans les cellules d'ostéosarcomes**

Effet de l'inhibition de la calpaïne-6 dans des cellules U2OS ou U2OS résistantes traitées avec 50ng/ml de doxorubicine. Les cellules ont été transfectées avec des shNS ou des shCalpaïne-6. Le nombre de cellules apoptotiques a été déterminé par coloration APOPercentage sous microscope et a été corrigé par le nombre total de cellule. *D'après Marion et al., 2012*

D'autre part, la surexpression de la calpaïne-6 dans les cellules HUVEC (cellules endothéliales de la veine ombilicale) augmente les capacités angiogéniques de ces cellules. (Rho et al., 2008). Alors que l'inhibition de la calpaïne-6 dans des lignées tumorales et des fibroblastes embryonnaires induit une diminution de la phase S du cycle cellulaire, ainsi qu'une diminution de l'expression de la cycline D1. L'expression des protéines E-cadhérine et N-cadhérine ne sont pas modulées par la calpaïne-6, ce qui suggère que la calpaïne-6 pourrait ne pas être impliquée dans la transition épithélio-mésenchymateuse (Liu et al., 2011).

L'ensemble de ces résultats suggèrent que la calpaïne-6 peut-être liée à la malignité des cellules tumorales et pourrait donc être une cible thérapeutique intéressante.

# Objectifs du travail

---

## Objectifs du travail

Les chances de survie des patients avec un sarcome osseux n'évoluent plus depuis des décennies malgré les essais de nouvelles thérapies et les progrès de la chirurgie. Notamment le nombre de patients qui développent des métastases, principales causes de mortalité, ne régresse pas. En fait, les chimiothérapies conventionnelles et les thérapies récentes qui ciblent des voies de signalisation affectent de façon indifférenciée toutes les cellules tumorales mais également des cellules saines. L'objectif général du travail est de mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques pour améliorer le traitement des sarcomes osseux.

Nous avons montré précédemment qu'une calpaïne atypique, la calpaïne-6, est impliquée dans la chimiorésistance des ostéosarcomes. D'autres travaux, ont montré que cette calpaïne joue également un rôle anti-apoptotique et pro-angiogénique dans des tumeurs utérines. Cette protéine pourrait être une cible thérapeutique intéressante parce que son expression est très restreinte après la naissance chez l'homme et qu'elle pourrait être une protéine oncofœtales donc une cible plus spécifique. Peu de données étaient disponibles concernant la calpaïne-6 et sa régulation. Une seule publication, utilisant des banques de données de transcriptomes, rapporte une étude de corrélation entre l'expression de la calpaïne-6 et le grade, la présence de métastases ou la survie des patients avec des tumeurs de la tête et du cou. Aucune corrélation significative n'a été trouvée avec le grade ou les métastases. Les auteurs montrent cependant une corrélation entre l'expression de la calpaïne-6 et la survie des patients. Ces résultats sont donc contradictoires avec le rôle pro-apoptotique mis en évidence par ailleurs.

Une des premières questions que nous avons essayé de résoudre était celle des mécanismes contrôlant l'expression anormale de cette protéine dans les cellules tumorales. Pour cela nous avons réalisé une étude *in silico* de la séquence régulatrice du gène *CAPN6* en 5' de l'ATG. Puis nous avons identifié le promoteur actif et cloné la séquence régulatrice et ce promoteur devant un gène rapporteur pour étudier son activité transactivatrice. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux sites consensus pour les facteurs NF- $\kappa$ B et HIF qui sont présents sur cette séquence. Cela nous a conduits à explorer la régulation de la calpaïne-6 par l'hypoxie.

L'analyse de la séquence régulatrice de *CAPN6* a mis en évidence également un nombre important de sites consensus pour les facteurs de transcription Oct4, Sox2 et Nanog. Nous avons étudié les interactions entre ces facteurs et la séquence régulatrice de la calpaïne-6.

Oct4, Sox2 et Nanog étant des facteurs de transcription qui font partie d'un programme spécifique de contrôle du renouvellement et de la multipotence des cellules souche embryonnaires, nous avons ensuite cherché à déterminer la relation entre l'expression de la calpaïne-6 et la tumorigenèse des sarcomes osseux et, en particulier, si cette expression était corrélée avec l'acquisition de propriétés de CSC. Nous avons construit un système rapporteur dans lequel la GFP membranaire est sous le contrôle de la séquence régulatrice de la calpaïne-6 pour identifier les cellules exprimant la calpaïne-6 et caractériser leur comportement.

Nous avons également étudié les fonctions de la calpaïne-6. Pour cela nous avons utilisé le système CRISPR/Cas9 pour inhiber son expression.

Première partie : La calpaïne-6 contrôle  
le destin des cellules souche  
cancéreuses dans les sarcomes osseux  
en favorisant l'autophagie et en  
empêchant la sénescence

---

# **Chapitre I: La calpaïne-6 contrôle le destin des cellules souche cancéreuses dans les sarcomes osseux en favorisant l'autophagie et en empêchant la sénescence**

## **I. Introduction**

Malgré l'amélioration des techniques chirurgicales et la mise en œuvre des chimiothérapies agressives, le taux de survie des patients développant un sarcome osseux est de 70% pour les patients atteints d'une tumeur locale et moins de 30% pour les patients présentant une rechute ou des métastases. (Allemani et al., 2016) De plus, le nombre de patients développant des récidives ou des métastases n'a pas diminué depuis 30 ans. Il est donc important de mieux comprendre la biologie de ces tumeurs pour trouver de nouvelles cibles thérapeutiques. Un des modèles du développement tumoral repose sur l'apparition de clones cellulaires avec des propriétés de CSC. (Alfranca et al., 2015; Valent et al., 2012) Le concept de CSC est maintenant largement accepté comme acteur majeur de la leucémie et du carcinome, mais il existe encore peu de données qui valident cette hypothèse dans les sarcomes. Cela est dû au manque d'outils spécifiques pour distinguer et caractériser de telles cellules qui pourraient être présentes en nombre très limité dans les tumeurs. (Pattabiraman & Weinberg, 2014) Si le développement des sarcomes dépend de CSC cela implique une organisation hiérarchique. On peut attendre des CSC qu'elles aient notamment des capacités à former des tumeurs plus importantes que les autres cellules cancéreuses. Elles peuvent également contribuer à la chimiorésistance et au processus métastatique. En fait Valent et coll., ont défini les CSC comme les cellules responsables de l'évolution maligne des tumeurs. (Valent et al., 2012)

La calpaïne-6 est une calpaïne atypique qui contrôle l'organisation du cytosquelette d'actine et la stabilité du réseau de microtubules pendant la cytodierèse. (Tonami et al., 2007) La calpaïne-6 agit comme un inhibiteur de la différenciation des muscles squelettiques pendant le développement et la régénération chez la souris. (Tonami et al., 2013) En plus du placenta, de tissus embryonnaires et de macrophages dans certaines conditions pathologiques, la calpaïne-6 n'a été détectée que dans des cellules tumorales. (Lee et al., 2008; Marion et al., 2012; Miyazaki et al., 2016) Nous avons déjà montré que la calpaïne-6 est présente dans les ostéosarcomes et les métastases pulmonaires dérivées

d'ostéosarcome et que son expression est particulièrement élevée dans des récurrences de tumeurs osseuses. (Marion et al., 2012) De plus, l'expression de la calpaïne-6 dans les cellules cancéreuses est associée à la chimiorésistance et à l'inhibition de l'apoptose. (Liu et al., 2015) L'ensemble de ces données suggérant que l'expression de la calpaïne-6 est liée au développement et à la progression tumorale. Le but de cette étude était de déterminer si l'expression de la calpaïne-6 dans des cellules de sarcome pouvait être associée à des caractéristiques de CSC. Nous avons utilisé des lignées cellulaires avec des origines et des altérations géniques différentes ainsi que des modèles de tumeurs osseuses chez la souris. Etant donné les difficultés rencontrées pour détecter la protéine et les transcrits, nous avons construit un système rapporteur basé sur la séquence régulatrice du gène *CAPN6* contrôlant l'expression de la GFP. Ce système nous a permis de caractériser le comportement particulier des cellules qui expriment la calpaïne-6, à la tête d'une hiérarchie cellulaire et les capacités tumorales accrues de ces cellules. Nous avons ensuite créé des lignées cellulaires dans lesquelles l'expression de la calpaïne-6 est bloquée en utilisant des plasmides ou des lentivirus codant des ARN guide spécifiques et la Cas9. Cela nous a permis de mettre en évidence des fonctions importantes de la calpaïne-6 dans les CSC. Nos résultats montrent que la calpaïne-6 est un marqueur de CS de sarcome. Cette protéine contrôle le destin des CSC en inhibant l'entrée en sénescence et en favorisant l'autophagie.

## II. Résultats

## **Calpain-6 controls the fate of sarcoma stem cells by promoting autophagy and preventing senescence**

Caroline Andrique<sup>1,2</sup>, Laetitia Morardet<sup>1,2</sup>, Candice Merle<sup>3</sup>, Frédéric Chibon<sup>3,4,5</sup>, Sylvain Provot<sup>1,2</sup>, Eric Hay<sup>1,2</sup>, Hang-Korng Ea<sup>1,2</sup>, Martine Cohen-Solal<sup>1,2</sup>, Dominique Modrowski<sup>1,2\*</sup>

### **Institutions:**

1. Inserm UMR-1132, Paris, France.
2. Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France.
3. CRCT/UMR1037 INSERM-Université Toulouse 3, Toulouse France.
4. ERL5294 CNRS, Toulouse France.
5. ICR-IUCT-ONCOPOLE, Toulouse, France.

Correspondence: dominique.modrowski@inserm.fr

## **Summary**

Cancer stem cells contribute to sarcoma development, but lack of specific markers prevents their characterization and the possibility of targeting. We used the regulatory sequence of calpain-6 in reporter constructions to identify calpain-6–expressing cells. These cells were tumor-initiating cells and behaved like stem cells at the apex of the cellular hierarchy. Calpain-6 expression depended on the stem-cell transcription network that involves Oct4, Nanog, and Sox2 and was activated by hypoxia. Calpain-6 knockdown blocked tumor development and induced depletion of sarcoma stem cells. Calpain-6 was inversely associated with expression of senescence markers but was associated with a dynamic autophagy flux. Calpain-6 knockdown induced cell entry into senescence and suppressed autophagy flux. Our results reveal that calpain-6 identifies sarcoma stem-cell and plays an important role as a regulator of cancer cell fate driving a switch between autophagy and senescence. Calpain-6 is a promising therapeutic target to suppress sarcoma stem cells.

## **Introduction**

Sarcomas occur in soft connective tissues and bones (Doyle 2014). The leitmotif in reports dedicated to these cancers is the failure to increase the survival rate, which is 70% for patients with a local tumor and less than 30% for patients with relapse or metastases, and this, despite improvements in surgical techniques and the implementation of aggressive chemotherapies (Allemani et al. 2015). Indeed, the number of patients with long-term metastatic disease has reached a plateau for decades.

Although sarcomas have various cellular origins, histologic features and genomic alterations, patients have similar outcome. A general mechanism proposed is that the malignant progression of cancers relies on the emergence of cell clones with cancer stem cell (CSC) properties (Eide & Druker 2017; Valent et al. 2012). This progression could depend on genetic modifications, epigenetic regulation and specialized environments (Zaidi et al. 2017; Aponte & Caicedo 2017). The concept of CSCs is currently accepted as a major contributor to leukemia and carcinomas, but we have only few data that document this hypothesis for sarcomas because we lack specific tools to distinguish and characterize such cells, which could be rare in rare tumors (Pattabiraman & Weinberg 2014).

Calpain-6 is an atypical calpain that was shown to control actin cytoskeleton organization and microtubule network stability during cytokinesis (Tonami et al. 2007). Calpain-6 functions as an inhibitor of skeletal muscle differentiation during development and regeneration in mice (Tonami et al. 2013b). Besides being detected in placenta, embryonic tissues and macrophages under pathological conditions, calpain-6 has been detected in tumor cells (Tonami et al. 2013a; Miyazaki et al. 2016; Lee et al. n.d.; Marion et al. 2012). We previously reported that calpain-6 is present in osteosarcomas and osteosarcoma-derived lung metastases and its expression is

especially high in bone tumor recurrence (Marion et al. 2012). Moreover, calpain-6 expression in cancer cells is associated with the inhibition of apoptosis and chemoresistance (Lee et al. n.d.; Marion et al. 2012; Liu et al. 2016). Together, these data suggest that calpain-6 expression may be related to the malignant progression of primary tumors.

We aimed to identify the calpain-6-expressing cells among sarcoma cell populations. To that purpose we used the regulatory sequence of calpain-6 in reporter constructions. Calpain-6-expressing cells had high tumorigenic abilities that were related to CSC features. Calpain-6 expression depended on the stem-cell pathway involving Oct4, Sox2 and Nanog, especially for upregulation by hypoxia. In human tumors and cell lines, calpain-6 expression was inversely associated with that of senescence markers, and calpain-6 knockdown restored entry into the senescence state. In contrast, calpain-6 fostered autophagy and thereby controlled cancer cell fate to maintain the stem cell population.

## Results

### **Calpain-6 expression is associated with sarcoma malignancy.**

Although calpain-6 was found aberrantly expressed in different tumors and to act as an anti-apoptotic and pro-angiogenic factor, we have few data from large genomic analyses documenting the relation between calpain-6 expression and tumor grade or prognostics. To determine the possible role of calpain-6 in sarcoma cell malignancy we used cellular and mouse sarcoma models and reporter constructs, thereby avoiding the pitfalls of antibody-based methods. First, we identified the active promoter in CAPN6 and characterized the regulatory activities in the 6988-base pairs sequence upstream of the ATG codon (Calp6-P) (Supplementary Figs. 1 and 2). This DNA fragment was cloned upstream of the luciferase-coding sequence (Calp6-P-LUC), which allowed for demonstrating that Calp6-P transactivation activity is upregulated by endothelin-1 by activating the NF- $\kappa$ B pathway (Supplementary Fig. 2). Hence, the same mechanisms control Calp6-P activity and calpain-6 mRNA expression (Marion et al. 2012).

Luciferase was then replaced by membrane GFP as a reporter gene under the control of Calp6-P (Calp6-P-GFP). Different cell lines with various origins and gene alterations were transfected and selected for stable integration of the GFP reporter construct (Fig. 1A and Supplementary Fig. 3A). Levels of calpain-6 mRNA and protein were higher in sorted human GFP-expressing cells (Calp6-P-GFP+) than non-GFP expressing cells (Calp6-P-GFP-) or unsorted cells (Calp6-P-GFP) (Supplemental Fig. 3B,C). As well, calpain-6 mRNA level was higher in Calp6-P-GFP+ than GFP- mouse K7M2 cells, even though Calp6-P was the human sequence (Fig. 1B). Hence, Calp6-P-driven GFP and calpain-6 expression were actually associated, which validated our reporter construct used to study calpain-6-expressing cells.

We then used immunofluorescence and bioluminescence to investigate the fate of calpain-6–expressing cells in vivo in a syngeneic model of bone tumor that involved implanting Calp6-P-GFP K7M2 cells into the tibia of Balb/c mice as previously described (Dieudonné et al. 2012). These cells were transduced and selected to express luciferase under the control of a strong promoter, EFl $\alpha$  (Luc-Calp6-P-GFP K7M2). Six weeks later, luciferase-expressing cancer cells were detected in the bone marrow of tibias with implantation of unsorted and sorted Luc-Calp6-P-GFP+ cells but not bone marrow of mice injected with sorted Luc-Calp6-P-GFP- cells (Fig. 1C). Local bioluminescent signal was continuously increased with implantation of Luc-Calp6-P-GFP+ K7M2 cells (Fig. 1D,E). In mice injected with sorted Luc-Calp6-P-GFP- cells, the signal increased slightly until the second week, then decreased thereafter (Fig. 1D,E). In H&E-stained sections of mouse lungs, metastatic nodules were more numerous and larger with implantation of unsorted or Luc-Calp6-P-GFP+ than Luc-Calp6-P-GFP- K7M2 cells (Fig. 1F,G,H).

To determine whether the reduced metastatic disease in Luc-Calp6-P-GFP- mice was related to the absence of bone tumor or whether calpain-6–expressing cells were directly involved in the metastatic process, we injected 10-fold less sorted Luc-Calp6-P-GFP- or GFP+ K7M2 cells into mouse tibias. Mice did not show local bone tumor within the 3 months after cell implantation.

At this time, lung tissues were dissociated and lung cells were cultured with neomycin to select cancer cells. Sarcoma cell colonies grew only in cultures of lung cells from mice injected with Calp6-P-GFP+ K7M2 cells (Fig. 1I). Together, our results show that calpain-6–expressing cells are responsible for primary bone tumor formation and metastatic progression of osteosarcoma in the K7M2 cell-derived mouse model.

### **Calpain-6 expression is a marker of stem-like cells.**

We next investigated the mechanisms involved in the specific tumorigenic properties of calpain-6–expressing cells. Measurement of DNA content in different cell lines showed a shift in G2/M

at the expense of G1 for Calp6-P-GFP+ versus GFP- cells, especially in 143B and TC71 human cell lines (Fig. 2A and Supplementary Fig. 4C). Consistently, the human Calp6-P-GFP+ cells showed higher levels of the proliferating marker Ki67 (Fig. 2C and Supplementary Fig. 4D), so human calpain-6-expressing cells may have a proliferating advantage. However, Calp6-P-GFP- and GFP+ mouse K7M2 cells did not differ in the overall cell cycle or Ki67 expression (Fig. 2B,D). Hence, not modifying the proliferation contributed to the tumorigenic activity of mouse Calp6-P-GFP+ K7M2 cells. The proportion of Calp6-P-GFP+ cells appeared stable in confluent cultures of the different cell lines with multiple cell passage, which suggests self-renewal activity in these cells (Supplementary Fig. 5A). However, the proportion of GFP+ cells decreased and that of GFP- cells increased during human and mouse cell proliferation (Supplementary Fig. 5B,C).

We then sorted 143B Calp6-P-GFP- and GFP+ cells to seed and culture them separately for 5 days. The Calp6-P-GFP- cell culture contained only 0.1% GFP+ cells, whereas the Calp6-P-GFP+ cell culture contained 35.4% GFP- cells (Fig. 2E). These results suggest that Calp6-P-GFP- cells could result from GFP+ cell division. In another hand, Calp6-P-GFP+ K7M2 cell-derived tumors displayed a histological heterogeneity and looked like tumors obtained with unsorted K7M2 cells (Fig. 2F). Together, these results suggest that calpain-6-expressing cells behave like self-renewing stem cells at the top of the cellular hierarchy.

To further characterize the possible stem-cell features of these cells, we performed sphere formation assays as a classical test to show self-renewing stem-like cells (Grimshaw et al. 2008). Human and mouse cells were cultured on non-adherent plastic in stem-cell-specific medium. Every cell of the floating spheres at the 2- to 3-cell stage expressed GFP, but the proportion of Calp6-P-GFP+ cells was decreased in larger spheres and was not significantly different from that in adherent monolayer cultures of unsorted Calp6-P-GFP cells (Fig. 2G,H, Supplementary Fig.

5D). Colony-formation ability was greater for sorted Calp6-P-GFP<sup>+</sup> cells of the different cell lines than Calp6-P-GFP<sup>-</sup> cells (Fig. 2I,J). Hence, Calp6-P-GFP<sup>+</sup> cells appeared to be sphere-initiating cells. This finding strengthens the idea that calpain-6-expressing cells have high tumorigenic potential because they have stemness features.

**Calpain-6 expression depends on the hypoxic environment and stem-cell pluripotency factors: Oct4, Sox2 and Nanog.**

A striking feature of the Calp6-P sequence is the high number and distribution of consensus sites for the stem-cell pluripotency factors Oct-4, Nanog and Sox2 (Fig. 3A). Under standard culture conditions (21% O<sub>2</sub>), chromatin immunoprecipitation (ChIP) failed to show Nanog or Sox2 bound to Calp6-P (Fig 3B). However, as previously reported (Petruzzelli et al. 2014)(Mathieu et al. 2011), hypoxia (3% O<sub>2</sub>) upregulated the expression of these factors, which allowed for detecting Calp6-P-associated Oct-4, Nanog and Sox2 in sarcoma cells (Fig. 3B,C and Supplementary Fig. 6A,B,C). Hypoxia also increased the transactivation activity of Calp6-P (as shown by increased GFP expression) and calpain-6 expression in diverse cancer cell lines (Fig. 3D; supplementary Fig. 7A,B,C).

To determine whether calpain-6 expression was associated in vivo with hypoxic environments, mice with K7M2-cell-derived bone tumors were injected with pimonidazol as a hypoxyprobe(Aguilera & Brekken 2014). Immunofluorescence showed the highest calpain-6 expression in hypoxic areas within tumor sections (Fig. 3E). Also, in human osteosarcoma sections, calpain-6 was detected in areas where hypoxia-inducible factor 1  $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) accumulated (Fig. 3F). We then used specific siRNA to block HIF-1 $\alpha$ , Oct-4, Nanog or Sox2 induction by hypoxia (Supplementary Fig. 6A,B,C). Consistent with the interdependency that was previously reported(Wang et al. 2013), the suppression of only 1 of the 4 transcription factors (HIF-1 $\alpha$ , Oct-4, Sox2 and Nanog) was sufficient to block the hypoxia-dependent

expression of Oct-4, Nanog and Sox2 (Supplemental Fig. 6A,B,C). siRNA knockdown of Oct-4, Sox2 and Nanog also blocked the increased calpain-6 mRNA level in hypoxic cells (Fig. 3G). In contrast, co-expression of Oct-4, Nanog and Sox2 but not their individual expression increased calpain-6 mRNA level in cells cultured with 21% O<sub>2</sub> (Fig. 3H). These results indicate that Oct-4, Nanog and Sox2 induced via HIF-1 $\alpha$  act together to mediate hypoxia-dependent promotion of calpain-6 expression.

Together, these findings show that Oct-4, Nanog and Sox2 function together as direct transactivators binding the regulatory sequence of calpain-6. Hence, calpain-6 is expressed in cells with a functional stem-cell pathway.

#### **Calpain-6 expression is required for sarcoma-cell tumorigenicity.**

To determine whether calpain-6 has a functional role during tumor development, we used double nicking by RNA-guided CRISPR-Cas9 in the K7M2 mouse cell line or a single crRNA sequence coded with Cas9 by a lentiviral vector to stably knock down calpain-6 expression in human cells (Supplementary Fig. 8A,B). CRISPR/Cas9 systems reduced calpain-6 mRNA expression and abolished calpain-6 upregulation induced by hypoxia (Fig. 4A,B).

Calpain-6<sup>KD</sup> or control cells were then implanted into tibia of BALB/c mice or immunodeficient mice. Luciferase-expressing Calpain-6<sup>KD</sup> K7M2 cells generated a weak bioluminescent signal for the first two weeks that disappear thereafter. In contrast, control K7M2 cells; formed tumors overtime (Fig. 4C). Similarly, knockdown of calpain-6 expression in human osteosarcoma 143B cells strongly reduced tumor development in tibias of immunodeficient mice (Fig. 4D). Survival was better for mice with calpain-6<sup>KD</sup> cell injection versus control cell injection (Fig. 4E,F). Therefore, calpain-6 not only can identify CSCs but also has a functional role during tumorigenesis. Indeed, calpain-6 knockdown resulted in a striking decrease in the proportion of Calp6-P-GFP<sup>+</sup> cells in osteosarcoma populations (Fig. 4G). Consistently, calpain-6 knockdown

strongly suppressed colony formation on the non-adherent plastic in the serum-free stem cell medium (Supplementary Fig. 8C,D). Hence, calpain-6 acts to maintain the stem cell population.

### **Lack of calpain-6 in sarcoma cells is associated with senescence.**

To further investigate the calpain-6 function in CSC, we analyzed transcriptomes of primary untreated human sarcomas, comparing tumors with low and high levels of calpain-6. Both RNA-seq and microarray transcriptome profiling revealed lower levels of markers of senescence in calpain-6-expressing than -non-expressing tumors (Fig. 5A,B). Because senescence plays a crucial role in the response to chemotherapy and suppresses tumor growth by limiting cancer cells' lifespan (Bartkova et al. 2006; Sharpless & DePinho 2005), these results appeared of particular interest. PCR confirmed that the expression of senescence-associated secretory phenotype (SASP) genes and levels of senescence markers p21 and p16 were lower in sorted Calp6-P-GFP<sup>+</sup> than GFP<sup>-</sup> populations (Supplementary Fig. 9A,B). In situ, senescence-associated- $\beta$ -Galactosidase (SA- $\beta$ -Gal) activity was mostly detected in very confluent GFP<sup>-</sup> cells (Fig. 5C). Flow cytometry further revealed that SA- $\beta$ -Gal activity was reduced in Calp6-P-GFP<sup>+</sup> cells of the different cell lines (Fig. 5D). However, calpain-6 knockdown increased SASP gene expression and enhanced the number of cells with SA- $\beta$ -Gal activity (Supplementary Fig. 9C,D,E). GATA4 is a p53-independent transcription factor that regulates SASP gene expression and senescence (Kang et al. 2015). Consistent with the data showing that hypoxia can prevent senescence, reduced O<sub>2</sub> pressure decreased GATA4 protein level in 143B cells (Fig. 5E). However, hypoxia did not reduce GATA4 in calpain-6<sup>KD</sup> cells (Fig. 5E). and GATA4 level was higher in the nucleus of Calp6-P-GFP<sup>-</sup> than GFP<sup>+</sup> cells cultured in 3% O<sub>2</sub> (Fig. 5F). These data suggest that calpain-6 is involved in the protective function of hypoxia in sarcoma cells. GATA4 levels are regulated by p62-mediated selective autophagy (Kang et al. 2015). Treating the cells with bafilomycin A1, an inhibitor of autophagy, reversed the hypoxia-downregulated GATA4

(Fig. 5E), so hypoxia required active autophagy to reduce GATA4 levels. Because calpain-6 knockdown had the same effect as bafilomycin A1 on the hypoxia-dependent level of GATA4, we hypothesized a possible role for calpain-6 during this degradation process.

### **Calpain-6 expression is associated with dynamic autophagy flux.**

The protein p62 is processed with GATA4 in autophagy flux. Immunofluorescence showed an accumulation of p62 punctuates in hypoxic Calp6-P-GFP- cells (Supplementary Fig. 10A), which indicates a less dynamic autophagy process in these cells. Western blot analyses revealed higher levels of the autophagosome-associated form of LC3, LC3-II, in Calp6-P-GFP+ 143B cells (Supplementary Fig. 10B).

We next measured autophagy flux by using bafilomycin 1A. This inhibitor of the lysosome terminal degradation disrupts autophagy flux and induces an accumulation of LC3-stained autophagosomes depending on the autophagy activity. Immunofluorescence and cytometry analyses revealed that bafilomycin induced more LC3 punctuates and greater LC3 accumulation ( $\Delta$ LC3) in Calp6-P-GFP+ than GFP- cells (Fig. 6A,B and Supplemental Fig. 10C,D). The difference between GFP- and GFP+ cells of the different cell lines was detected when autophagy was challenged by hypoxia. These data indicate more active autophagy in hypoxic GFP+ than GFP- cells. As well, autophagy appeared to be active in calpain-6-expressing cells in tumors because immunofluorescence in human osteosarcoma tissues revealed that calpain-6-positive cells expressed very high levels of the autophagosome marker Lamp2 (Fig. 6C). We did not find any association between calpain-6 expression and levels of autophagy-related genes on transcriptome or PCR analysis of cell lines. However, the hypoxia-dependent autophagy flux ( $\Delta$ LC3) was inhibited in calpain-6<sup>KD</sup> cells and strongly increased in calpain-6-overexpressing 143B cells (Fig. 6D,E and Supplementary Fig. 10E). These results suggest that calpain-6 is directly involved in the autophagy process. Together, our data indicate that calpain-6 participates

in the promoting effect of hypoxia on autophagy and the preventing effect on senescence and thereby controls sarcoma stem-cell fate (Fig. 6F).

## **Discussion**

Despite evidence that sarcomas contain cells with stem-like characteristics (Gibbs et al. 2005; Chen et al. 2009; Fujii et al. 2009; He et al. 2012; Suva et al. 2009), explaining the development of these tumors using the general concept of CSC is a challenge (Magee et al. 2012). Probably due to their various cellular origins and the multiple genetic alterations involved, specific and common markers or genetic signatures are still missing to distinguish stem cells from the bulk of sarcoma cells. Here, using the calpain-6 regulatory sequence-based reporter we identified cells that generated the other cell populations in monolayer and sphere cultures and in vivo during tumor formation in mice. We found that calpain-6 identifies cells that behave like stem cells at the top of cellular hierarchy. Moreover calpain-6 expression is restricted to a cell population with a functional regulatory network involving Oct-4, Sox2 and Nanog. Hence, calpain-6 is a target gene of a "stemness" pathway that is part of the common signature of embryonic stem and cancer cells (Glinsky 2008).

Valent et al. defined CSCs as cells that confer malignancy to the tumors (Valent et al. 2012). The stemness pathway that controls calpain-6 expression was found upregulated in poorly differentiated tumors and associated with worse outcome (Ben-Porath et al. 2008). In our osteosarcoma mouse model, only calpain-6-expressing cells were able to generate a tumor, and suppression of calpain-6 inhibited tumor development in mouse and human cell-based mouse tumor models. Therefore, calpain-6-expressing cells are tumor initiating cells.

Calpain-6-expressing cells had unique metastatic capacities in our syngeneic mouse model. Moreover, we and others previously found that calpain-6-expressing cells are responsible for tumor chemoresistance (Rho et al. 2008; Marion et al. 2012). Hence, calpain-6 expression is definitively associated with malignant characteristics of sarcoma cells. Calpain-6 was able to identify these populations in cell lines from diverse origins and with various genetic alterations. Therefore, we propose calpain-6 as a marker of sarcoma SC.

Of note, transcriptional activity of Calp6-P could not be reactivated in cells that did not express calpain-6, which suggests that the presence or absence of calpain-6 determines an irreversible modification of the cell fate, in contrast to the possible plasticity that was previously described for CSCs (Gao et al. 2014). Importantly, our results bring the first evidence of a possible hierarchical organization of sarcomas and demonstrate the contribution of stem cells to the development of these tumors.

The hypoxic environment supports chemoresistance and aggressiveness of the tumor cells (Höckel & Vaupel 2001). HIFs control the stemness pathway modulating the loop involving Oct4, Sox2 and Nanog (Petruzzelli et al. 2014). Our results indicate that calpain-6 expression is increased by hypoxia. We also show that calpain-6 is required for hypoxia-dependent autophagy flux and the prevention of senescence. Calpain-6 may be induced to mediate a specific stem-cell adaptation to the tumor environment. Because calpain-6 knockdown did not modify the expression of autophagy-related genes at the mRNA level but strongly impaired LC3 accumulation, calpain-6 may not alter upstream signaling that controls autophagy induction but rather directly participates in the late phases of this process. This suggestion would be consistent with its role in microtubule stabilization and actin cytoskeleton organization (Tonami et al. 2007; Tonami et al. 2011) and could explain why the genomic analyses failed to reveal any relation between calpain-6 expression in tumors and autophagy.

Although autophagy may be involved as a tumor suppressor in early phases of cancer development, it seems to be required in advanced tumors. Especially, autophagy was found increased in various cancer cell spheres (Yang et al. 2017; Ran et al. 2017). Inhibition of autophagy in these models altered CSC behavior. Moreover, autophagy was proposed to be a key mechanism that contributes to the maintenance of normal and cancer stem-cell populations. Garcia-Prat et al. recently demonstrated that autophagy maintains the stemness of satellite cells by preventing senescence (García-Prat et al. 2016). To our knowledge, we bring the first evidence that this switch between autophagy and senescence fates may also play a crucial role in maintaining the CSC population during sarcoma development. This evidence has important implications for a therapeutic potential of calpain-6 inhibition that will be explored in future studies.

## **Author contribution**

CA designed and performed most of the experiments, data analyses and interpretations and was one of the primary writers of the manuscript.

LM performed and analyzed the experiments about metastatic potential of sarcoma cells and contributed to reporter system construction.

CM and FC performed analyses from transcriptomic assays and contributed to writing the manuscript.

SP contributed to in vivo experiments, data analyses and helped for writing the manuscript

EH contributed data analyses and interpretations and helped for writing the manuscript

HKE contributed to experiments on autophagy and help for data analyses

MC contributed to data analyses, interpretations and manuscript construction

DM constructed the project, designed and supervised the experiments and had a major role in data interpretation and writing the manuscript.

## **Acknowledgements**

The authors thank Agnès Ostertag and Caroline Marty for their technical assistance, Griselda Wentzinger (Imagoseine platform, Institut Jacques Monod, Paris, France) for cell sorting and the members of the Société Française de lutte Contre les Cancers et les leucémies de l'Enfant et de l'adolescent (SFCE) for their support and Dr Guinebretière (Department of Pathology, Institut Curie-Centre René Huguenin, St Cloud, France) for providing human osteosarcoma sections.

This work was supported by grants from the Fédération Enfants et Santé (R12118HH), Ligue contre le cancer (R14148HH) and European Calcified Tissue Society (ECTS) (EEE09002HHHA). English was corrected by Laura Smales (BioMedEditing, Toronto, Canada).

The authors have no conflict of interest to declare

## References

- Aguilera, K.Y. & Brekken, R.A., 2014. Hypoxia Studies with Pimonidazole in vivo. *Bio-protocol*, 4(19). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27453908> [Accessed September 27, 2017].
- Allemani, C. 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). *Lancet* (London, England), 385(9972), pp.977–1010. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673614620389> [Accessed July 19, 2017].
- Aponte, P.M. & Caicedo, A., 2017. Stemness in Cancer: Stem Cells, Cancer Stem Cells, and Their Microenvironment. *Stem Cells International*, 2017, pp.1–17. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28473858> [Accessed September 27, 2017].
- Bartkova, J. et al., 2006. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature*, 444(7119), pp.633–637. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17136093> [Accessed September 27, 2017].
- Ben-Porath, I. et al., 2008. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nature Genetics*, 40(5), pp.499–507. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18443585> [Accessed July 18, 2017].
- Chen, Y.-C. et al., 2009. Aldehyde dehydrogenase 1 is a putative marker for cancer stem cells in head and neck squamous cancer. *Biochemical and biophysical research communications*, 385(3), pp.307–13. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X0900967X>.
- Chibon, F. et al., 2010. Validated prediction of clinical outcome in sarcomas and multiple types of cancer on the basis of a gene expression signature related to genome complexity. *Nature Medicine*, 16(7), pp.781–787.
- Dieudonné, F.X. et al., 2010. High Wnt signaling represses the proapoptotic proteoglycan syndecan-2 in osteosarcoma cells. *Cancer Research*, 70(13), pp.5399–5408.
- Dieudonné, F.X. et al., 2012. Targeted inhibition of T-cell factor activity promotes syndecan-2 expression and sensitization to doxorubicin in osteosarcoma cells and bone tumors in mice. *Journal of Bone and Mineral Research*, 27, pp.2118–2129.
- Doyle, L.A., 2014. Sarcoma classification: An update based on the 2013 World Health Organization Classification of Tumors of Soft Tissue and Bone. *Cancer*, 120(12), pp.1763–1774. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24648013> [Accessed August 8, 2017].
- Eide, C.A. & Druker, B.J., 2017. Understanding cancer from the stem cells up. *Nature Medicine*, 23(6), pp.656–657. Available at: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nm.4353> [Accessed June 15, 2017].
- Fujii, H. et al., 2009. Sphere-forming stem-like cell populations with drug resistance in human sarcoma cell lines. *International journal of oncology*, 34(5), pp.1381–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19360350> [Accessed July 19, 2017].
- Gao, X. et al., 2014. A proposed quantitative index for assessing the potential contribution of reprogramming to cancer stem cell kinetics. *Stem cells international*, 2014, p.249309. Available at: <http://www.hindawi.com/journals/sci/2014/249309/> [Accessed August 8, 2017].
- García-Prat, L. et al., 2016. Autophagy maintains stemness by preventing senescence. *Nature*, 529(7584), pp.37–42. Available at: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature16187>

- [Accessed June 26, 2017].
- Gibbs, C.P. et al., 2005. Stem-like cells in bone sarcomas: implications for tumorigenesis. *Neoplasia* (New York, N.Y.), 7(11), pp.967–76. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1502023&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 4, 2015].
- Glinsky, G. V., 2008. “Stemness” Genomics Law Governs Clinical Behavior of Human Cancer: Implications for Decision Making in Disease Management. *Journal of Clinical Oncology*, 26(17), pp.2846–2853. Available at: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2008.17.0266> [Accessed July 18, 2017].
- Grimshaw, M.J. et al., 2008. Mammosphere culture of metastatic breast cancer cells enriches for tumorigenic breast cancer cells. *Breast Cancer Research*, 10(3), p.R52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18541018> [Accessed September 27, 2017].
- He, A. et al., 2012. CD133 expression predicts lung metastasis and poor prognosis in osteosarcoma patients: A clinical and experimental study. *Experimental and therapeutic medicine*, 4(3), pp.435–441. Available at: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/etm.2012.603> [Accessed July 19, 2017].
- Höckel, M. & Vaupel, P., 2001. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(4), pp.266–76. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11181773> [Accessed July 19, 2017].
- Kang, C. et al., 2015. The DNA damage response induces inflammation and senescence by inhibiting autophagy of GATA4. *Science* (New York, N.Y.), 349(6255), p.aaa5612. Available at: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.aaa5612> [Accessed September 27, 2017].
- Lee, S.-J. et al., Increased expression of calpain 6 in uterine sarcomas and carcinosarcomas: an immunohistochemical analysis. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society*, 17(1), pp.248–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17291261> [Accessed June 19, 2017].
- Lesluyes, T. et al., 2016. RNA sequencing validation of the Complexity INdex in SARComas prognostic signature. *European Journal of Cancer*, 57, pp.104–111.
- Liu, Y. et al., 2016. miR-449a promotes liver cancer cell apoptosis by downregulation of Calpain 6 and POU2F1. *Oncotarget*, 7(12), pp.13491–501. Available at: <http://www.oncotarget.com/abstract/4821> [Accessed June 19, 2017].
- Magee, J.A., Piskounova, E. & Morrison, S.J., 2012. Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty. *Cancer cell*, 21(3), pp.283–96. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1535610812000864> [Accessed July 19, 2017].
- Marion, A. et al., 2012. Calpain-6 is an endothelin-1 signaling dependent protective factor in chemoresistant osteosarcoma. *International journal of cancer*, 130(11), pp.2514–25. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.26246> [Accessed June 19, 2017].
- Mathieu, J. et al., 2011. HIF induces human embryonic stem cell markers in cancer cells. *Cancer research*, 71(13), pp.4640–52. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3129496&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 1, 2016].
- Miyazaki, T. et al., 2016. Calpain-6 confers atherogenicity to macrophages by dysregulating pre-mRNA splicing. *The Journal of clinical investigation*, 126(9), pp.3417–32. Available at: <https://www.jci.org/articles/view/85880> [Accessed June 19, 2017].
- Pattabiraman, D.R. & Weinberg, R.A., 2014. Tackling the cancer stem cells ? what challenges do they pose? *Nature Reviews Drug Discovery*, 13(7), pp.497–512. Available at:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24981363> [Accessed June 15, 2017].
- Petruzzelli, R. et al., 2014. HIF-2 $\alpha$  Regulates NANOG Expression in Human Embryonic Stem Cells following Hypoxia and Reoxygenation through the Interaction with an Oct-Sox Cis Regulatory Element S. Rocha, ed. PLoS ONE, 9(10), p.e108309. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25271810> [Accessed July 19, 2017].
- Ran, X., Zhou, P. & Zhang, K., 2017. Autophagy plays an important role in stemness mediation and the novel dual function of EIG121 in both autophagy and stemness regulation of endometrial carcinoma JEC cells. *International Journal of Oncology*, 51(2), pp.644–656. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28656197> [Accessed July 20, 2017].
- Rho, S.B. et al., 2008. Calpain 6 supports tumorigenesis by inhibiting apoptosis and facilitating angiogenesis. *Cancer letters*, 271(2), pp.306–13. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304383508005004> [Accessed June 19, 2017].
- Sharpless, N.E. & DePinho, R.A., 2005. Cancer: Crime and punishment. *Nature*, 436(7051), pp.636–637. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16079829> [Accessed September 27, 2017].
- Suva, M.-L. et al., 2009. Identification of Cancer Stem Cells in Ewing’s Sarcoma. *Cancer Research*, 69(5), pp.1776–1781. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19208848> [Accessed July 19, 2017].
- Tonami, K. et al., 2011. Calpain-6, a microtubule-stabilizing protein, regulates Rac1 activity and cell motility through interaction with GEF-H1. *Journal of cell science*, 124(Pt 8), pp.1214–23. Available at: <http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.072561> [Accessed June 19, 2017].
- Tonami, K. et al., 2013a. Calpain-6 Deficiency Promotes Skeletal Muscle Development and Regeneration. *PLoS Genetics*, 9(8), pp.1–11.
- Tonami, K. et al., 2013b. Calpain-6 deficiency promotes skeletal muscle development and regeneration. G. A. Cox, ed. *PLoS genetics*, 9(8), p.e1003668. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1003668> [Accessed June 19, 2017].
- Tonami, K. et al., 2007. Calpain 6 is involved in microtubule stabilization and cytoskeletal organization. *Molecular and cellular biology*, 27(7), pp.2548–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17210638> [Accessed June 19, 2017].
- Valent, P. et al., 2012. Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details. *Nature Reviews Cancer*, 12(11), pp.767–775. Available at: <http://www.nature.com/doi/finder/10.1038/nrc3368> [Accessed June 19, 2017].
- Wang, Y. et al., 2013. Endogenous miRNA Sponge lincRNA-RoR Regulates Oct4, Nanog, and Sox2 in Human Embryonic Stem Cell Self-Renewal. *Developmental Cell*, 25(1), pp.69–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23541921> [Accessed August 8, 2017].
- Yang, Y. et al., 2017. Autophagy regulates the stemness of cervical cancer stem cells. *Biologics: Targets and Therapy*, Volume 11, pp.71–79. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28684898> [Accessed July 20, 2017].
- Zaidi, S.K. et al., 2017. Bivalent Epigenetic Control of Oncofetal Gene Expression in Cancer. *Molecular and Cellular Biology*, p.MCB.00352-17. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28923849> [Accessed September 27, 2017].

## Figure legends

**Figure 1: Calpain-6-expressing cells are tumor-initiating cells.** (A-C) Fluorescence microscopy of Calp6-P-GFP K7M2 cells. (B) RT-PCR analysis of calpain-6 mRNA expression in sorted Calp6-P-GFP<sup>-</sup> and GFP<sup>+</sup> K7M2 cells. Data are mean  $\pm$  SEM from 3 independent RNA extracts by two-tailed Student t test. (C) Immunofluorescence of luciferase-expressing cells (tumor cells) in sections of bone injected with unsorted Luc-Calp6-P-GFP or sorted Luc-Calp6-P-GFP<sup>+</sup> or GFP<sup>-</sup> K7M2 cells. The bones were collected 6 weeks post-implantation. Bone tissues from non-injected mice were a control. (D) Quantification of bioluminescent signal in tibias of Luc-Calp6-P-GFP K7M2-implanted mice during tumor growth. n= 6 mice/group. (E) Typical images of the bioluminescent signal in tibias of K7M2-implanted mice. (F) Representative photos of H&E stained lung sections from mice implanted for 6 weeks with unsorted Calp6-P-GFP or sorted Calp6-P-GFP<sup>-</sup> or GFP<sup>+</sup> K7M2 cells. (G) Metastasis number. (H) Metastasis area. n=5 mice (unsorted Calp6-P-GFP K7M2 cells), n=8 mice (sorted Calp6-P-GFP<sup>-</sup> or GFP<sup>+</sup> K7M2 cells). Data are mean  $\pm$  SEM. Two-tailed ANOVA test. (I) Cristal violet staining of K7M2 cells in lung cell cultures. Each well was seeded with lung cells from a K7M2 bone-implanted mouse. Arrows indicates cell clones.

**Figure 2: Calpain-6-expressing cells are at the top of the cellular hierarchy.** (A,B) Analyses of cell cycle in Calp6-P-GFP<sup>-</sup> and GFP<sup>+</sup> 143B cells (A) and K7M2 cells (B). (C,D) Flow cytometry of the proliferation marker Ki67 in 143B cells (C) and K7M2 cells (D). Data are mean fluorescence intensity. (E) Flow cytometry of Calp6-P-GFP<sup>-/+</sup> cells 5 days after seeding of unsorted, sorted Calp6-P-GFP<sup>-</sup> or GFP<sup>+</sup> 143B cells. (F) H&E of K7M2 and Calp6-P-GFP<sup>+</sup> K7M2 cell-derived tumors. (G,H) Fluorescence microscopy of GFP in little spheres (left panel) and large spheres (right panel) of 143B cells (G) and K7M2 cells (H). (I,J) Stem-cell colony-

formation assays with 143B cells (I) and K7M2 cells (J). Data are mean  $\pm$  SEM from 3 independent cultures of 143B cells, and 4 independent cultures of K7M2 cells compared by two-tailed Student t test.

**Figure 3: Oct4, Sox2 and Nanog mediate calpain-6 upregulation by hypoxia.** (A) Regulatory sequence in 5' upstream ATG in CAPN6. Consensus sites for Nanog, Oct4 and Sox2 are indicated. Shaded text indicates putative promoters. (B) ChIP of genomic DNA from 143B cells with control Ig, anti-Oct-4, anti-Sox2 or anti-Nanog antibodies. Cells were cultured in 21% or 3% O<sub>2</sub>. Immunoprecipitated chromatin was analyzed in agarose gels or by qPCR. Data are mean  $\pm$  SEM from 3 different immunoprecipitations by two-tailed Student t test. a1=0.063, a2=0.169, a3=0.073, a4=0.053 and a5=0.023, a6=0.0318 are p values comparing to mock immunoprecipitation. (C) RT-qPCR and western blot analysis of calpain-6 in 143B and K7M2 cells cultured in 21% or 3% O<sub>2</sub>. Data are mean  $\pm$  SEM of 3 extracts from different cultures. (D) Representative immunofluorescence of calpain-6 and hypoxyprombe on sections of K7M2 cell-derived bone tumor. (E) Representative immunofluorescence of calpain-6 and HIF-1 $\alpha$  in sections of human osteosarcoma. (F) RT-qPCR analysis of calpain-6 mRNA expression in 143B cells transfected with control, Oct-4, Sox2 or Nanog siRNA in 143B cells cultured in 21% or 3% O<sub>2</sub>. (G) RT-qPCR analysis of calpain-6 mRNA expression in 143B cells transfected with empty vector or Oct-4, Sox2 and/or Nanog coding vectors. Data are mean  $\pm$  SEM of 3 extracts from different cultures compared by two-tailed Student t test. a1=0.048, a2=0.001, a3=0.005, a4=0.008, a5=0.0007, a6=0.048, a7=0.037, a8=0.001, a9=0.006, a10=0.001 are p values comparing to control cells in 21% O<sub>2</sub>. b1=0.007, b2=0.009, b3=0.006 are p values comparing to control cells in 3% O<sub>2</sub>.

**Figure 4: Calpain-6 knockdown inhibits tumorigenesis.** (A,B) RT-qPCR of calpain-6 in control and calpain-6 knockdown (calpain-6<sup>KD</sup>) K7M2 cells (A) and 143B (B) cells cultured in

21% or 3% O<sub>2</sub>. (C) Mean bioluminescence intensity in control and calpain-6<sup>KD</sup> K7M2 cell-implanted mice. n=6 mice/group. (D) Mean bioluminescence intensity in tibias of control and calpain-6<sup>KD</sup> 143B cell-implanted mice. n=5 mice/group. (E,F) Kaplan-Meier survival curves for mice implanted with K7M2 (E) and 143B (F) cells. (G) Flow cytometry of Calp-6-GFP+ cells in calpain-6<sup>KD</sup> 143B and TC71 cell populations. 50 000 cells were analyzed. Data are mean ± SEM.

**Figure 5: Calp6-P-GFP+ cells are less prone to enter senescence.** (A,B) Senescence-associated secretory phenotype (SASP) gene expression in tumors with and without calpain-6 expression from transcriptomic analyses in sarcomas of soft tissues. (A) RNA sequencing. Cutoff=1 for calpain-6 expression. n=71 tumors calpain-6<1, n=24 tumors calpain-6>1. (B) Affymetrix RNA microarray. Calpain-6 expression cutoff is 3. n=239 tumors calpain-6<3, n=100 tumors calpain-6>3. Data are median; box edges are interquartile range; whiskers are range. p values are from two-tailed Mann-Whitney U test (C) Detection of senescence-associated β-Galactosidase (SA-β-Gal) activity in Calp6-P-GFP- and GFP+ 143B cells and K7M2 cells. Membrane GFP was revealed by immunohistochemistry. (D) Flow cytometry of SA-β-Gal activity in Calp6-P-GFP- and GFP+ 143B, TC71 and K7M2 cells and quantification. Data are mean ± SEM from n=34 980 (143B), 35 150 (TC71) and 33 282 (K7M2) GFP- cells; n= 9 630 (143B), 7 243 (TC71) and 13 390 (K7M2) GFP+ cells. a1<10<sup>-8</sup> a2<10<sup>-8</sup> and a3<10<sup>-8</sup> are p values (GFP-/ + cells) determined by two-tailed Student t test. (E) Western blot analysis of GATA4 in control and calpain-6<sup>KD</sup> 143B cells. Data are mean ± SEM from 3 independent blots evaluated by two-tailed Student t test. Actin was a loading control. (F) Representative immunofluorescence of GFP and GATA4 in Calp6-P-GFP 143B cells. Data are mean ± SEM for 100 cells evaluated by two-tailed Student t test. White and green arrows indicate GFP- and GFP+ cells.

**Figure 6: Calpain-6 controls autophagy in sarcoma stem cells.** (A) Representative immunofluorescence of GFP and LC3 punctuates in Calp6-P-GFP 143B cells and quantification with and without bafilomycin A treatment. Data are mean  $\pm$  SEM for 100 cells evaluated by two-tailed Student t test. White and green arrows indicate GFP- and GFP+ cells. (B) Flow cytometry and quantification of LC3 accumulation with and without bafilomycin A treatment ( $\Delta$ LC3) in 143B cells. n=25 000 GFP- cells n=3 800 GFP+ cells. (C) Representative immunofluorescence of calpain-6 and Lamp2 in sections of human osteosarcomas. White and red arrows indicate calpain-6<sup>-</sup> and calpain-6<sup>+</sup> cells. (D)  $\Delta$ LC3 quantification in control and calpain-6<sup>KD</sup> 143B cells. n=50 000 cells. (E)  $\Delta$ LC3 quantification in control and calpain-6-overexpressing cells. n=50 000 cells. Data are mean  $\pm$  SEM from 3 independent blots evaluated by two-tailed Student t test. (F) Schematic of calpain-6 participating in the promoting effect of hypoxia on autophagy and the preventing effect on senescence, thereby controlling sarcoma stem-cell fate.

## Methods

**Osteosarcoma and Ewing sarcoma cells.** Human 143B and U2OS and murine K7M2 osteosarcoma cell lines, human PC3 prostate and MDA-MB-231 breast adenocarcinoma cell lines were obtained from ATCC. Ewing Sarcoma TC71 cells were kindly provided by Dr. Didier Surdez (Institut Curie, Paris, France). The different cell types were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% of fetal calf serum (FCS) and antibiotics (100 IU/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin). The cells were transfected using Transfast reagent (Promega). Lentiviral particles were prepared in 293T cells using the Lentiviral Packaging Plasmid kit (Cellecta) and then mixed with FSC-free medium containing 1µl/ml polybrene for transductions. For stable genomic integration of exogenous DNA, transfected or transduced cells were selected with G418 (Gibco) or Blastidicin (Invitrogen). To block autophagy process the cells were treated for 4 hours with 10 nM Bafilomycin A1 (Sigma Aldrich).

**Calp6-P constructions.** The promoter sequences in CAPN6 were extracted from the 5' region upstream the ATG codon and transcription factor analysis was performed using Genomatix/MatInspector softwares. To determine the transcription start site we used the SMARTer RACE cDNA Amplification Kit (Clontech). The 6988 bp in 5' upstream of ATG were amplified using PAC RCPI-6 (Lifetechnologies) as template and cloned between the BamHI-EcoRV sites in pcDNA3.1zeo (Clontech) and then subcloned into the Kpn1-XhoI sites in pGL4.10 (Promega) or in the Kpn1-BamHI sites in pZsGreen1-1 (Clontech). Then pzsGreen sequence was replaced by membrane GFP using the In-Fusion cloning kit (Clontech). The different constructions were checked by sequencing. The primers that were used for amplifications are listed in supplementary Table I.

**Gene knockdown.** To selectively inhibit HIF-1 $\alpha$ , Oct4, Sox2 or Nanog, sarcoma cells were transiently transfected with control or specific siRNA (Santa Cruz Biotechnology). Calpain-6 expression was suppressed in mouse sarcoma cells using a set of plasmids (Santa Cruz Biotechnology) coding crRNAs and Cas9 for double nicking of Capn6. Two different single crRNA cloned into the pLentiCRISPR v2 (GenScript) were tested for calpain-6 knockdown in human cells. The crRNA targeting exon 2 (TGATGACCCCCATCTGATTG) showed the higher ability to decrease calpain-6 expression.

**Gene expression.** Calpain-6 expressing lentiviral vector was constructed as previously described (Dieudonné et al. 2010). Pre-made lentiviral particles were used for luciferase expression under the control of EF1 $\alpha$  promoter (LVP433 Amsbio).

**Sphere formation assay.** Cells were plated at a density of  $10^6$  cells in 75cm<sup>2</sup> ultralow attachment flasks (Corning Inc) and cultured in serum-free xeno-free DMEM/F12 containing Essential 8 supplement (ThermoFisher Scientific). This medium is optimized for pluripotent stem cell culture. At day 7, the spheres were dissociated and re-plated in the same conditions. Floating colonies were analyzed using a fluorescent Zeiss microscope interfaced with the software ZenPro. To quantify sphere formation, sarcoma cells (3000 cells/well) were plated on Geltrex matrix-coated ultralow attachment plates and cultured in the same condition as for the sphere formation assay. Geltrex (ThermoFisher) is a soluble form of reduced growth factor basement membrane extract that allowed for cell attachment. The cell colonies were stained using crystal violet and analyzed with an Evos cell imaging system (ThermoFisher Scientific).

**Transactivation assays.** Sarcoma cells were seeded in 24-well plates and transfected with 1.5 $\mu$ g Calp6-P-LUC or empty pGL4.10 plasmid with 2.5ng/well pRL-SV40, a Renilla expression

plasmid serving as internal transfection control. Firefly and Renilla luciferase activities were measured sequentially using Luciferase Reporter Assay System (Promega) 24 hr after transfection. Luciferase activity was normalized to Renilla activity and to values obtained with cells transfected with empty pGL4.10.

**Chromatine immunoprecipitation.** To test binding of Oct4, Sox2 and Nanog to Calp6-P we used the Stem Cell Master Regulator Assay kit (Cell Signaling). Briefly, the cells were fixed with 1% formaldehyde in the medium, genomic DNA was extracted, fragmented by sonication and incubated with specific antibodies or control immunoglobulin for immunoprecipitation on magnetic beads. Immunoprecipitated DNA or control inputs were then amplified using Calp6-P specific primers (Supplementary Table I).

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

**RT-qPCR analysis.** Total RNA were isolated using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA). 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, IN). Actin and PPi $\alpha$  or Actin and HPRT served as housekeeping genes. Fold changes were normalized using the  $\Delta\Delta C_t$  formula.

**SA- $\beta$ -galactosidase activity.** For in situ determination of SA- $\beta$ -galactosidase activity the cells were washed in phosphate saline buffer, fixed with 1% formaldehyde and 0.2% glutaraldehyde and incubated for 24 hours at 37 °C in freshly prepared staining buffer (5 mM K<sub>3</sub>Fe[CN]<sub>6</sub>, 5 mM K<sub>4</sub>Fe [CN]<sub>6</sub>, and 2 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 6) containing 1 mg /mL X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside). The cells were then fixed with 4% paraformaldehyde for immunocytochemistry. To determine SA- $\beta$ -galactosidase activity using flow cytometry, the cells were cultured in the presence of 33  $\mu$ M 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (MUGal, Sigma Aldrich) for 2hrs.

**Immunocytochemistry.** Sarcoma cells were cultured on sterile coverslips and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS. Slices of formalin-fixed and paraffin-embedded osteosarcoma tissues from surgically resected tumor of 5 patients after preoperative chemotherapy were kindly provided by Dr. Guinebretière (Department of Pathology, Institut Curie-Centre René Huguenin, St Cloud, France). Informed consent was obtained from each patient or the patient's guardian. Mouse and human tissue sections were deparaffinized, incubated with blocking buffer and then with primary antibodies (listed in table II). The secondary antibodies consisted in DyLight-550 or -480 conjugated anti- IgG (Pierce). Nuclei were counterstained with DAPI at 0.1  $\mu$ g/ml (Life Technologies). For chromogenic detection, ImmPRESS HRP polymer detection kit anti-goat (Vector labs) was used and the coloration was carried out using DAB HRP substrate (Vector Labs).

**Flow cytometry analyses.** For intracellular staining the cells were fixed and permeabilized using Fix-Perm kit (eBiosciences) before incubation with the antibodies. 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). A representative gating strategy is shown in supplementary Fig. 4.

**Transcriptomic analysis.** The FSG database, which is part of the Conticabase ([www.conticabase.org](http://www.conticabase.org)), was previously described (Chibon et al. 2010; Lesluyes et al. 2016). It contains data from adult soft tissue sarcomas treated in 11 centers, including a description of subjects, primary tumors, treatment, follow-up and availability of tumor samples. Every case was histologically reviewed by the pathologist subgroup and classified according to the 2002 World Health Organization classification by histology, immunohistochemistry and molecular genetics and cytogenetics when needed. We selected two cohorts of soft tissue sarcomas with no recurrent chromosomal translocations and for which a frozen tissue of the primary untreated tumor was available. According to French law at the time of the study, experiments were performed in agreement with the Bioethics Law 2004 800 and the Ethics Charter from the National Institute of Cancer; all subjects signed a nonopposition statement for research use of the sample. Gene expressions were analyzed from a microarray experiment using GeneChip human genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix) that has been deposited at Gene Expression Omnibus with accession number GSE21050 or from RNA-seq expressions available on Gene Expression Omnibus under accession GSE71119.

**Mouse osteosarcoma model.** S/SPF BALB/cByJ and S/SOPF SWISS NU/NU mice were purchased from Charles River Breeding Laboratories. They were 4-5 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 (No.CCEA70 Date APAFIS #6947). Bone tumors were obtained by injecting the cells into the right tibia of the mice as previously described (Dieudonné et al. 2012). Mice

were anesthetized with a Ketamine/Xylazine mix (100/50 mg/kg), the right tibia was drilled and a needle was inserted to inject the cell suspension ( $5 \times 10^3$ - $5 \times 10^4$  cells in 5  $\mu$ l). Tumor growth was monitored in live animal every week by bioluminescence imaging, using D-Luciferin (Promega). Image acquisition was performed with the ONYX™ dark box system (Stanford Photonics, Inc). Animals were sacrificed 6 weeks after tumor inoculation. For histological analysis, resected bone and lung specimens were fixed in 4% paraformaldehyde and paraffin embedded for immunofluorescence or H&E staining.

**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 ImageJ software.

**Statistics.** Data are presented as mean  $\pm$  S.E.M. Every experiment was performed at least three times. Statistical analysis was performed using unpaired two-sided Student's t test. GraphPad and LePAC softwares were used for the statistical analyses.

**Supplementary Figure 1: Identification of the active promoter and characterization of the regulatory sequence in the 5' sequence upstream coding region in CAPN6.** (A) Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) was performed with mRNA extracts from U2OS and 293T cells. The internal primer was CTTTCGGGTAGCCACGAGCCAGGT to amplify the 5' end of the calpain-6 cDNA. (B) The longer PCR product (arrow) was cloned and sequenced. The sequence was aligned with the CAPN6 gene sequence showing that the mRNA originates from the distal promoter. Black letters are fragments of the CAPN6 sequence (Gene ID: 827; NC\_000023.11) with putative distal and proximal promoters separated with the dotted line. Red letters are the sequence from the RACE experiment. (C) mRNA origin in the distal promoter was checked by RT-PCR with RNA extracts from U2OS, 143B and SaOS2 cell lines. F1 is the forward primer in the proximal promoter (promoter 1), F2 is the forward primer in the distal promoter (promoter 2), R is the reverse primer. Actin was a housekeeping gene.

**Supplementary Figure 2: The transactivation activity of Calp6-P is regulated by ET-1 depending on activation of the NF- $\kappa$ B pathway.** (A) The 6 988-bp sequence upstream ATG was cloned in the pGL4.10 vector (Promega). (B) Sarcoma cells were seeded in 24-well plates and transfected with the empty pGL4.10 plasmid or Calp6-P reporter construct with phRL-SV40, a renilla expression plasmid that served as internal control. At 24 hr after transfection, cells were cultured for 6 hr in serum-free medium, then treated with 1  $\mu$ g/mL endothelin 1 (ET-1). Renilla and luciferase activity was measured by using chemoluminescent substrates. Data are mean  $\pm$  SEM from 4 wells evaluated by two-sided Student t test. RLU, relative light units.

**Supplementary Figure 3: Calpain-6 and GFP expression are associated in human Calp6-P-GFP cells.** (A) Diagrammatic representation of the Calp6-P-GFP transgene. The reporter

construct consisted in a sequence coding membrane GFP controlled by the calpain-6 regulatory sequence (Calp6-P). Sarcoma cells were transfected with this construction and selected with neomycin for stable integration. GFP expression was monitored by fluorescence microscopy. Calp6-P-GFP 143B cells were sorted according to GFP expression by flow cytometry in ImagoSeine platform (Paris Diderot University, Paris, France). **(B)** RT-PCR analysis of calpain-6 mRNA expression in sorted Calp6-P-GFP<sup>-</sup> and GFP<sup>+</sup> 143B cells. Data are mean  $\pm$  SEM from 3 independent RNA extracts evaluated by two-sided Student t test. **(C)** Western blot analysis of calpain-6 protein level with protein extracts from Calp6-P-GFP<sup>+</sup>, GFP<sup>-</sup> and unsorted cells. GAPDH was a loading control.

**Supplementary Figure 4: Switch in G2/M at the expense of G0/G1 and increased proliferation for calpain-6-expressing human TC71 Ewing cells.** **(A-E)** Flow cytometry of DNA content in Calp6-P-GFP<sup>-</sup> and GFP<sup>+</sup> cells. **(A)** Gating strategy to select Calp6-P-GFP<sup>-</sup> and GFP<sup>+</sup> cells. Starting number of cells was 50 000. The selected cells in P2 were analyzed for GFP expression. P3 and P4 contained 32 278 GFP<sup>-</sup> and 7684 GFP<sup>+</sup> cells, respectively. **(B)** Dye Cycle Violet fluorescence was measured for GFP<sup>-</sup> and GFP<sup>+</sup> cells. Cell cycle phases were determined according to DNA content. **(C)** The proportion of cells in each phase. **(D)** Calp6-P-GFP TC71 cells were labeled with a PeCy7-conjugated anti-Ki67 antibody. Mean fluorescence intensity (MFI) of Ki67 labeling for GFP<sup>-</sup> or GFP<sup>+</sup> TC71 cells. N=50 000 cells. Means were compared by two-sided Student t test.

**Supplementary Figure 5: Calp6-P-GFP<sup>+</sup> cell population is stable in confluent cultures but decreases during cell growth.** **(A)** The proportion of Calp6-P-GFP<sup>+</sup> cells analyzed in the cell lines indicated. Cells were seeded at 500 000 cells/flask and cultured for 7 days. Some cells were analyzed for GFP expression and the others were seeded again. This was repeated 3 times (P1, P2 and P3). Control cells did not have the GFP-reporter system. **(B,C)** Flow cytometry of cell

divisions. 143B cells (B) or K7M2 cells (C) were seeded at low density and labeled with PE-conjugated PKH26. Fluorescence of this membrane marker and GFP expression are reported at day 1, 2, 4 and 7. (D) Flow cytometry of the proportion of Calp6-P-GFP<sup>+</sup> cells in adherent confluent culture and in large spheres comprising more than 50 cells. 50 000 cells were used as a starting cell population.

**Supplementary Figure 6: Increased Oct4 and Nanog expression in hypoxia depends on the stem-cell pathway involving Oct4, Nanog and Sox2.** (A-C) RT-PCR analysis of siRNA inhibition of Oct4, Sox2, Nanog or HIF-1 $\alpha$  on the hypoxia-dependent induction of Nanog (A) and Oct4 (B) and Sox2 (C). Data are mean  $\pm$  SEM in 3 independent wells evaluated by two-sided Student t test. a1=0.041; a2=0.0006; a3= 0.078 are p values comparing cells cultured in 21% and 3% O<sub>2</sub>. (D) Scheme of the regulation circuitry of stem-cell transcription factors by hypoxia in sarcoma cells.

**Supplementary Figure 7: Hypoxia increases Calp6-P transactivation activity and calpain-6 expression.** (A-B) Western blot analysis of calpain-6 and GFP protein levels from Calp6-P-GFP 143B (A) and K7M2 (B) cells. Cells were cultured for 24 hr with 21% or 3% O<sub>2</sub>. Tubulin was a loading control. (C) Western blot analysis of calpain-6 protein level in cell lines cultured with 21% and 3% O<sub>2</sub>. Actin was a loading control.

**Supplementary Figure 8: Calpain-6 knockdown reduces stem cell colony formation.** (A) Immunofluorescence of calpain-6 (red) in control and calpain-6 knockdown (calpain-6<sup>KD</sup>) by RNA-guided CRISPR-Cas9 in K7M2 cells. (B) Western blot analysis of calpain-6 protein level in control and calpain-6<sup>KD</sup> 143B cells. Actin was a loading control. (C-D) Control or calpain-6<sup>KD</sup> human 143B (C) or TC71 (D) cells were seeded on non-adherent plastic coated with a growth factor-free matrix for cell attachment and cultured in serum-free stemcell medium. Data are mean  $\pm$  SEM of 4 independent wells evaluated by two-sided Student t test.

**Supplementary Figure 9: Calpain-6 deficiency is associated with increased senescence.**

(A,B) RT-qPCR analyses of mRNA levels of senescence markers in sorted Calp6-P-GFP<sup>-</sup> and GFP<sup>+</sup> human sarcoma 143B cells (A) or mouse K7M2 cells (B). (C) RT-qPCR analyses of mRNA levels of SASP genes in control and calpain-6<sup>KD</sup> 143B cells. Data are mean  $\pm$  SEM of 3 independent cell extracts evaluated by two-sided Student t test. (D) Representative photos of senescence-associated SA- $\beta$ -gal<sup>+</sup> cells in confluent control and calpain-6<sup>KD</sup> 143B cells from 4 cultures. Scale bars, 400  $\mu$ m. (E) Quantification of SA- $\beta$ -gal<sup>+</sup> cells in control and calpain-6 KD K7M2 cells. Data are mean  $\pm$  SEM of 3 cultures evaluated by two-sided Student t test.

**Supplementary Fig. 10: High autophagy in calpain-6 expressing cells.**

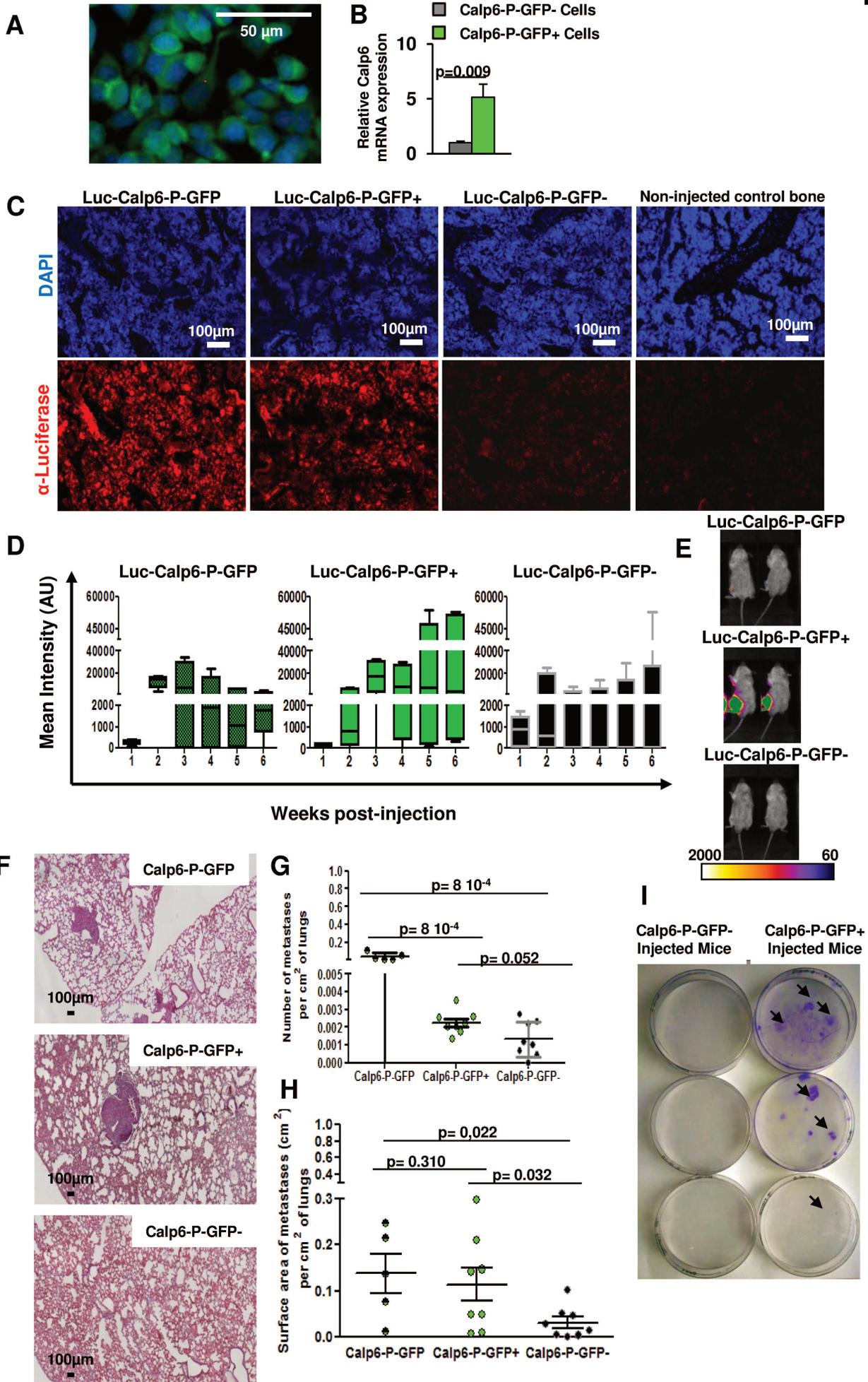
(A) Quantification of p62 punctuates in 143B cells cultured in 3% O<sub>2</sub>. White and green arrows indicate GFP<sup>-</sup> and GFP<sup>+</sup> cells. Data are mean  $\pm$  SEM in 150 Calp6-P-GFP<sup>-</sup> and GFP<sup>+</sup> cells by two-sided Student t test. (B) Western blot analysis of autophagosomes-associated form of LC3, LC3-II, in protein extracts from sorted 143B Calp6-GFP<sup>-</sup> and GFP<sup>+</sup> cells. (C) Flow cytometry quantification of  $\Delta$ LC3 in mouse Calp6-P-GFP<sup>-</sup> and GFP<sup>+</sup> K7M2 cells. n=89 000 GFP<sup>-</sup> cells n=3 300 GFP<sup>+</sup> cells. (D) Flow cytometry quantification of  $\Delta$ LC3 in human Ewing Calp6-P-GFP<sup>-</sup> and GFP<sup>+</sup> TC71 cells. n=40 000 GFP<sup>-</sup> cells n=6 500 GFP<sup>+</sup> cells. (E) Flow cytometry quantification of  $\Delta$ LC3 in control and calpain-6<sup>KD</sup> TC71 cells. n=50 000 control or calpain-6 KD cells. Cells were cultured in 3% O<sub>2</sub>. Data are mean  $\pm$  SEM; p values determined by two-sided Student t test.

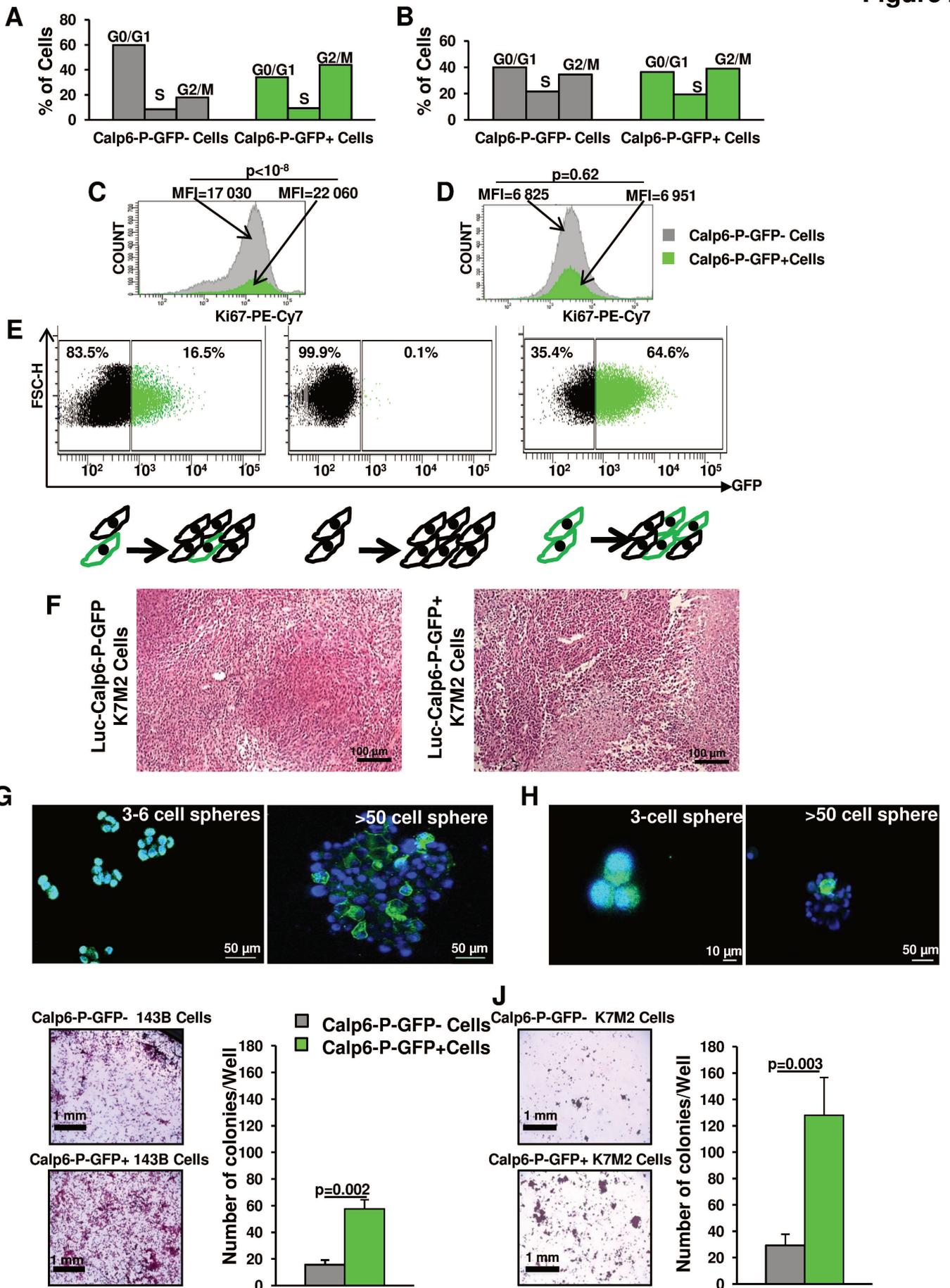
**Supplementary data. Table I : The list of primers**

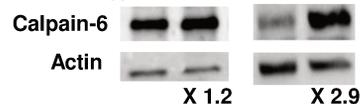
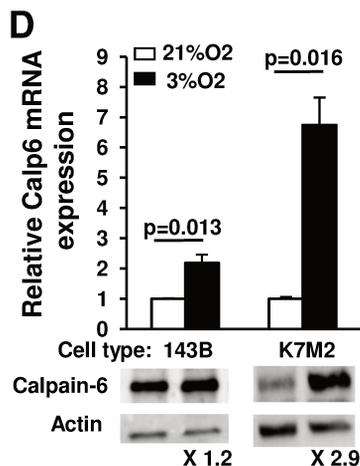
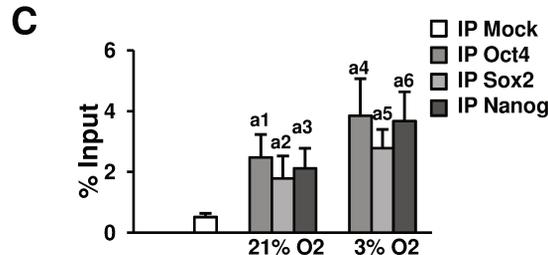
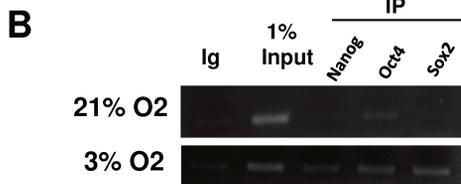
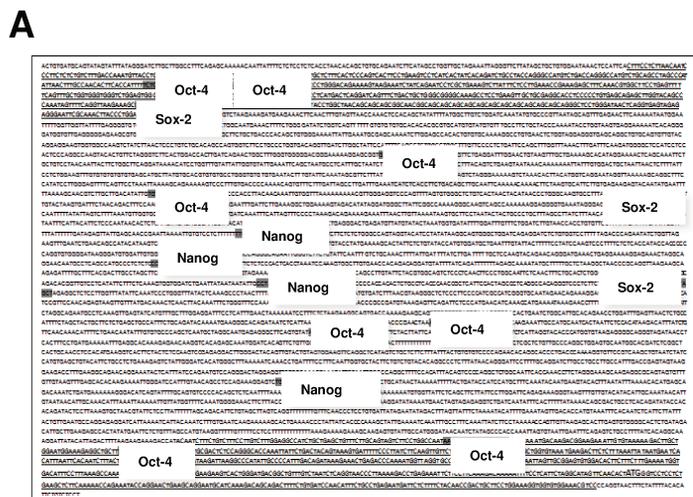
			<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>
PCR	RACE	CAPN6		5'-CTTTCGGGTAGCCACGAGCCAGGT-3'
	TSS Checking	F1	5'-CCTCATTCTAGGCATAGTTCAACAC-3'	5'-TGACTTGTGTGCCACCATT-3'
		F2	5'-TGGGGTTACCTGGCTAACAG-3'	
Cloning	Calp6-P		5'-CGGGGTACCACTGTGATGCA GTATAGTATTTATAGGGA-3'	5'-TCCCCCGGGAGTGTGAACTATGCC TAGAATGAGGCCTCATTCTAGGC-3'
	mGFP		5'-AGCACAGTGGCGCCGCATTA AGGGTTCCGGATCATC-3'	5'-TCTAGAGTCGCGCCGCTTACTTGT ACAGCTCGTCC-3'
qPCR	Calpain-6	Human	5'-ATGATCCCCTGATGAACCGC-3'	5'-GTAAGTGCAGGTCCTTCT-3'
		Mouse	5'-TGCTGTTTCCACCTGCCTAA-3'	5'-TGGGATGTCAAGGCTAGACCA-3'
	Oct4	Human	5'-AGCCTGGGGTACCAAAATG-3'	5'-AGCGATCAAGCAGCGACTAT-3'
	Sox2	Human	5'-TTGCTGCCTCTTTAAGACTAGGA-3'	5'-CTGGGGCTCAAACCTTCTCTC-3'
	Nanog	Human	5'-TTCCTTCTCCATGGATCTG-3'	5'-CTTTGGGACTGGTGGAAAGAA-3'
	IL-1	Human	5'-TTCGAGGACAAGGCACAA-3'	5'-TGGCTGCTTCAGACACTTGAG-3'
	IL-8	Human	5'-GAGCCAGGAAGAAACCACCG-3'	5'-TGGCAAACTGCACCTCACA-3'
	IL-6	Human	5'-GGCACTGGCAGAAAACAACC-3'	5'-GCAAGTCTCCTCATTGAATCC-3'
	p16	Mouse	5'-CGGGGACATCAAGACATCGT-3'	5'-TGAGGCCGGATTTAGCTCTG-3'
	p21	Mouse	5'-GACCAGCCTGACAGATTTCTATC-3'	5'-TAAGGCCGAGATGGGGAAG-3'
	Actin	Human	5'-GAGAAGAGCTACGAGCTGCCTG-3'	5'-GGTAGTTTCGTGGATGCCACA-3'
	Actin	Mouse	5'-GGCTGTATTCCCCTCCATCG-3'	5'-CCAGTTGGTAACAATGCCATGT-3'
	HPRT	Mouse	5'-TGAAGCGCTGCCAGTATGT-3'	5'-GGTCGCTCAGAGCCTTGTA-3'
	PPi <sub>a</sub>	Human	5'-GTCAACCCACCGTGTCTT-3'	5'-CTGCTGTCTTTGGGACCTT-3'
GAPDH	Human	5'-CGAGATCCCTCCAAAATCAA-3'	5'-TGTGGTCATGAGTCCTTCCA-3'	
ChIP	Cap6-P	Human	5'-AGAGCTGGTACAGCCCAA-3'	5'-TCCAGGGTAAGTTGCGAAT-3'

**Supplementary data. Table II : The list of antibodies.** IF: Immunofluorescence; FC: Flow Cytometry; WB: Western Blot; IHC: Immunohistochemistry; ChIP: Chromatine ImmunoPrecipitation.

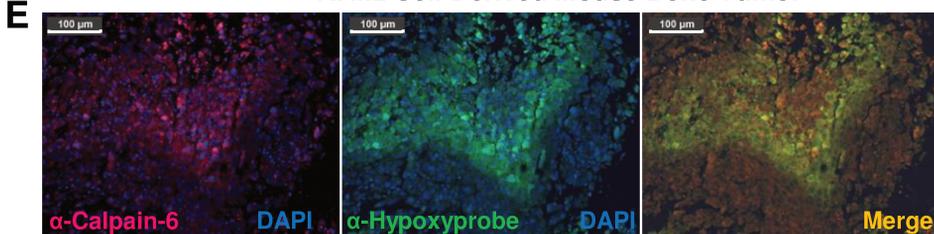
<b>Protein</b>	<b>Host</b>	<b>Supplier</b>	<b>Dilution</b>
Luciferase	Rabbit	Santa-Cruz	1:200 (IF)
Ki67	Rat	eBiosciences	1:200 (FC)
Calpain-6	Rabbit	Abxexa	1:10000 (WB)
	Goat	Santa-Cruz	1:100 (IF)
Pimonidazole Adducts	Mouse	Hypoxypore	1:100 (IF)
HIF-1 $\alpha$	Rabbit	Santa-Cruz	1:100 (IF)
GFP	Goat	Abcam	1:10000 (WB)
			1:500 (IHC)
GATA4	Mouse	Santa-Cruz	1:500 (WB)
			1:100 (IF)
Actin	Rabbit	Sigma-Aldrich	1:1000 (WB)
$\alpha$ Tubulin	Mouse	Santa-Cruz	1:1000 (WB)
GAPDH	Mouse	Santa-Cruz	1:1000 (WB)
LC3	Rabbit	Sigma-Aldrich	1:1000 (WB)
			1:200 (IF)
LC3-Biotin	Rabbit	Novus Biological	1:200 (FC)
Lamp2	Rat	Abcam	1:100 (IF)
Oct4	Rabbit	Cell signaling	1:50 (ChIP)
Sox2	Rabbit	Cell signaling	1:50 (ChIP)
Nanog	Rabbit	Cell signaling	1:50 (ChIP)
p62	Rabbit	Santa-Cruz	1:100 (IF)
Biotin	Mouse	Miltenyi	1:200 (FC)



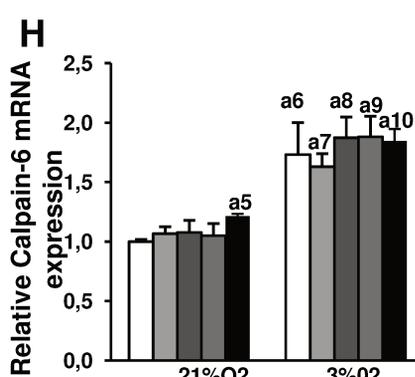
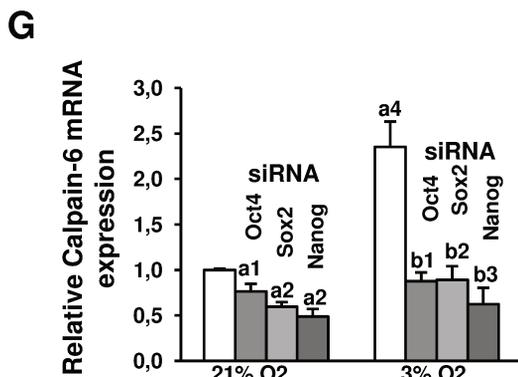
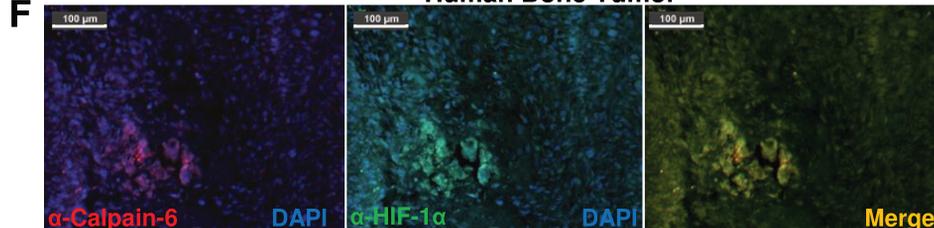




**K7M2 Cell-Derived Mouse Bone Tumor**

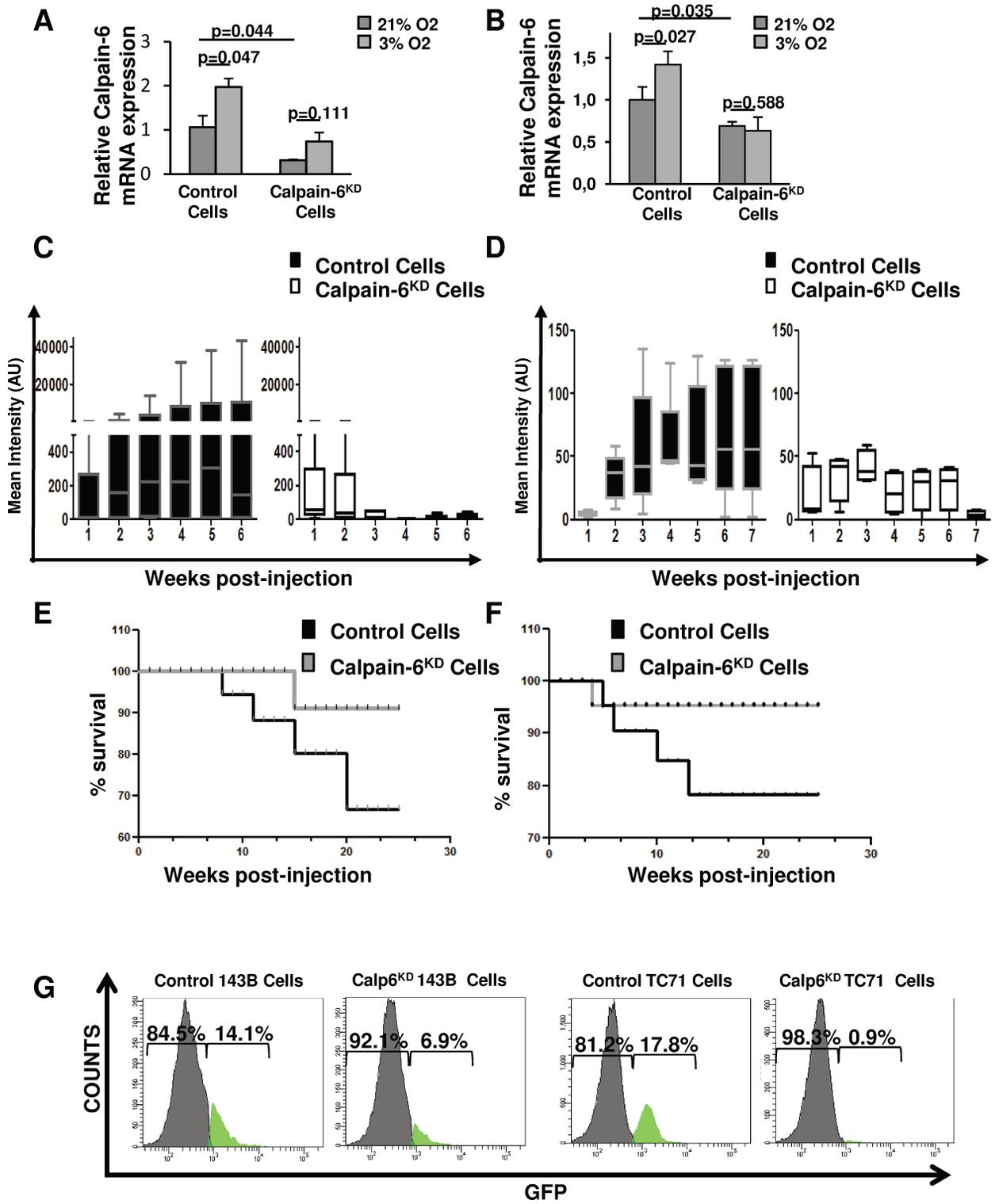


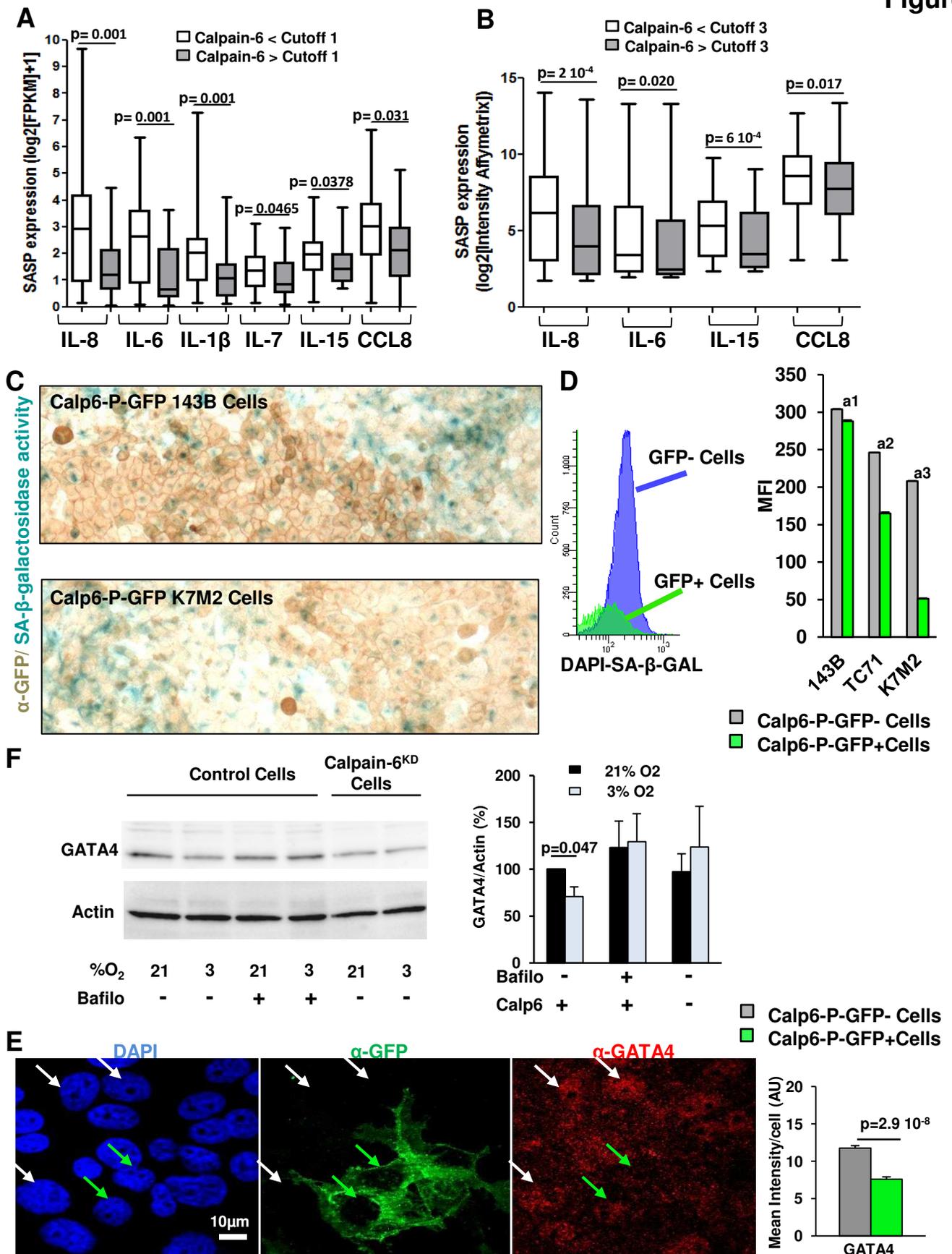
**Human Bone Tumor**

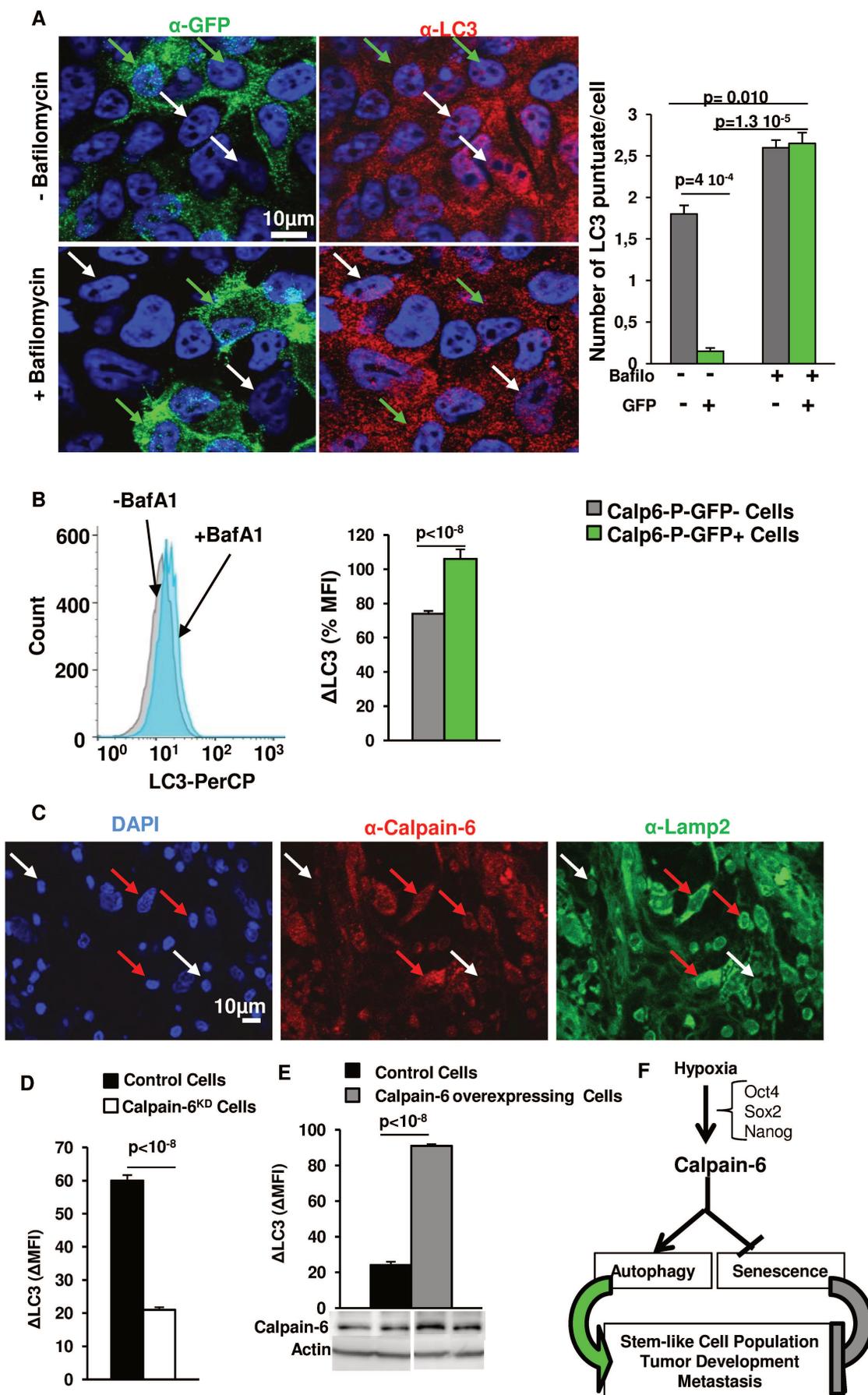


**Cells transfected with**

- pcDNA3.1
- ▒ pcDNA3.1-Oct4
- ▓ pcDNA3.1-Sox2
- pcDNA3.1-Nanog

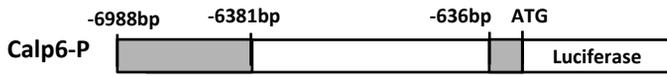




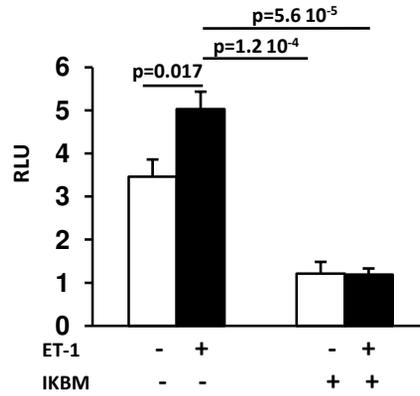




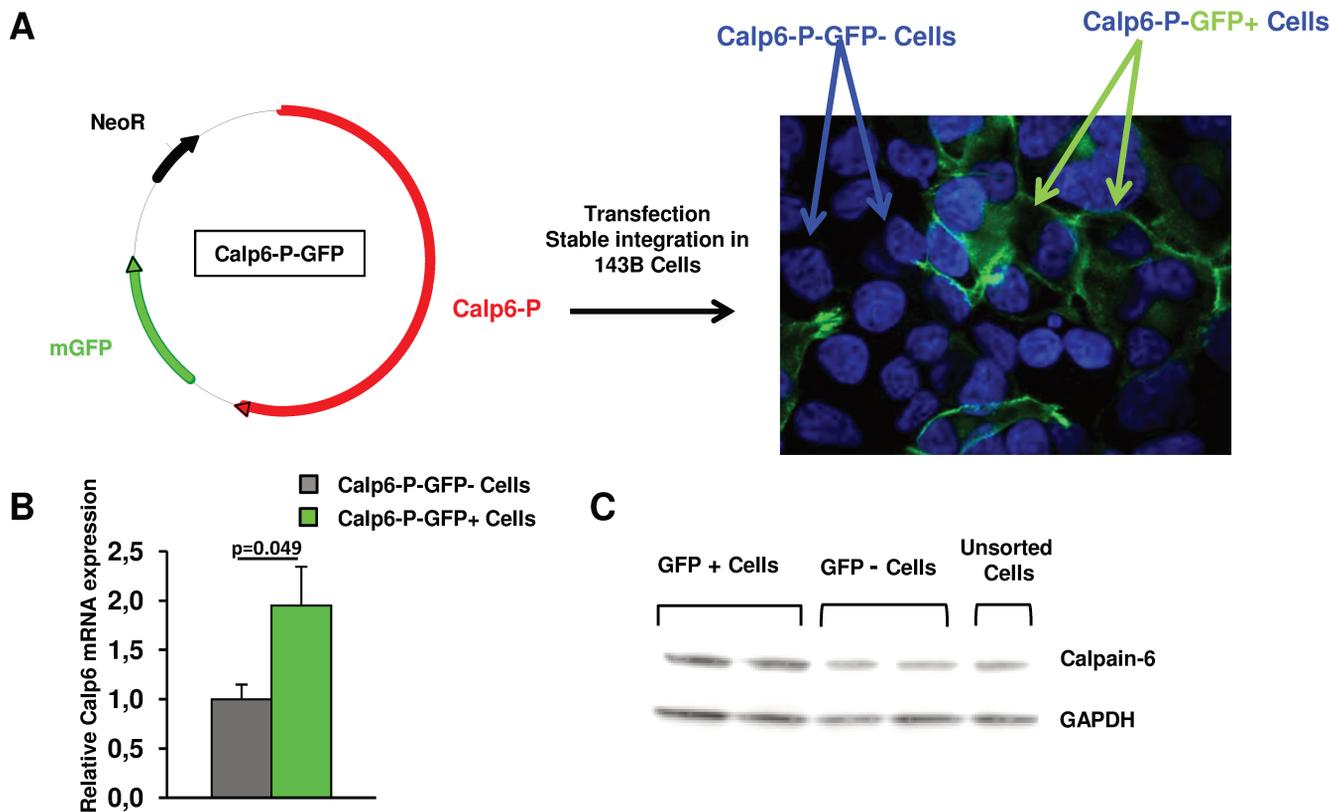
A



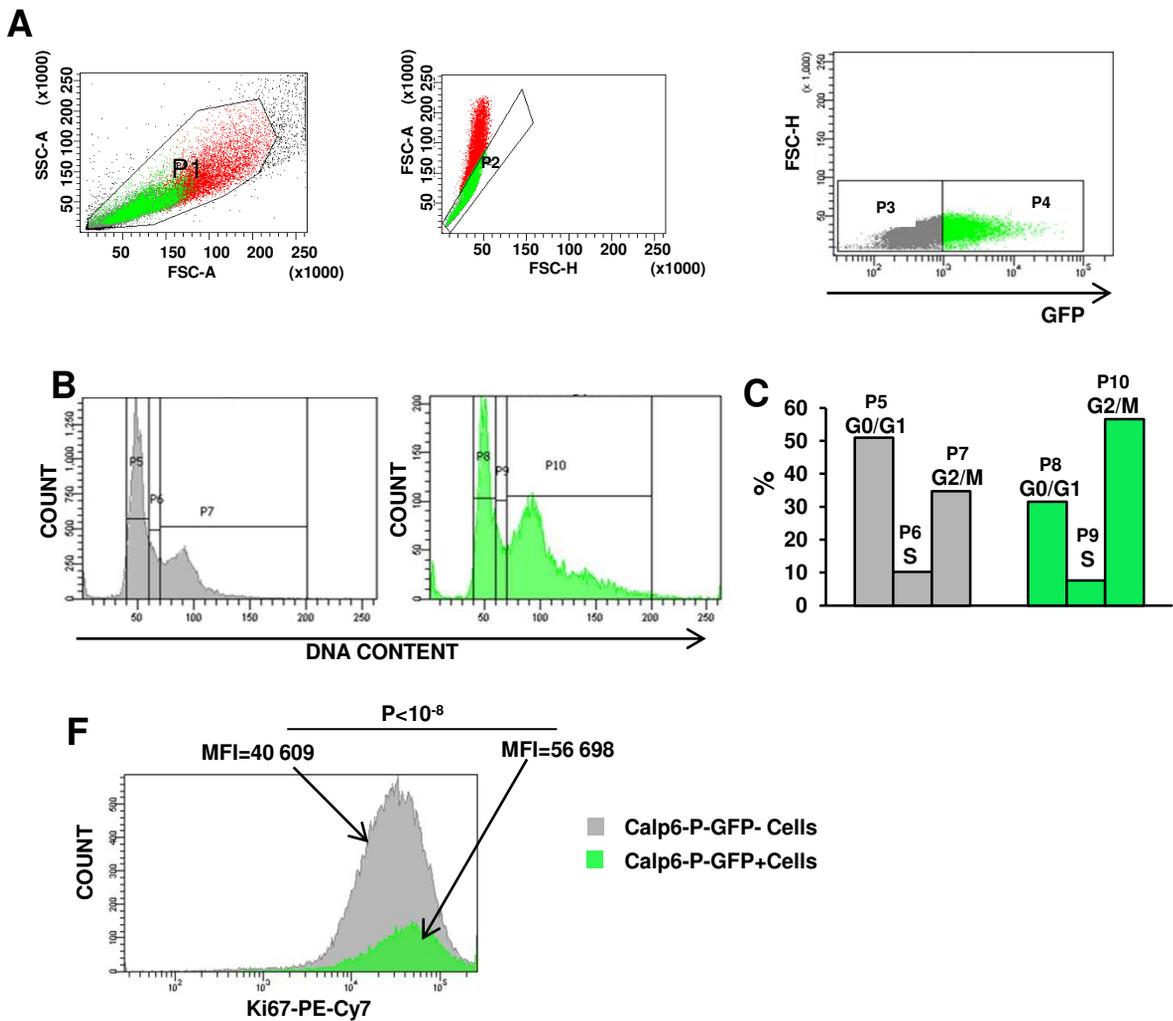
B



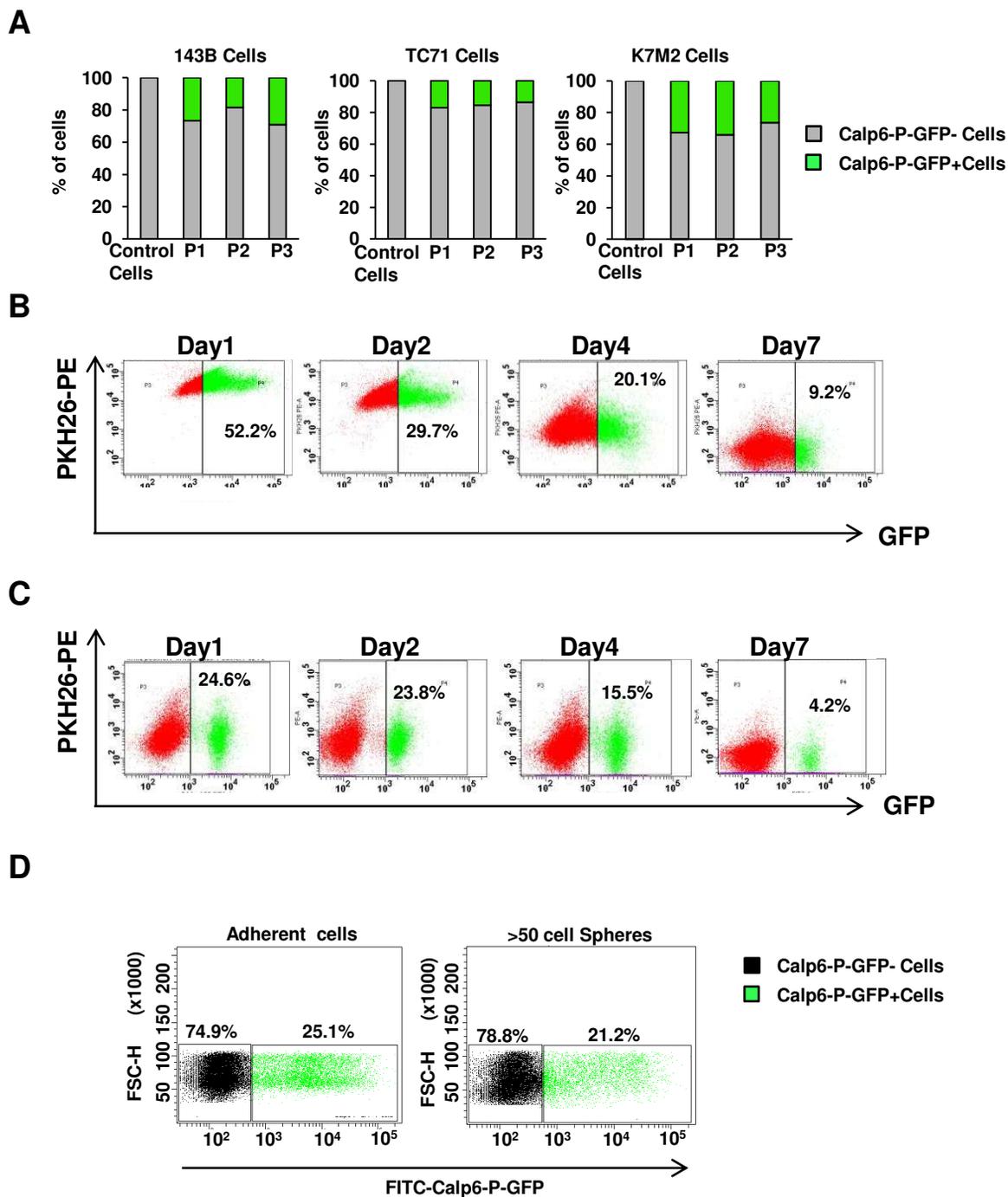
**Supplementary Figure 2: The transactivation activity of Calp6-P is regulated by ET-1 depending on activation of the NF- $\kappa$ B pathway.** (A) The 6988-bp sequence upstream ATG was cloned in the pGL4.10 vector (Promega). (B) Sarcoma cells were seeded in 24-well plates and transfected with the empty pGL4.10 plasmid or Calp6-P reporter construct with pRL-SV40, a renilla expression plasmid that served as internal control. At 24 hr after transfection, cells were cultured for 6 hr in serum-free medium, then treated with 1  $\mu$ g/mL endothelin 1 (ET-1). Renilla and luciferase activity was measured by using chemoluminescent substrates. Data are mean  $\pm$  SEM from 4 wells evaluated by two-sided Student t test. RLU, relative light units.



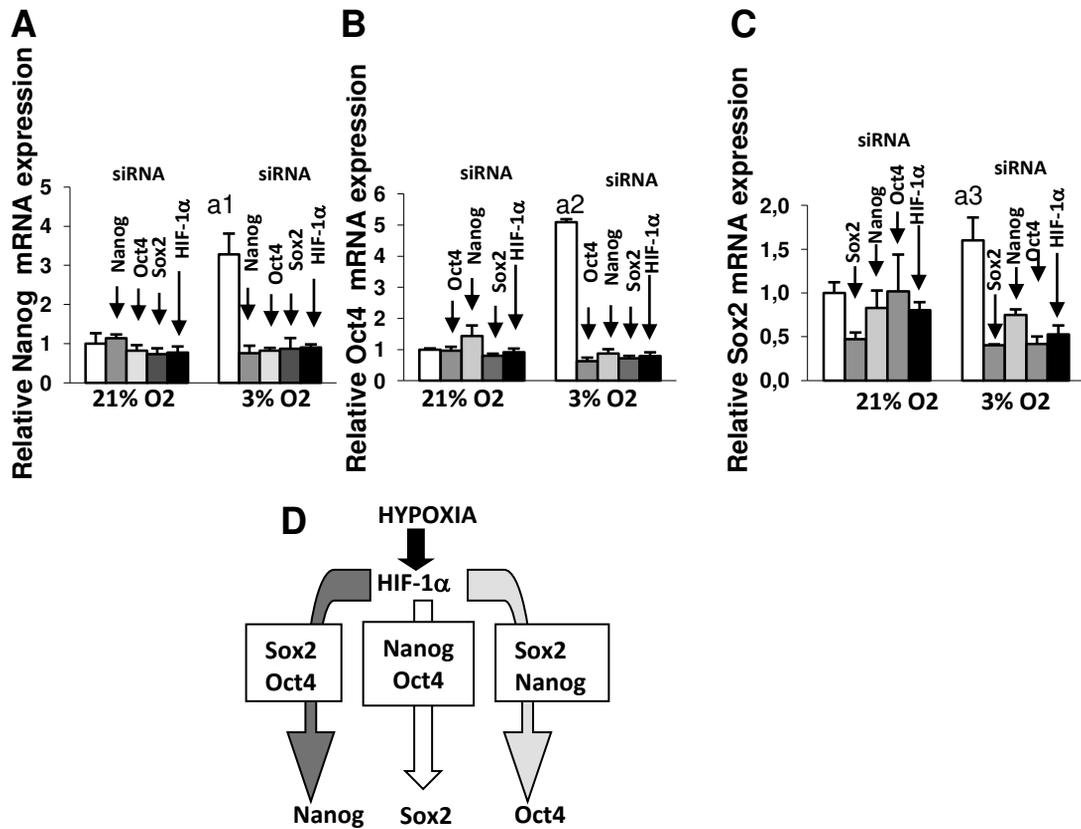
**Supplementary Figure 3: Calpain-6 and GFP expression are associated in human Calp6-P-GFP cells.** (A) Diagrammatic representation of the Calp6-P-GFP transgene. The reporter construct consisted in a sequence coding membrane GFP controlled by the calpain-6 regulatory sequence (Calp6-P). Sarcoma cells were transfected with this construction and selected with neomycin for stable integration. GFP expression was monitored by fluorescence microscopy. Calp6-P-GFP 143B cells were sorted according to GFP expression by flow cytometry in ImagoSeine platform (Paris Diderot University, Paris, France). (B) RT-PCR analysis of calpain-6 mRNA expression in sorted Calp6-P-GFP- and GFP+ 143B cells. Data are mean  $\pm$  SEM from 3 independent RNA extracts evaluated by two-sided Student t test. (C) Western blot analysis of calpain-6 protein level with protein extracts from Calp6-P-GFP+, GFP- and unsorted cells. GAPDH was a loading control.



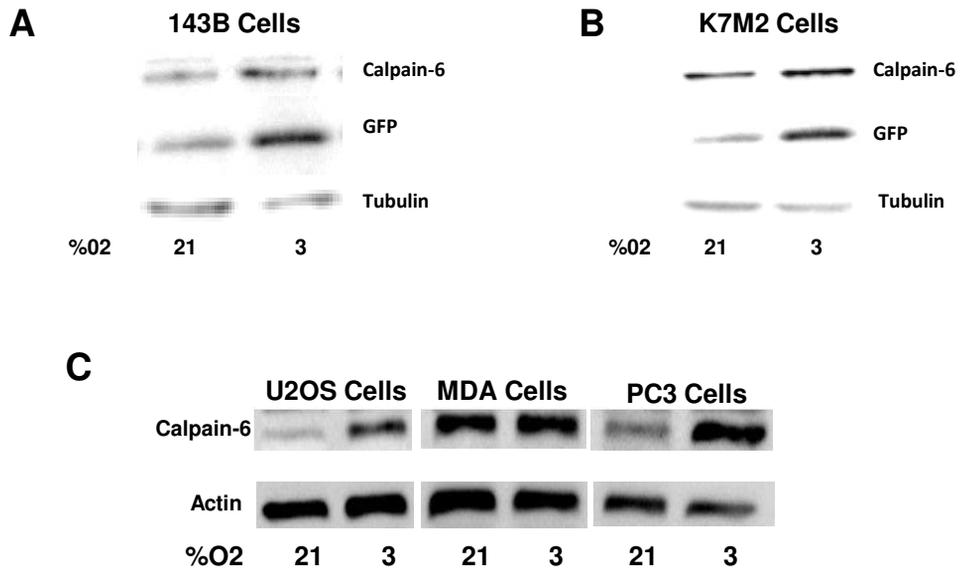
**Supplementary Figure 4: Switch in G2/M at the expense of G0/G1 and increased proliferation for calpain-6-expressing human TC71 Ewing cells. (A-E)** Flow cytometry of DNA content in Calp6-P-GFP- and GFP+ cells. (A) Gating strategy to select Calp6-P-GFP- and GFP+ cells. Starting number of cells was 50 000. The selected cells in P2 were analyzed for GFP expression. P3 and P4 contained 32 278 GFP- and 7684 GFP+ cells, respectively. (B) Dye Cycle Violet fluorescence was measured for GFP- and GFP+ cells. Cell cycle phases were determined according to DNA content. (C) The proportion of cells in each phase. (D) Calp6-P-GFP TC71 cells were labeled with a PeCy7-conjugated anti-Ki67 antibody. Mean fluorescence intensity (MFI) of Ki67 labeling for GFP- or GFP+ TC71 cells. N=50 000 cells. Means were compared by two-sided Student t test.



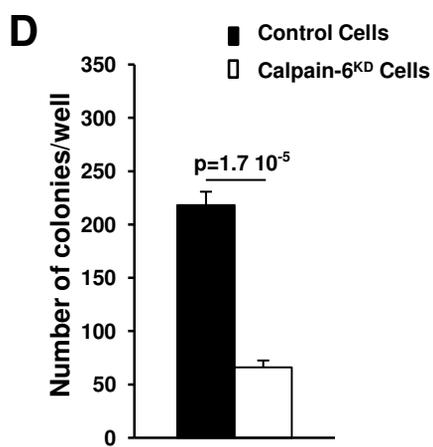
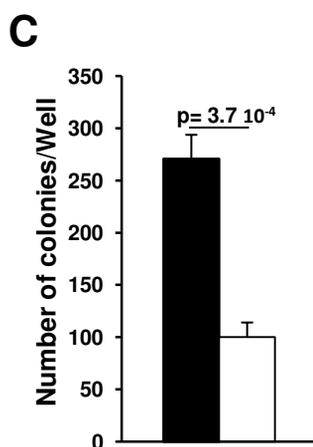
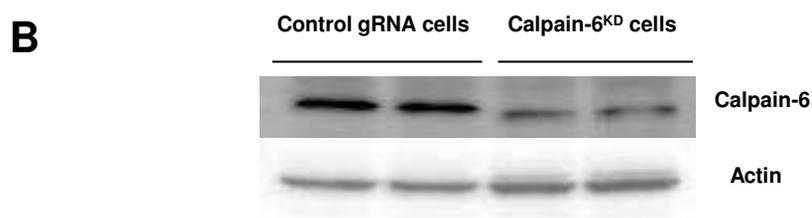
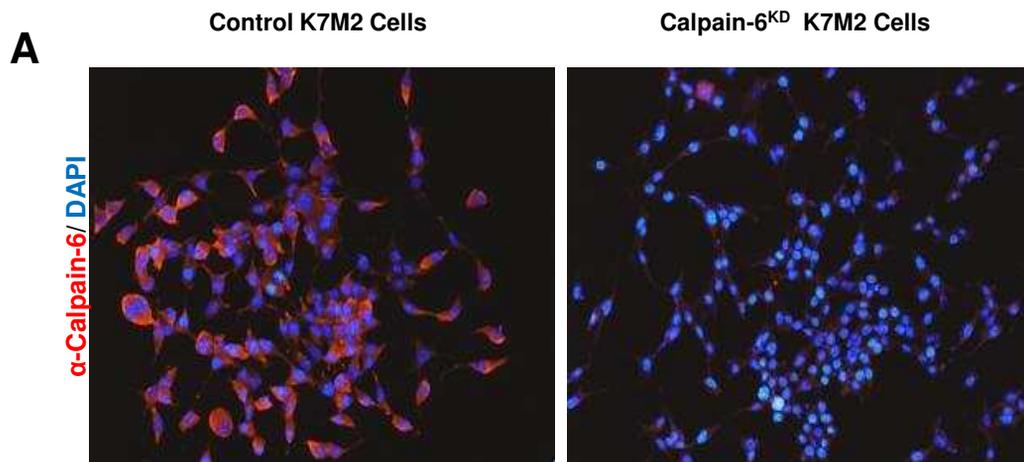
**Supplementary Figure 5: Calp6-P-GFP+ cell population is stable in confluent cultures but decreases during cell growth.** (A) The proportion of Calp6-P-GFP+ cells analyzed in the cell lines indicated. Cells were seeded at 500 000 cells/flask and cultured for 7 days. Some cells were analyzed for GFP expression and the others were seeded again. This was repeated 3 times (P1, P2 and P3). Control cells did not have the GFP-reporter system. (B,C) Flow cytometry of cell divisions. 143B cells (B) or K7M2 cells (C) were seeded at low density and labeled with PE-conjugated PKH26. Fluorescence of this membrane marker and GFP expression are reported at day 1, 2, 4 and 7. (D) Flow cytometry of the proportion of Calp6-P-GFP+ cells in adherent confluent culture and in large spheres comprising more than 50 cells. 50 000 cells were used as a starting cell population.



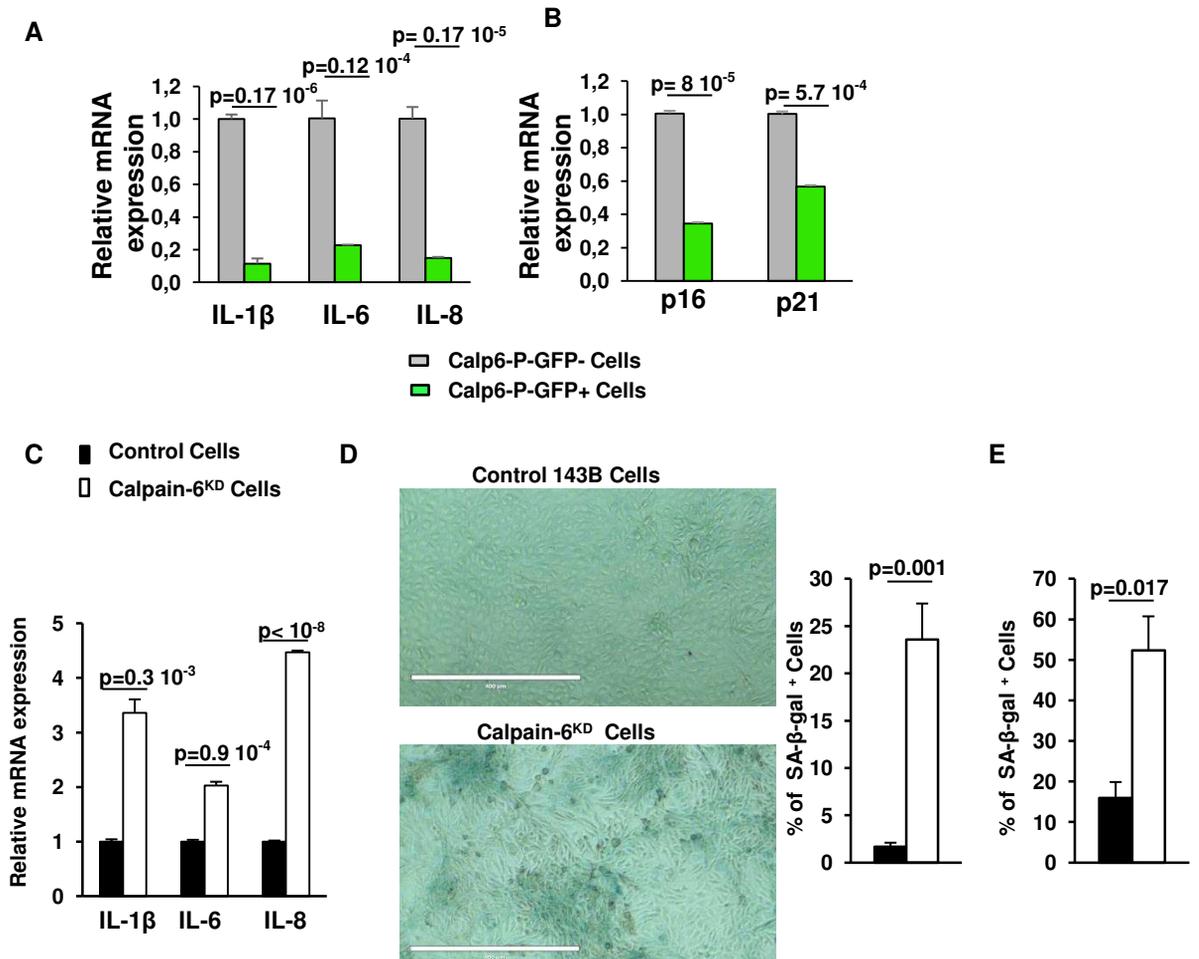
**Supplementary Figure 6: Increased Oct4 and Nanog expression in hypoxia depends on the stem-cell pathway involving Oct4, Nanog and Sox2.** (A-C) RT-PCR analysis of siRNA inhibition of Oct4, Sox2, Nanog or HIF-1 $\alpha$  on the hypoxia-dependent induction of Nanog (A) and Oct4 (B) and Sox2 (C). Data are mean  $\pm$  SEM in 3 independent wells evaluated by two-sided Student t test. a1=0.041; a2=0.0006; a3=0.078 are p values comparing cells cultured in 21% and 3% O<sub>2</sub>. (D) Scheme of the regulation circuitry of stem-cell transcription factors by hypoxia in sarcoma cells.



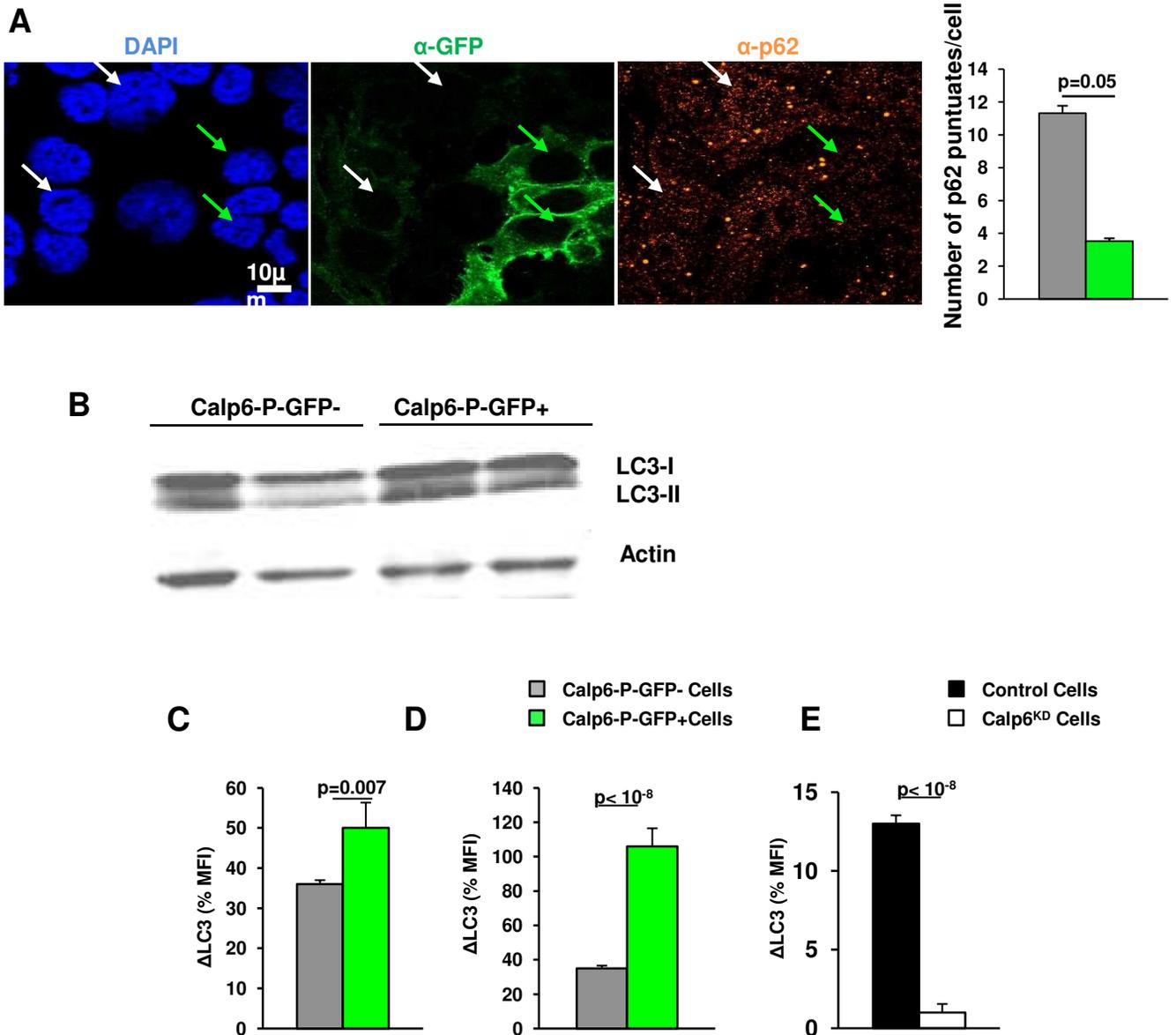
**Supplementary Figure 7: Hypoxia increases Calp6-P transactivation activity and calpain-6 expression.** (A-B) Western blot analysis of calpain-6 and GFP protein levels from Calp6-P-GFP 143B (A) and K7M2 (B) cells. Cells were cultured for 24 hr with 21% or 3% O<sub>2</sub>. Tubulin was a loading control. (C) Western blot analysis of calpain-6 protein level in cell lines cultured with 21% and 3% O<sub>2</sub>. Actin was a loading control.



**Supplementary Figure 8: Calpain-6 knockdown reduces stem cell colony formation.** (A) Immunofluorescence of calpain-6 (red) in control and calpain-6 knockdown (calpain-6<sup>KD</sup>) by RNA-guided CRISPR-Cas9 in K7M2 cells. (B) Western blot analysis of calpain-6 protein level in control and calpain-6<sup>KD</sup> 143B cells. Actin was a loading control. (C-D) Control or calpain-6<sup>KD</sup> human 143B (C) or TC71 (D) cells were seeded on non-adherent plastic coated with a growth factor-free matrix for cell attachment and cultured in serum-free stem cell medium. Data are mean  $\pm$  SEM of 4 independent wells evaluated by two-sided Student t test.



**Supplementary Figure 9: Calpain-6 deficiency is associated with increased senescence.** (A,B) RT-qPCR analyses of mRNA levels of senescence markers in sorted Calp6-P-GFP- and GFP+ human sarcoma 143B cells (A) or mouse K7M2 cells (B). (C) RT-qPCR analyses of mRNA levels of SASP genes in control and calpain-6<sup>KD</sup> 143B cells. Data are mean  $\pm$  SEM of 3 independent cell extracts evaluated by two-sided Student t test. (D) Representative photos of senescence-associated SA-β-gal+ cells in confluent control and calpain-6<sup>KD</sup> 143B cells from 4 cultures. Scale bars, 400  $\mu$ m. (E) Quantification of SA-β-gal+ cells in control and calpain-6 KD K7M2 cells. Data are mean  $\pm$  SEM of 3 cultures evaluated by two-sided Student t test.



**Supplementary Fig. 10: High autophagy in calpain-6 expressing cells.** (A) Quantification of p62 punctates in 143B cells cultured in 3% O<sub>2</sub>. White and green arrows indicate GFP- and GFP+ cells. Data are mean ± SEM in 150 Calp6-P-GFP- and GFP+ cells by two-sided Student t test. (B) Western blot analysis of autophagosomes-associated form of LC3, LC3-II, in protein extracts from sorted 143B Calp6-GFP- and GFP+ cells. (C) Flow cytometry quantification of ΔLC3 in mouse Calp6-P-GFP- and GFP+ K7M2 cells. n=89 000 GFP- cells n=3 300 GFP+ cells. (D) Flow cytometry quantification of ΔLC3 in human Ewing Calp6-P-GFP- and GFP+ TC71 cells. n=40 000 GFP- cells n=6 500 GFP+ cells. (E) Flow cytometry quantification of ΔLC3 in control and calpain-6<sup>KD</sup> TC71 cells. n=50 000 control or calpain-6 KD cells. Cells were cultured in 3% O<sub>2</sub>. Data are mean ± SEM; p values determined by two-sided Student t test.

### III. Discussion et résultats complémentaires

Au cours de cette étude, nous nous sommes intéressés à la calpaïne-6 parce que cette protéine est associée à la chimiorésistance des ostéosarcomes et que son expression est particulièrement élevée dans les récidives d'ostéosarcome. (Marion et al., 2012) Lee et coll., ont montré, par ailleurs, que l'expression de la calpaïne-6 est d'autant plus forte que le grade des tumeurs utérines est élevé. (Lee et al., 2008). Or, Valent et coll., ont proposé que l'apparition de CSC soit associée à la progression maligne des tumeurs. (Valent et al., 2012) Nous avons donc cherché à déterminer si l'expression de la calpaïne-6 pouvait être liée à des caractéristiques de CSC dans les sarcomes osseux. Nous avons également mis en évidence des fonctions importantes de cette protéine qui régule le destin des cellules de sarcome.

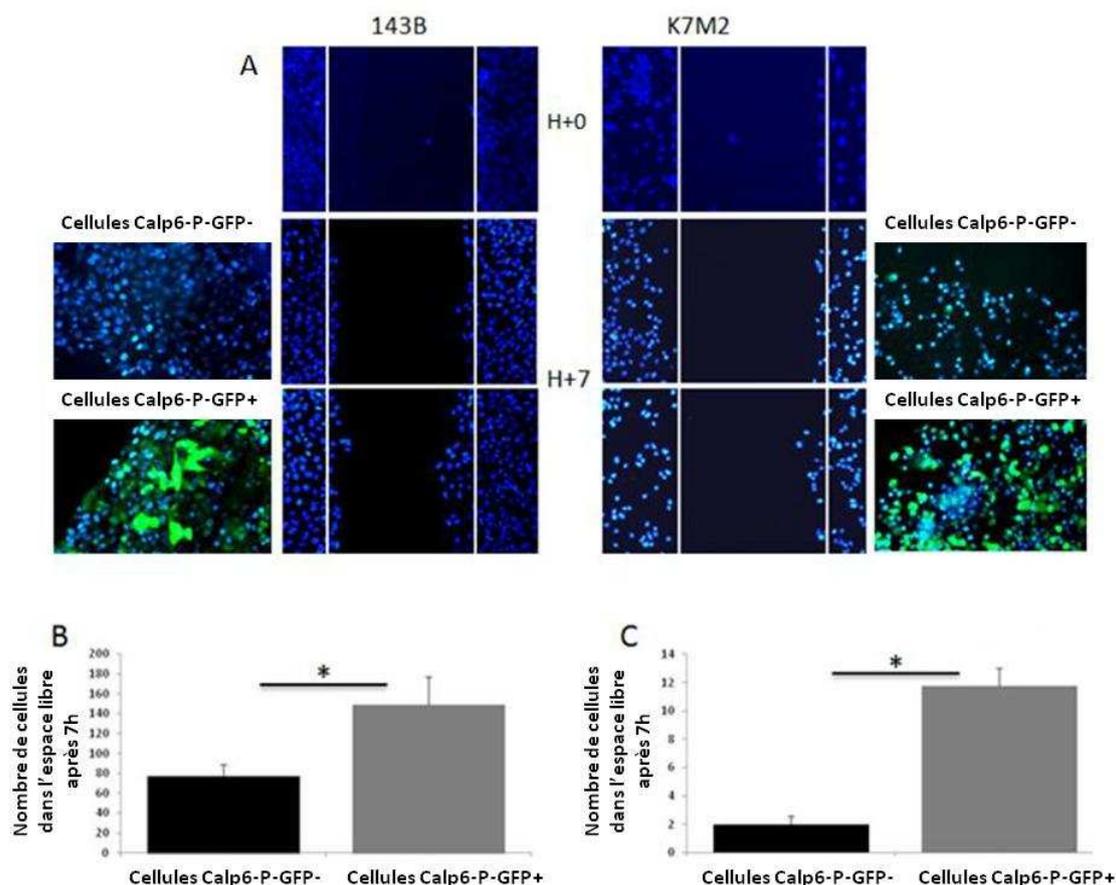
#### III.1. Calpaïne-6 et capacités tumorales des cellules de sarcome

Nous montrons que les cellules qui expriment la calpaïne-6 ont des capacités accrues à former des tumeurs chez l'animal. Pour cela nous avons utilisé un modèle de tumeur osseuse qui repose sur l'implantation de cellules d'ostéosarcome en intra tibial qui reproduit beaucoup d'aspects de la maladie humaine, notamment la formation d'une tumeur locale qui contient un tissu ostéoïde et la formation de nodules pulmonaires. En implantant les cellules tumorales dans un os long nous permettons des interactions avec le tissu hôte qui sont très importantes au cours du développement tumoral. (Guijarro et al., 2014) Nous pouvons observer que l'os sain est localement très altéré ce qui est la conséquence directe du cercle vicieux qui s'établit entre les cellules tumorales et les cellules saines pour induire une lyse osseuse et augmenter la concentration des facteurs de croissance et des cytokines qui favorisent la croissance tumorale.

Nous avons utilisé un modèle syngénique. Les cellules K7M2 sont dérivées d'un ostéosarcome spontané d'une souris BALB/c. Cela permet également les interactions avec le système immunitaire.

Nos résultats montrent que l'expression de la calpaïne-6 est liée à la progression métastatique. Les souris injectées avec des cellules Calp6-P-GFP+ développent plus et de plus grandes métastases que les souris injectées avec des cellules Calp6-P-GFP-. Parce que la capacité des cellules tumorales à s'échapper de la tumeur et à disséminer dans d'autres organes est en partie liée au processus de migration, nous avons étudié les capacités de

migration des cellules Calp6-P-GFP+ et Calp6-P-GFP- en les ensemençant dans des chambres séparées par un espace. Les cellules qui ont envahi l'espace après 7 heures de culture ont été comptées. Les cellules Calp6-P-GFP+ avaient une capacité de migration plus importante que les cellules Calp6-P-GFP-. (Figure 34)



**Figure 34: Les cellules Calp6-P-GFP+ ont des capacités migratoires accrues**

- (A) Cellules 143B ou K7M2 Calp6-P-GFP- et GFP+ juste après avoir retiré la chambre de migration (H0). Quantification du nombre de cellules 143B ayant migré dans l'espace laissé libre après 7h de culture (H7) Moyenne du nombre de cellules présentes dans 4 champs différents  $\pm$ SEM.\*  $p < 0,05$ .
- (B) Quantification du nombre de cellules K7M2 ayant migré dans l'espace laissé libre après 7h de culture (H7) Moyenne du nombre de cellules présentes dans 4 champs différents  $\pm$ SEM.\*  $p < 0,05$ .

Cette étude préliminaire devra être complétée en utilisant des techniques plus fines, notamment de la vidéo microscopie pour déterminer si les cellules qui expriment la calpaïne-6 migrent plus ou plus vite. Ces résultats paraissent en contradiction avec les résultats de Tonami et coll. montrant que l'inhibition de l'expression de la calpaïne-6 par des siRNA induisait la formation de lamellipode et accroissait la mobilité de fibroblastes en

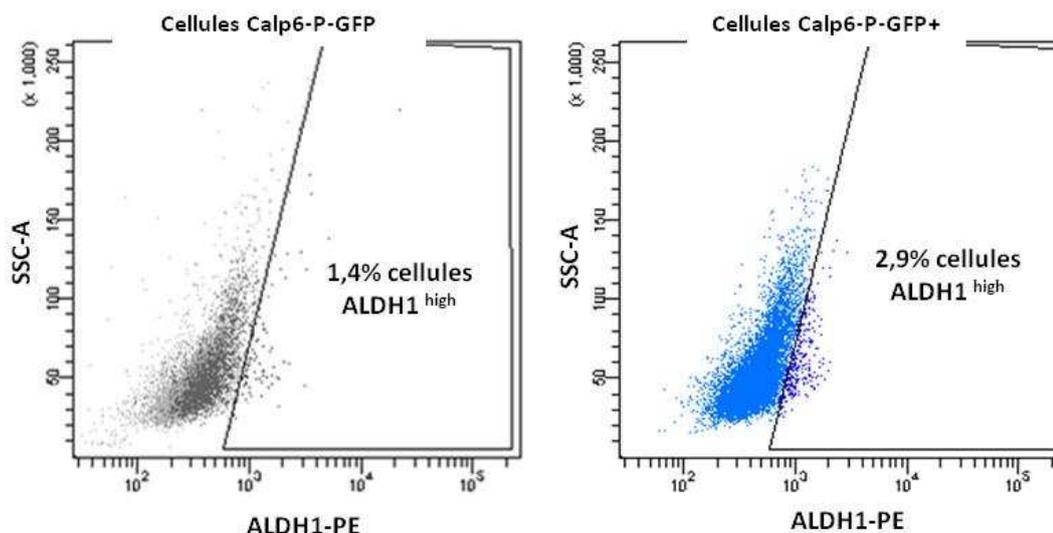
culture. (Tonami et al., 2011) Il se pourrait que cette contradiction soit due aux différents modèles cellulaires. Dans le modèle de Tonami, la suppression de la calpaïne-6 pourrait avoir induit une différenciation cellulaire qui ne peut être reproduite dans des cellules tumorales.

L'ensemble de nos résultats apportent de nouvelles preuves de la corrélation entre l'expression de la calpaïne-6 et la progression maligne des tumeurs. Le fait que la calpaïne-6 soit dépendante du réseau de facteur de transcription impliquant Oct4, Nanog et Sox2 est un argument de plus dans ce sens. En effet, ces facteurs qui contrôlent le phénotype de cellule souche, jouent un rôle dans le développement tumoral. Fu et coll., ont montré une corrélation entre l'expression de Sox2 et Oct4 avec la progression des carcinomes épidermoïdes oraux. (Fu et al., 2016) La signature de CSE incluant Oct4, Sox2 et Nanog est associée à un mauvais pronostic chez des patients avec des tumeurs mammaires. (Ben-Porath et al., 2008; Gwak et al., 2017) Enfin, la surexpression d'Oct4 augmente la présence de CSC dans les cancers du poumon. (Iida et al., 2012)

L'implication des facteurs Oct4, Nanog et Sox2 suggérait également que la capacité tumorale des cellules exprimant la calpaïne-6 pouvait être liée à des propriétés de CSC. Nous avons donc examiné des caractéristiques qui pouvaient évoquer un phénotype de CSC dans ces cellules.

L'activité ALDH1 a été décrite comme étant un marqueur robuste de CSC dans des tumeurs du sein et de la prostate. (Al-Hajj et al., 2003; Ginestier et al., 2007) L'activité ALDH1 a également été mise en évidence dans des sarcomes osseux en lien avec la chimiorésistance et associée à l'expression d'Oct4, Nanog et Sox2. (Honoki et al., 2010)

Nous n'avons pas pu mettre en évidence une corrélation entre l'expression de calpaïne-6 et l'activité enzymatique. Cependant, la population de cellules exprimant la calpaïne-6 contient une proportion plus importante de cellules ayant une activité ALDH1 élevée par rapport à la population totale. (Figure 35)

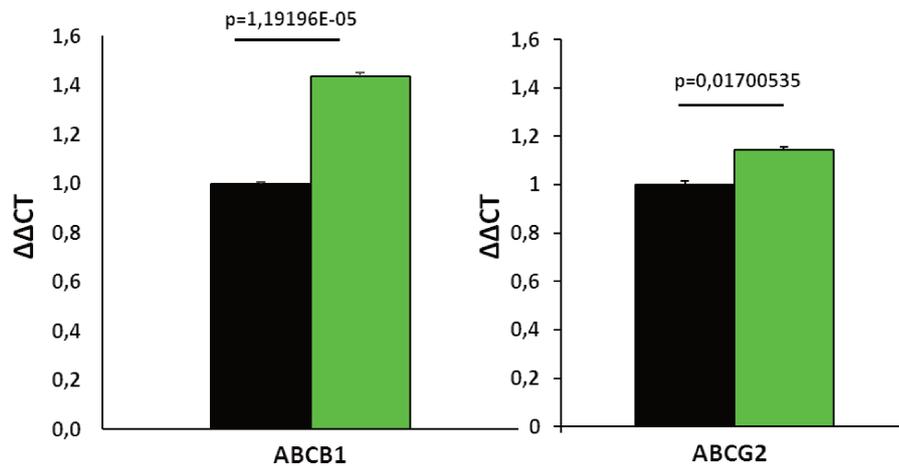


**Figure 35: Activité ALDH1 dans les cellules 143B**

L'activité ALDH1 des cellules Calp6-P-GFP+ a été mise en évidence par cytométrie en flux en comparant des cellules traitées avec un inhibiteur des ALDH le DEAB à des cellules non traitées en présence d'un substrat des ALDH l'AldeRed 588-1 qui produit une fluorescence rouge lorsqu'il est hydrolysé par l'ALDH1.

Cette analyse montre surtout que toutes les cellules exprimant la calpaïne-6 n'ont pas d'activité ALDH1. (Figure 35) Cela suggère que la population de cellules exprimant la calpaïne-6 est hétérogène.

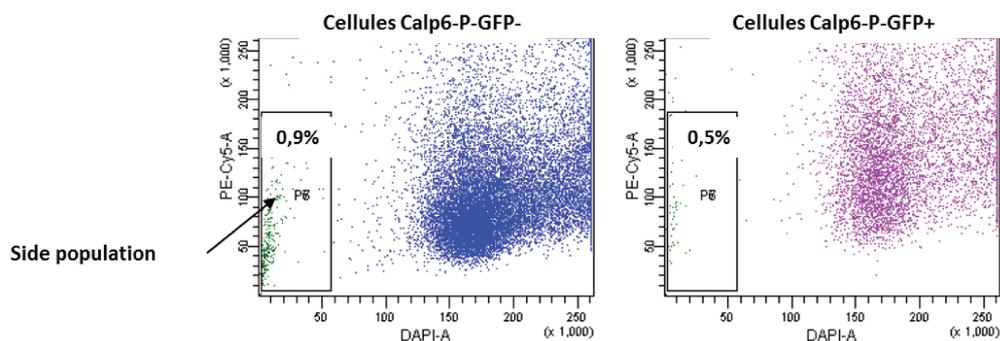
Les cellules souche sont pourvues de systèmes d'exclusion de certaines molécules. Ces systèmes mettent en jeu des récepteurs membranaires de type transporteurs ABC (Adenosine tri-phosphate binding cassette) qui permettent de faire passer des substrats à travers la membrane plasmique via l'hydrolyse de l'ATP. Les CSC expriment de grandes quantités de ces transporteurs ABC notamment ABCB1, ABCG2 et ABCB5. (Moitra et al., 2011) L'expression d'ABCB1 ou ABCG2 est augmentée dans des cellules Calp6-P-GFP+ triées. (Figure 36). Ces résultats sont cohérents avec les données montrant que l'expression de la calpaïne-6 est associée à la chimiorésistance des ostéosarcomes. (Marion et al., 2012)



**Figure 36: Expression de ABCB1 et ABCG2 dans les cellules 143B Calp6-P-GFP+**

Analyse par RT-qPCR de l'expression des transporteurs ABCB1 et ABCG2 dans les cellules Calp6-P-GFP- et Calp6-P-GFP+ d'ostéosarcome humain 143B. Les résultats sont exprimés en moyenne de  $\Delta\Delta CT \pm SEM$  (n=3 extraits de différentes cultures).

La « side population » contient les cellules capables d'exclure des marqueurs fluorescents comme le Hoechst ou la rhodamine. L'exclusion de ces marqueurs est dépendante des transporteurs ABC (ABCG2 pour le Hoechst et ABCB1 pour la rhodamine). (Hirschmann-Jax et al., 2004) cette population cellulaire particulière peut être mise en évidence par des analyses en cytométrie de flux. Nous n'avons pas trouvé que les cellules GFP+ avaient plus de capacités à exclure le fluorochrome utilisé (Dye Cycle Violet). Seulement 0.5% des cellules GFP+ appartiennent à cette population. C'est la même proportion qui est trouvée pour les cellules GFP-. (Figure 37)



**Figure 37: Side population et expression de la calpaïne-6**

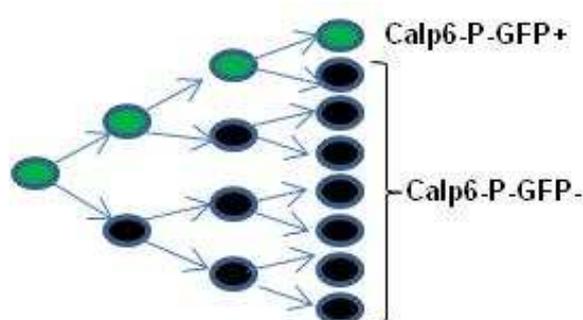
Les cellules d'ostéosarcome humains ont été marquées avec du Dye Cycle Violet (DCV), un fluorochrome pouvant être exclu des cellules par les transporteurs ABC. Les cellules sont analysées par cytométrie en flux. La quantité de fluorochrome DCV est mesurée dans les populations cellulaires GFP- et GFP+ 2 heures après le marquage. Les cellules dans la fenêtre P6 ont exclu le DCV.

Ces résultats semblent en contradiction avec les résultats précédents mais les transporteurs impliqués dans les cellules d'ostéosarcome ne sont peut-être pas capables de prendre en charge le fluorochrome DCV utilisé. En effet, il a été montré qu'ABCG2 exclue le Hoechst et qu'ABCB1 prend en charge la rhodamine, ce qui suggère une certaine spécificité d'affinité entre transporteur et fluorochrome. D'autre part, Yang et coll. ont montré que les cellules de « side population » ont des propriétés de CSC. (Yang et al., 2011) Mais ces cellules expriment CD117 et Stro-1 comme l'ensemble de la population. Or ces marqueurs de surface permettent eux aussi d'isoler des cellules avec des propriétés de CSC. (Adhikari et al., 2010) Comme évoqué par Brown et coll., pour expliquer que des CSC isolées grâce au marqueur de surface CD133 n'appartiennent pas à la « side population » nous pouvons supposer qu'il existe différents types de CSC et que la population des cellules exprimant la calpaïne-6 est hétérogène. Le fait que nous n'ayons pas trouvé d'association entre l'expression de CD117, Stro-1 et de la calpaïne-6 supporte cette hypothèse.

Finalement, nous avons montré que les cellules exprimant la calpaïne-6 ont des caractéristiques de CSC en étudiant le comportement particulier de ces cellules et leur mode de division. Les cellules exprimant la calpaïne-6 ont notamment une plus grande capacité à former des sphères. Cette capacité de se multiplier sans support pour adhérer et dans un milieu restreint en facteur de croissance est un test classique pour mettre en évidence des cellules avec des propriétés de CSC. (Martins-Neves et al., 2012) Cependant, Il serait intéressant d'avoir accès à des prélèvements humains, afin d'effectuer des xénogreffes dérivées de patients (PDX). Nous pourrions infecter les cellules issues des tumeurs primaires des patients avec un lentivirus codant pour notre système rapporteur Calp6-P-GFP et implanter ces fragments de tumeur dans un os de souris immunodéficente. Ce modèle de xénogreffe orthotopique décrit par Blattman et coll. permet de reproduire la maladie humaine. (Blattmann et al., 2015) Nous pourrions ainsi étudier le devenir des cellules GFP+ et confirmer leurs capacités tumorigènes. En attendant de mettre en place ce système de xénogreffe, nous avons commencé une collaboration avec différents laboratoires (Dr Laetitia Linares, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, INSERM U1194 ; Dr Françoise Rédini, Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et thérapie des tumeurs osseuses primitives, INSERM UMR957, Nantes). Ces équipes ont réalisé des xénogreffes à partir de prélèvement de sarcomes osseux ou des tissus mous. Notre objectif est de

déterminer si l'expression de la calpaïne-6 dans les tissus initiaux corrèle avec le succès des transplantations chez la souris. L'expression de la calpaïne-6 sera déterminée par immunohistochimie et RT-qPCR.

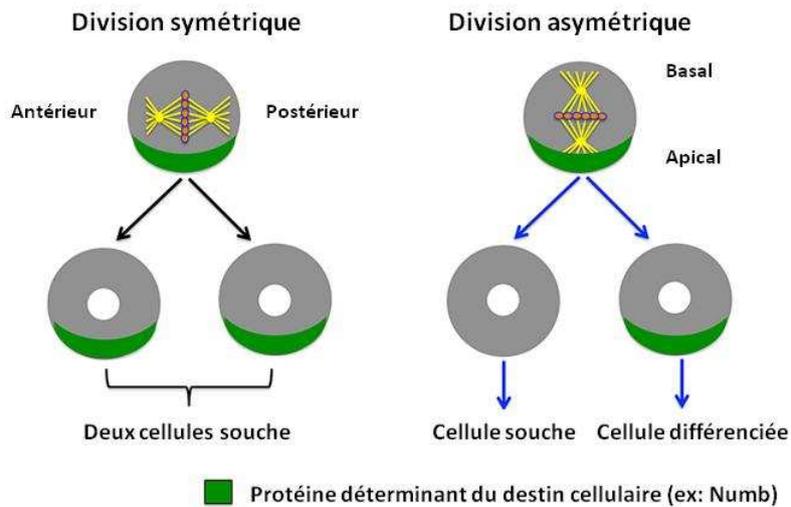
Nos résultats indiquent que les cellules exprimant la calpaïne-6 sont au sommet de la hiérarchie cellulaire. (Figure 38)



**Figure 38: Les cellules Calp6-P-GFP+ sont au sommet de la hiérarchie cellulaire**

Les cellules GFP+ sont capables d'auto renouvellement, donc de maintenir stable la population de cellules GFP+ au cours du temps, ce sont les CSC. Elles sont également capables de se diviser pour donner des cellules GFP- qui vont constituer l'ensemble des cellules composant la tumeur hormis les CSC.

En effet, les cellules Calp6-P-GFP+ sont capables de donner naissance à une population de cellules GFP- in vitro et de reproduire l'hétérogénéité tumorale in vivo. Les cellules souche embryonnaires ont de telles capacités grâce à un mode de division asymétrique. (Knoblich, 2010) La protéine Numb est une protéine permettant d'étudier le mode de division des cellules. Lors d'une division symétrique, Numb sera présent dans les deux cellules filles, si la division est asymétrique, Numb ne sera présent que dans une des deux cellules filles. (El-Hashash & Warburton, 2012) (Figure 39)

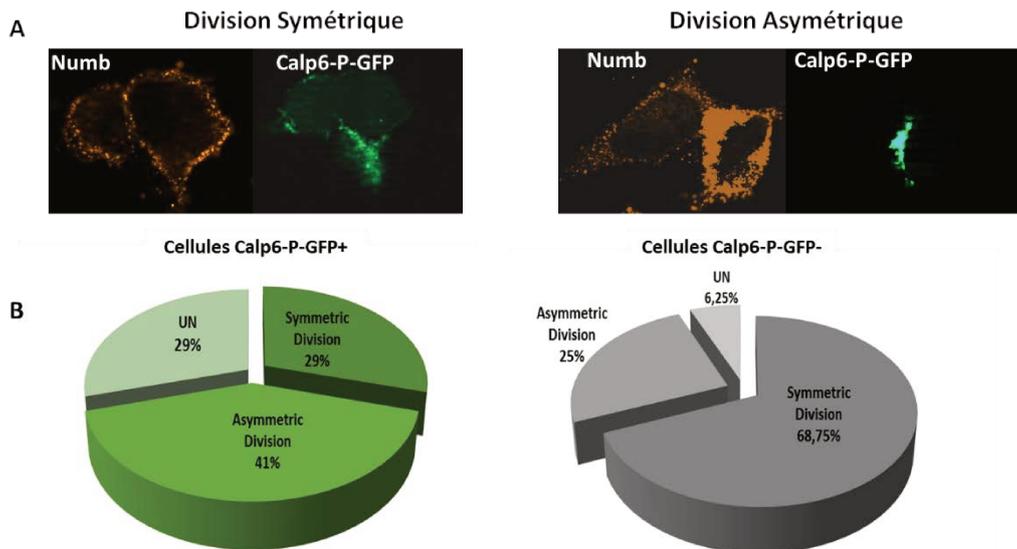


**Figure 39: Représentation schématique des deux modes de division d'une cellule souche**

Durant la division symétrique, l'orientation du fuseau mitotique et la répartition de la protéine déterminant du destin cellulaire (Numb) ne sont pas coordonnées. Numb est réparti dans les deux cellules filles, qui seront toutes les deux des cellules souches. (Panneau de gauche)

Durant la division asymétrique, l'orientation du fuseau mitotique et la localisation de la protéine déterminant du destin cellulaire (Numb) sont coordonnées, ce qui aboutit à une cellule fille souche et une cellule fille différenciée. (Panneau de droite) D'après Berika et al., 2014

Nous avons analysé par immunofluorescence la ségrégation de la protéine Numb dans les cellules Calp6-P-GFP<sup>+</sup> et les cellules Calp6-P-GFP<sup>-</sup>. Des expériences préliminaires montre que les cellules Calp6-P-GFP<sup>+</sup> semblent se diviser préférentiellement de façon asymétrique. (Figure 40)



#### Figure 40: Les cellules Calp6-P-GFP+ se divisent asymétriquement

- (A) Photos représentatives de la répartition de Numb selon le mode de division cellulaire des cellules Calp6-P-GFP+ (à gauche) et GFP- (à droite)
- (B) Pourcentage de cellules en division symétriques, ou asymétrique à partir d'une immunofluorescence anti-Numb réalisée sur des cellules 143B Calp6-P-GFP en division, UN étant des cellules non analysables. Les résultats sont obtenus à partir du comptage de 20 cellules Calp6-P-GFP+ et 20 cellules Calp6-P-GFP-.

Ces comptages devront être reproduits en incluant plus de cellules et en utilisant un marqueur membranaire (anti-pan-cadhérine) pour déterminer plus précisément la répartition de Numb. Il faudrait aussi compléter ces analyses en utilisant de la vidéo microscopie.

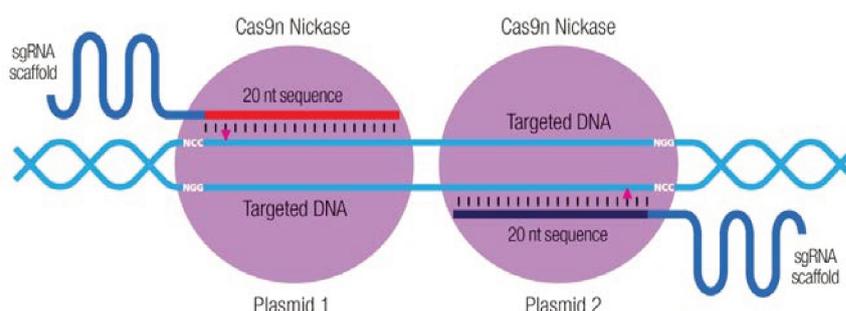
Il a été montré que le mode de division des CSC peut varier avec le stade de progression des tumeurs hématopoïétiques. Dans les phases chroniques des leucémies myéloïdes, un équilibre s'établit entre divisions symétriques et asymétriques, ce qui permet le maintien du pool de CSC et crée l'hétérogénéité tumorale, alors que dans les phases aiguës, les CSC se divisent symétriquement ce qui a pour conséquence d'augmenter leur nombre et ainsi augmenter le nombre de cellules initiatrices de tumeur. (Bajaj et al., 2015) Il serait donc intéressant de déterminer comment l'expression de la calpaïne-6 influence le mode de division des cellules et quelles sont les relations avec développement tumoral.

### III.2. Fonctions de la calpaïne-6 dans les CSC

Pour mieux caractériser les cellules qui expriment la calpaïne-6, nous avons interrogé des données issues d'analyses du transcriptome par RNAseq et microarray en collaborant

avec le Dr Frédéric Chibon et Candice Merle (Institut Bergonié département Oncogénèse des Sarcomes- 33000 Bordeaux). Ces analyses ont été réalisées à partir de biopsies de sarcomes, indifférenciés, léiomyosarcome, liposarcomes dédifférenciés, et tumeurs stromales gastro-intestinales, obtenues dans le cadre du groupe sarcome français (GSF). Ces résultats ont mis en évidence une corrélation inverse entre l'expression de la calpaïne-6 et des gènes impliqués dans la sénescence cellulaire tels que l'IL-1 $\beta$ , l'IL-8 et l'IL-6. Il faudra aussi interroger les données issues de prélèvements de sarcomes osseux, mais il est intéressant de constater que l'expression de la calpaïne-6 est associée aux mêmes caractéristiques dans des tumeurs d'origines variées et dans des lignées cellulaires issues d'ostéosarcomes humains et murins.

Pour mettre en évidence les fonctions de la calpaïne-6 nous avons utilisé le système CRISPR/Cas9. Nous avons mis en évidence que le système CRISPR/Cas9 permettait une diminution de l'expression de la calpaïne-6 dans les lignées humaines et murines. Le plasmide CRISPR/Cas9 utilisé dans le modèle murin est un plasmide commercial comprenant différents plasmides codant pour des ARN guide sens et des ARN guide anti sens spécifiques de la calpaïne-6 et très proches dans la séquence, ce qui permet d'augmenter la spécificité de la coupure par Cas9. (Figure 41)



**Figure 41: Système Double nickase CRISPR/Cas9**

Dans les cellules murines K7M2, nous avons utilisé un système double nickase, ce système consiste à transférer deux plasmide codant pour la cas9 d'une part, et pour deux ARN guides, un sens et un antisens spécifiques de la calpaïne-6 et très proche dans la séquence, ce qui permet d'augmenter la spécificité d'action de la cas9.

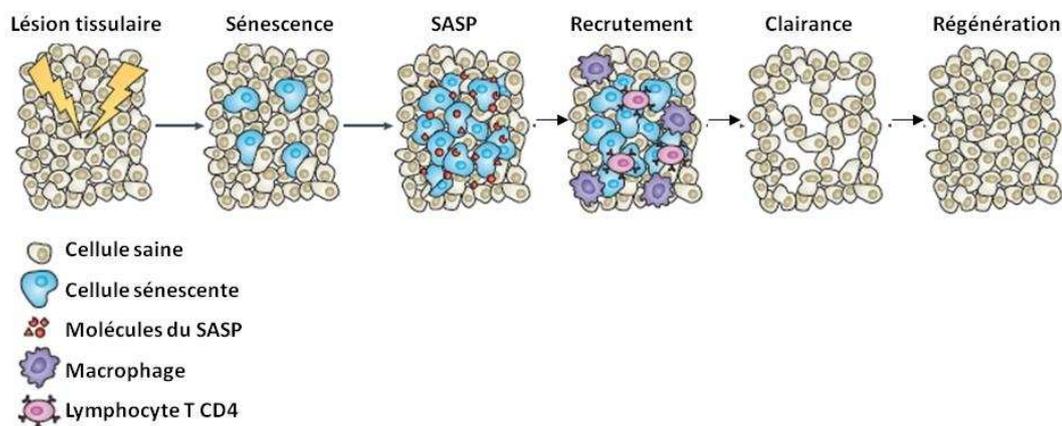
Pour inhiber l'expression de la calpaïne-6 dans les cellules humaines nous avons utilisé un lentivirus codant un ARN guide simple avec la Cas9. Nous avons testé deux ARN guides. Celui qui était situé à la fin de l'exon 2 induisait plutôt une surexpression, l'autre

situé dans l'exon 3 permettait de diminuer l'expression des ARN et de la protéine. Ce lentivirus pourrait être utilisé sur des prélèvements humains pour déterminer si la suppression de calpaïne-6 peut bloquer la croissance tumorale chez la souris.

### III.2.1. La calpaïne-6 protège les cellules de la sénescence

La sénescence est un mécanisme permettant l'arrêt irréversible du cycle cellulaire. Parmi les stimuli entraînant la sénescence on peut citer le raccourcissement des télomères, un dommage irréversible de l'ADN, des perturbations de la conformation de la chromatine ou la mutation d'un gène suppresseur de tumeur tel que *p53* par exemple. Les cellules sénescents ne prolifèrent plus mais leur métabolisme est toujours actif. Elles sont capables de produire des cytokines pro-inflammatoires appartenant au phénotype sécrétoire lié à la sénescence (SASP).

L'entrée en sénescence est un phénomène naturel durant le processus de vieillissement cellulaire empêchant la dérive génétique. C'est également un processus utile lors de la réparation cellulaire. (Figure 42)



#### Figure 42: Implication de la sénescence pendant la réparation tissulaire

Les cellules sénescents initient la réparation tissulaire en produisant des cytokines pro-inflammatoires appartenant au SASP. Les molécules du SASP permettent le recrutement des cellules du système immunitaire telles que des macrophages et des lymphocytes T CD4. Les macrophages éliminent les cellules sénescents, ce qui provoque la clairance cellulaire et va permettre aux cellules adjacentes de se diviser pour terminer la réparation tissulaire. *D'après Muñoz-Espín & Serrano, 2014*

Certaines cellules cancéreuses ont des caractéristiques typiques de la sénescence. Mais l'entrée en sénescence des cellules cancéreuses semble avoir des conséquences complexes. D'une part, les facteurs pro-inflammatoires produits dans le milieu extra

cellulaire permettent de recruter des cellules immunitaires et pourraient ainsi limiter la progression tumorale. (Kang et al., 2011) D'autre part, ces facteurs sont également impliqués dans le recrutement de cellules non tumorales qui forment le stroma des tumeurs. Ainsi des cellules souche mésenchymateuses sont attirées dans la tumeur, deviennent des fibroblastes associés et à leur tour maintiennent un état inflammatoire et favorisent l'angiogenèse, la prolifération et la migration cellulaire. (Coppé et al., 2008) Les travaux d'Eggert et coll., montrent que la sécrétion de molécules du SASP par les cellules composant la tumeur aboutit à l'inhibition des cellules Natural Killer (NK) et permet la progression des carcinomes hépatiques. (Eggert et al., 2016) De plus, il a été montré que dans les myélomes multiples, la production de cytokines du SASP par les cellules composant la tumeur, favorise l'apparition, le maintien et la migration de cellules ayant un phénotype de CSC. (Cahu et al., 2012)

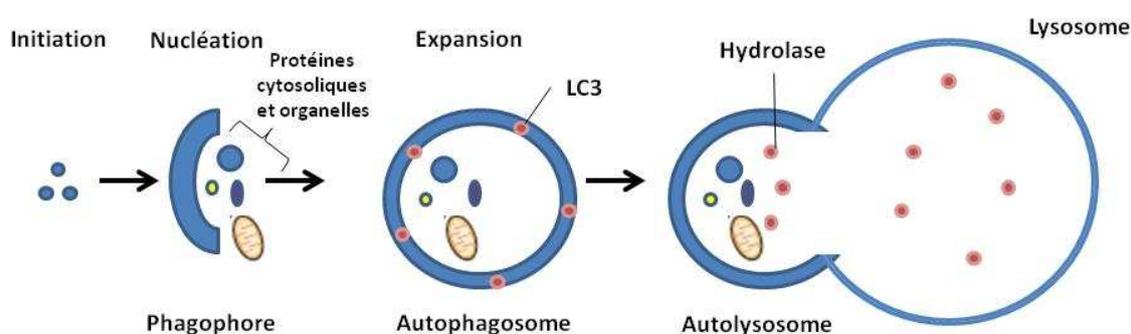
Nous avons montré que la calpaïne-6 est associée à une faible expression des marqueurs de sénescence notamment des cytokines pro-inflammatoires appartenant au SASP, de p16 et p21. De plus, les cellules Calp6-P-GFP+ ont une très faible activité  $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence. Au contraire, nous avons montré que l'inhibition de la calpaïne-6 augmente l'expression des gènes du SASP et l'activité  $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence. Surtout, en étudiant les variations de GATA4 sous hypoxie, nous avons montré que la calpaïne-6 est nécessaire pour empêcher les cellules d'entrer en sénescence quand elles sont cultivées en hypoxie.

Il sera important de mieux comprendre les conséquences de ce phénotype sénéscent, notamment, il faudra déterminer si la sénescence est associée à une plus grande sensibilité aux agents cytotoxiques et comment les cytokines produites remodelent le microenvironnement tumoral. Nous prévoyons de mieux caractériser les cellules immunes présentes dans les aires tumorales avec ou sans calpaïne-6 par immunofluorescence dans des tissus humains ou par cytométrie au cours de la croissance tumorale dans notre modèle syngénique de tumeur osseuse chez la souris.

### *III.2.2. L'expression de la calpaïne-6 est associée au flux autophagique*

L'autophagie est un processus catabolique étroitement régulé, qui transporte de l'ADN, des protéines et des organelles jusqu'aux lysosomes en pour induire leur dégradation.

On distingue trois types: la macro-autophagie, la forme principale de l'autophagie, la micro-autophagie et l'autophagie médiée par des protéines chaperonne. La macro-autophagie implique la formation de vésicules liées à la membrane, appelées autophagosomes, qui englobent les protéines cytoplasmiques et les organelles; ces autophagosomes sont amenés aux lysosomes et sont alors dégradés. (Figure 43) La micro-autophagie est l'invagination de la membrane du lysosome avec une partie du cytoplasme. L'autophagie médiée par des protéines chaperonne est contrôlée par des protéines cargos, qui s'associent avec les protéines à dégrader et les mènent vers les lysosomes.



**Figure 43: Représentation schématique du processus de macro-autophagie**

L'initiation commence par la formation des phagophores. Une étape de nucléation est nécessaire et permet de séquestrer les protéines ou organelles à dégrader. Vient ensuite une phase d'élongation du phagophore, cette phase d'élongation permet la formation de l'autophagosome et nécessite l'association de la protéine LC3 à la membrane du phagophore. L'autophagosome fusionne alors avec un lysosome, ce qui conduit à la formation de l'autolysosome et permet la dégradation des protéines et organelles empaquetés dans l'autophagosome. *D'après Kaur & Debnath, 2015*

Dans les cancers, la macro-autophagie est le processus d'autophagie le plus décrit, en effet, il favorise la survie des cellules dans les tumeurs faiblement vascularisées et l'élimination des macromolécules intracellulaires endommagées suite à un traitement anticancéreux.

Bien que des mutations de certains gènes impliqués dans l'autophagie soient à l'origine de certaines tumeurs, ce mécanisme de dégradation joue plutôt un rôle protecteur dans les cellules cancéreuses et de nombreux travaux récents mettent en avant le rôle de l'autophagie dans la progression tumorale. Dans les leucémies myéloïdes non mutées pour p53, l'inhibition de l'autophagie permet d'induire l'apoptose des cellules cancéreuses.

(Folkerts et al., 2017) Dans les tumeurs ovariennes, l'inhibition de l'autophagie permet de diminuer la taille des tumeurs, et de diminuer la chimiorésistance. (Pagotto et al., 2017) De plus, il a été montré dans les cancers utérins, que l'autophagie était impliquée dans le maintien du phénotype de CSC, notamment la présence de Beclin-1 était indispensable pour l'auto renouvellement des CSC, et que son inhibition entraînait la baisse de l'expression de facteurs de transcription tels qu'Oct4, Sox2 et Nanog. (Yang et al., 2017)

La calpaïne-6 pourrait donc contribuer au maintien de la population de cellules initiatrices de tumeurs dans des niches hypoxiques en contrôlant l'autophagie. Il est probable qu'en promouvant le mécanisme de dégradation la calpaïne-6 empêche les cellules tumorales d'entrer en sénescence. En effet, Garcia-Prat et coll. ont montré dans des cellules souche musculaires que l'autophagie maintenait le phénotype de CS en inhibant la formation de dérivés réactifs de l'oxygène, ce qui a pour effet d'inhiber la transcription de p16. Les cellules souche musculaires sont alors protégées de la sénescence. (García-prat et al., 2016)

## Partie II : Régulation transcriptionnelle de la calpaïne-6

---

## Chapitre 2 : Régulation transcriptionnelle de la calpaïne-6

### I. Introduction

L'expression de la calpaïne-6 semble très régulée dans des conditions physiologiques, par exemple, elle est exprimée dans quelques tissus embryonnaires et elle est réprimée après la naissance. Il est donc important de comprendre les mécanismes qui permettent sa réexpression dans les cancers. Ces mécanismes pouvant constituer de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles

### II. Résultats et discussion

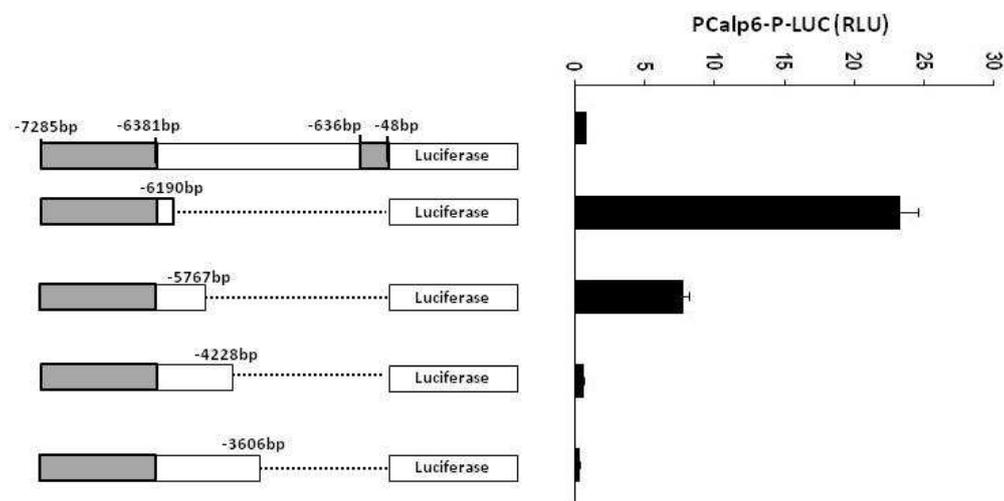
#### II.1. Système rapporteur Calp6-P

L'ARNm codant la calpaïne-6 et la protéine correspondante sont présents à des niveaux faibles dans les cellules de sarcome et sont difficilement détectables. Les travaux de Tonami et coll., ont montré que la surexpression de calpaïne-6 contrôlée par un promoteur fort perturbe la cytodiérese et induit la production de cellules multi nucléés. (Tonami et al., 2007) Cela suggère que l'expression de cette protéine doit être finement régulée au cours du cycle cellulaire et que les ARNm ont une durée de vie limitée. Liu et coll. ont par ailleurs rapporté que la stabilité de la protéine est régulée notamment par la voie PI3K/AKT. Pour s'affranchir des contraintes liées à la détection de la calpaïne-6, nous avons mis en place un nouvel outil pour étudier la régulation de la calpaïne-6 et pour identifier les cellules exprimant cette protéine. Nous avons construit un système rapporteur dans lequel la séquence régulatrice de *CAPN6* contrôle l'expression de la luciférase ou de la GFP.

La première étape a consisté à identifier cette séquence. En effet, Liu et coll. ont étudié l'activité transactivatrice de la région située entre -2000 et + 200 pb autour de l'ATG et ont retenu la séquence -93/+200 pb comme région régulatrice de *CAPN6*. Cependant, l'analyse de ce gène par le logiciel Genomatix suggère 2 séquences promotrices possibles. L'une est située autour de l'ATG (exon 1), l'autre s'étend entre -7285 et -6381 pb en amont de l'ATG. Pour déterminer le départ de transcription réel, nous avons utilisé un kit pour rétro transcrire des ARN extraits de cellules d'ostéosarcome ou de 293T puis amplifié la partie en 5' des ADNc obtenus. Les produits d'amplification ont été clonés et séquencés. L'alignement de la séquence génomique avec les séquences des ADNc a permis de déduire

que le promoteur actif est situé entre -7285 et -6381 pb. Nous avons donc amplifié et cloné la séquence entre -7285 et l'ATG dans le plasmide pGL4.10 devant le gène rapporteur luciférase (Calp6-P-LUC) pour étudier l'activité transactivatrice. Nous montrons que cette activité peut être stimulée par l'endothéline-1 et que cette activation est bloquée par un inhibiteur de la voie NF- $\kappa$ B. Ainsi, l'activité de la séquence clonée est modulée par des mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression de la calpaïne-6. (Liu et al., 2011; Marion et al., 2012) Nous avons ensuite remplacé le gène rapporteur luciférase par une séquence codant la GFP (Calp6-P-GFP) et montré la plus forte expression de la calpaïne-6 dans les cellules exprimant la GFP. Nous avons donc validé notre système rapporteur pour étudier la régulation transcriptionnelle de la calpaïne-6 et pour identifier les cellules exprimant la calpaïne-6.

Les expériences de Liu et coll., suggéraient la présence d'une séquence avec une activité inhibitrice en amont de l'ATG. Nous avons également effectué des délétions dans Calp6-P. En fait, la séquence totale avait une activité faible qui a été fortement augmentée quand la séquence entre -6190 et l'ATG a été supprimée. L'allongement de ce fragment d'ADN en 3' jusqu'à -4228 a bloqué complètement cette activité. Il existe donc bien une séquence qui lie des facteurs répresseurs entre -6190 et -4228. (Figure 44) Il serait intéressant d'identifier ces facteurs qui pourraient servir pour inhiber l'expression de la calpaïne-6 dans les cellules de sarcome.



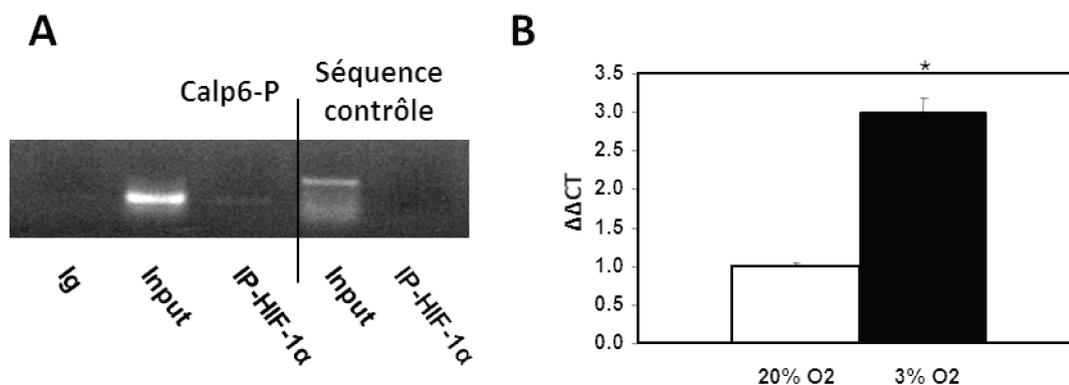
**Figure 44: Activité transactivatrice de la séquence régulatrice de la calpaïne-6**

La séquence comprise entre -7285 et l'ATG a été clonée dans le plasmide pGL4.10 devant le gène rapporteur luciférase (panneau de gauche). Les zones grises représentent les séquences promotrices théoriques. La séquence clonée a été modifiée par digestion enzymatique. Des cellules 143B ont été transfectées avec les différentes constructions et un plasmide codant la renilla servant de contrôle. L'activité luciférase et renilla ont été mesurées par des substrats luminescents. Les résultats (panneau de droite) sont la moyenne des unités relatives de lumière (RLU)  $\pm$  SEM mesurée dans 4 puits indépendants.

L'analyse de la séquence de Calp6-P a, par ailleurs, permis d'identifier ou de confirmer différentes voies de signalisations impliquées dans la régulation de la calpaïne-6. En effet, la séquence comporte 3 sites de liaison putatifs pour les facteurs induits par l'hypoxie (HIF), 7 sites consensus pour le facteur de transcription NF- $\kappa$ B et de nombreux sites pouvant lier des facteurs de cellule souche comme Oct4, Sox2 et Nanog . (Figure 45)



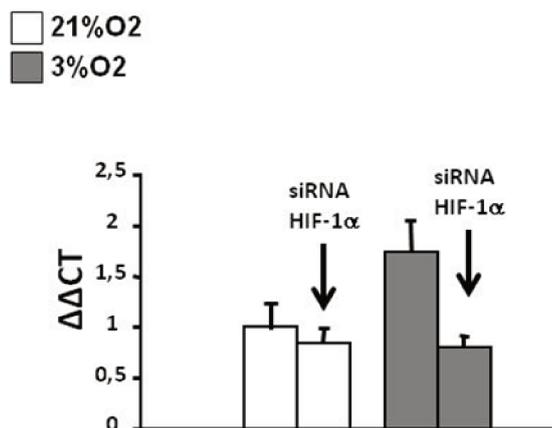
présence de facteur HIF-1 $\alpha$  lié à Calp6-P. Comme attendu, l'hypoxie (3% O<sub>2</sub>) a augmenté la quantité de facteur HIF-1 $\alpha$  associé à Calp6-P (Figure 46).



**Figure 46: Liaison des facteurs HIF-1 $\alpha$  à la séquence régulatrice de la calpaïne-6**

- (A) Analyse par CHIP de la fixation du facteur de transcription HIF-1 $\alpha$  sur la séquence régulatrice de la calpaïne-6. Les complexes ADN-HIF-1 $\alpha$  ont été fixés puis la chromatine a été fragmentée. L'ADN a été immunoprécipité avec des IgG contrôles ou avec des anticorps anti-HIF-1. Les ADN immunoprécipités ont été amplifiés par PCR en utilisant des amorces spécifiques de la séquence régulatrice de la calpaïne-6 ou des amorces spécifiques d'une région sans HRE. De l'ADN génomique non précipité (Input) sert de contrôle positif. Les produits de PCR ont été déposés sur gel d'agarose 1% en présence de BET.
- (B) Analyse par qPCR des ADN immunoprécipités. Les résultats sont exprimés en moyenne de  $\Delta\Delta CT \pm SEM$  (n=3 extraits de différentes cultures). \* indique une différence significative entre les cellules cultivées en hypoxie ou avec 21% O<sub>2</sub>. (p<0,05)

L'hypoxie augmente le niveau d'expression de la calpaïne-6. De plus, nos résultats montrent que la calpaïne-6 est fortement exprimée dans les zones hypoxiques dans les tumeurs murines, et dans les cellules où HIF-1 $\alpha$  s'accumule dans les tumeurs humaines. Dans les cellules humaines, HIF-1 $\alpha$  semble être le médiateur principal de l'hypoxie. En effet, des siRNA spécifiques de ce facteur sont capables de bloquer totalement l'induction de calpaïne-6 sous hypoxie. (Figure 47)

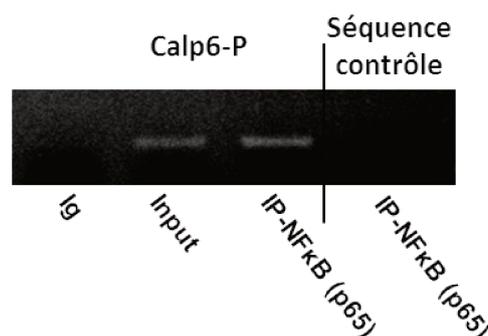


**Figure 47: Effets de l'inhibition de HIF-1 $\alpha$  sur l'induction de l'expression de la calpaïne-6 par l'hypoxie**

Analyse par RT-qPCR de l'expression de la calpaïne-6 après inhibition de HIF-1 $\alpha$ . Les cellules d'ostéosarcome humain ont été cultivées en présence de 21% ou 3% d'O<sub>2</sub>. Ces cellules ont été transfectées avec des siRNA contrôles ou spécifiques de HIF-1 $\alpha$ . Les résultats sont exprimés en moyenne de  $\Delta\Delta CT \pm SEM$  (n=3 extraits de différentes cultures).

### II.3. La calpaïne-6 est une cible directe de NF- $\kappa$ B

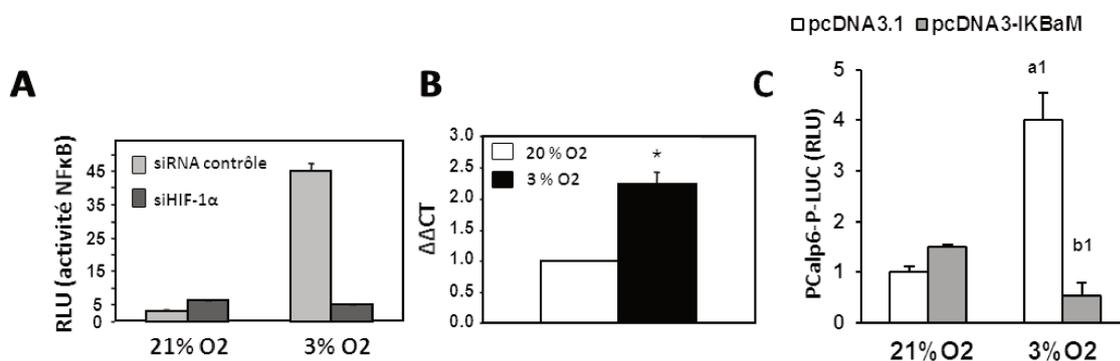
Nous avons montré précédemment que l'expression de la calpaïne-6 est dépendante de l'activation de la voie NF- $\kappa$ B. (Marion et al., 2012) Nous montrons ici que la calpaïne-6 est une cible directe de cette signalisation puisque Calp6-P contient des sites fonctionnels pour lier ces facteurs. (Figure 48)



**Figure 48: Liaison des facteurs NF- $\kappa$ B à la séquence régulatrice de la calpaïne-6.**

Analyse par ChIP de la fixation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B sur la séquence régulatrice de la calpaïne-6. Les complexes ADN-NF- $\kappa$ B ont été fixés puis la chromatine a été fragmentée. L'ADN a été immunoprécipité avec des IgG contrôles ou avec des anticorps anti-p65. Les ADN immunoprécipités ont été amplifiés par PCR en utilisant des amorces spécifiques de la séquence régulatrice de la calpaïne-6 ou des amorces spécifiques d'une région sans site de fixation pour p65. De l'ADN génomique non précipité (Input) sert de contrôle positif d'amplification. Les produits de PCR ont été déposés sur un gel d'agarose 1% en présence de BET.

La voie de signalisation NF- $\kappa$ B est impliquée dans la réponse des cellules au stress hypoxique. (Koong et al., 1994) Dans les cellules de sarcome, l'activité transcriptionnelle résultant de l'activation de la voie NF- $\kappa$ B par l'hypoxie est dépendante de HIF-1 $\alpha$ . (Figure 49A) De plus, l'hypoxie augmente la liaison de NF- $\kappa$ B à Calp6-P. (Figure 49B) Le blocage de la voie NF- $\kappa$ B grâce à l'expression d'une forme mutée de I $\kappa$ B (I $\kappa$ BM) réduit fortement l'activité transcriptionnelle de Calp6-P (Figure 49C). Ces résultats indiquent que l'expression de la calpaïne-6 est stimulée par l'hypoxie qui active HIF-1 $\alpha$  et indirectement la signalisation NF- $\kappa$ B.

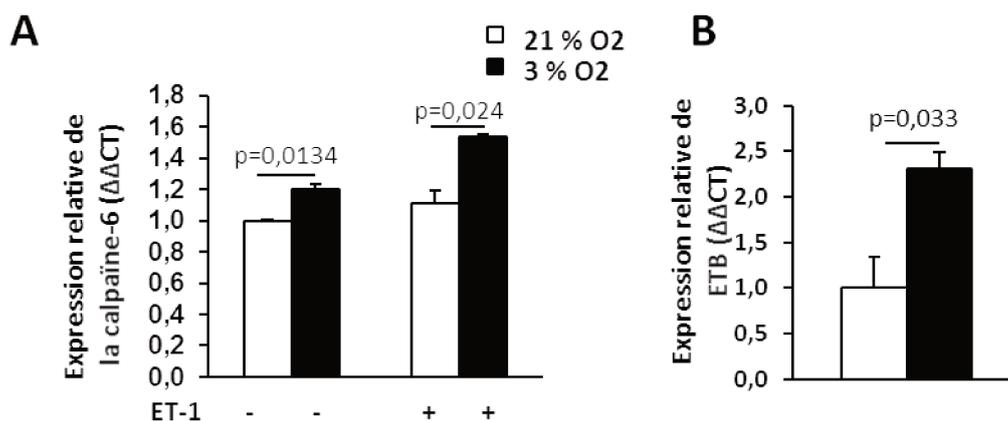


**Figure 49: Liaison des facteurs NF- $\kappa$ B à la séquence régulatrice de la calpaïne-6**

- (A) Mesure par luminescence de l'activité transcriptionnelle de NF- $\kappa$ B. Les cellules d'ostéosarcome humain ont été cultivées en présence de 21% ou 3% d'O<sub>2</sub>. Ces cellules ont été transfectées avec un plasmide rapporteur contenant des éléments de réponse à NF- $\kappa$ B et des siRNA contrôles ou spécifiques de HIF-1 $\alpha$ . Les résultats sont exprimés en unité relative de lumière (RLU)  $\pm$  SEM (n=4 extraits de différentes cultures).
- (B) Analyse par qPCR des fragments d'ADN immunoprécipités. Les résultats sont exprimés en moyenne de  $\Delta\Delta$ CT  $\pm$  SEM (n=3 extraits de différentes cultures). \* indique une différence significative entre les cellules cultivées en hypoxie ou avec 21% O<sub>2</sub>. (p<0,05).
- (C) Mesure par luminescence de l'activité transactivatrice de la calpaïne-6. Les cellules 143B ont été transfectées avec pGL4.10-Calp6-P-LUC ou pGL4.10 vide et un plasmide contrôle ou codant I $\kappa$ BM et un plasmide codant la Renilla. Les cellules d'ostéosarcome humain ont été cultivées en présence de 21% ou 3% d'O<sub>2</sub>. Les résultats sont exprimés en unité relative de lumière (RLU). Les résultats sont corrigés par l'activité Renilla. Les résultats sont la moyenne des unités relative de lumière (RLU)  $\pm$  SEM (n=4 extraits de différentes cultures). a1= 3,12058E-05 valeur de p de la différence entre les cellules cultivées en 21%O<sub>2</sub> et les cellules cultivées en 3%O<sub>2</sub>, b1=2,218E-05 valeur de p de la différence entre les cellules pcDNA contrôles et les cellules pcDNA I $\kappa$ BM.

Il est établi que la réponse à l'hypoxie implique la production de cytokines qui induisent la signalisation NF- $\kappa$ B en se liant à leur récepteur.(Felx et al., 2006) Notamment, HIF-1 $\alpha$  induit l'expression de l'ET-1 dans des cellules tumorales, ce qui permet de favoriser

l'angiogenèse et l'adaptation des cellules à un environnement hypoxique. (Gras et al., 2016) Nous montrons ici que l'hypoxie augmente également la réponse des cellules tumorales à l'ET-1. En effet, dans certaines lignées cellulaires d'ostéosarcome comme les 143B, l'hypoxie multiplie par 2 l'augmentation de calpaïne-6 induite par l'ET-1. (Figure 50A) Cela peut être dû à l'augmentation de l'expression du récepteur d'ET-1, ETB qui est observée dans les cellules hypoxiques. (Figure 50B)

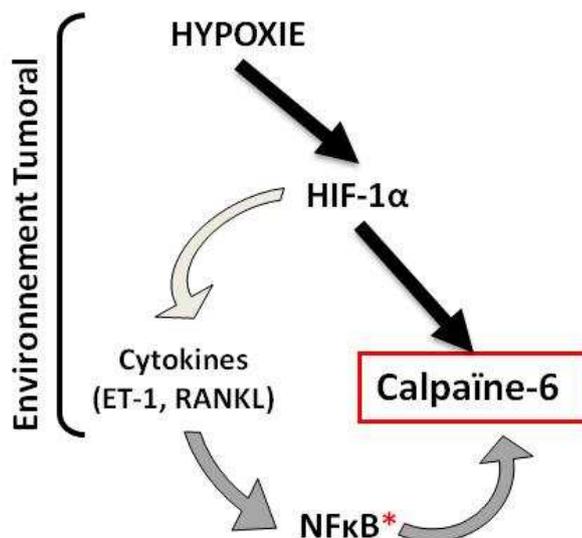


**Figure 50: L'hypoxie augmente la réponse à l'ET-1 dans les cellules 143B**

- (A) Analyse par RT-qPCR de l'expression de la calpaïne-6. Les résultats sont exprimés en moyenne de  $\Delta\Delta CT \pm SEM$  (n=3 extraits de différentes cultures).
- (B) Analyse par RT-qPCR de l'expression d'ETB. Les résultats sont exprimés en moyenne de  $\Delta\Delta CT \pm SEM$  (n=3 extraits de différentes cultures).

De la même façon, dans certaines lignées cellulaires, nous avons mis en évidence que l'hypoxie augmente l'induction de la calpaïne-6 par le RANKL et l'expression de RANK.

En conclusion, l'expression de la calpaïne-6 est modulée par l'environnement tumoral, Elle dépend notamment du niveau d'oxygène et des cytokines qui sont produites dans l'environnement hypoxique. (Figure 51)



**Figure 51: Régulation de la calpaïne-6 par des éléments du microenvironnement des cellules tumorales**

Les cellules tumorales mais aussi les ostéoblastes produisent de l'ET-1 et du RANKL. L'hypoxie active HIF-1 $\alpha$  et augmente l'expression des cytokines qui activent la voie NF- $\kappa$ B. HIF-1 $\alpha$  peut également réguler directement la calpaïne-6 en se liant à son promoteur.

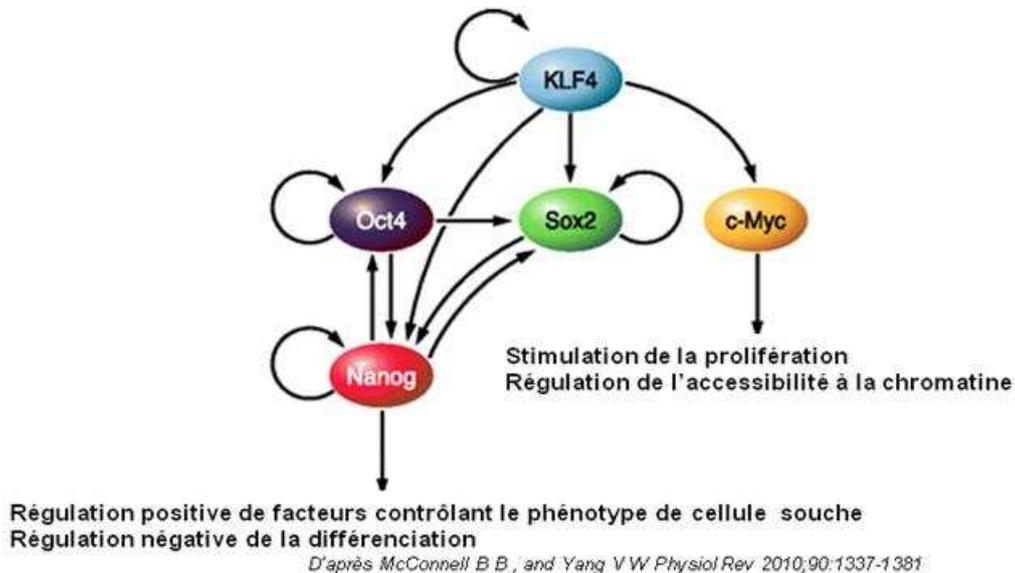
### II.3. L'expression de la calpaïne-6 est contrôlée par les facteurs Oct4, Nanog et Sox2.

La séquence Calp6-P contient un nombre important de sites consensus spécifiques des facteurs Oct4, Nanog et Sox2. Nos résultats de CHIP montrent que ces sites sont fonctionnels. Mais l'association des facteurs avec Calp6-P est surtout évidente quand les cellules sont cultivées en hypoxie. Ces résultats sont cohérents avec les études révélant que l'hypoxie augmente l'expression d'Oct4 et Nanog dans des lignées de cellules cancéreuses de poumons et de prostate et dans les tumeurs cérébrales. (Mathieu et al., 2011; Miyazawa et al., 2014; Prasad et al., 2017)

Les facteurs Oct4, Nanog et Sox2 agissent conjointement pour augmenter l'expression de la calpaïne-6. Nous avons montré que l'inhibition d'un des trois facteurs suffit à bloquer l'augmentation de l'expression de calpaïne-6 induite par l'hypoxie.

Dans les cellules souche embryonnaires Oct4, Nanog et Sox2 forment un réseau de facteurs qui s'autorégulent et se contrôlent mutuellement. Ils agissent avec KLF4 et c-Myc pour réguler l'expression des gènes de différenciation et de pluri-potentialité. (Figure 52) Il est à noter que Calp6-P contient 7 sites consensus pour KLF4. La calpaïne-6 est donc contrôlée comme un gène impliqué dans le développement ce qui est cohérent avec le fait

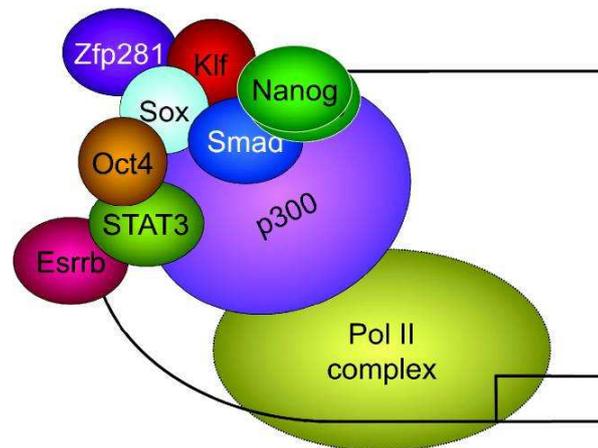
que cette protéine est exprimée surtout dans des tissus embryonnaires et que sa délétion accélère la différenciation des cellules musculaires. (Dear et al., 1997; Tonami et al., 2013) La calpaïne-6 apparaît donc comme une protéine oncofœtale.



#### Figure 52: Régulation et autorégulation des facteurs de transcription Nanog, Oct4 et Sox2

Ces facteurs de transcription coopèrent avec KLF4 et c-Myc pour maintenir le phénotype de cellule souche ou inhiber la différenciation cellulaire. *D'après McConnell & Yang, 2010*

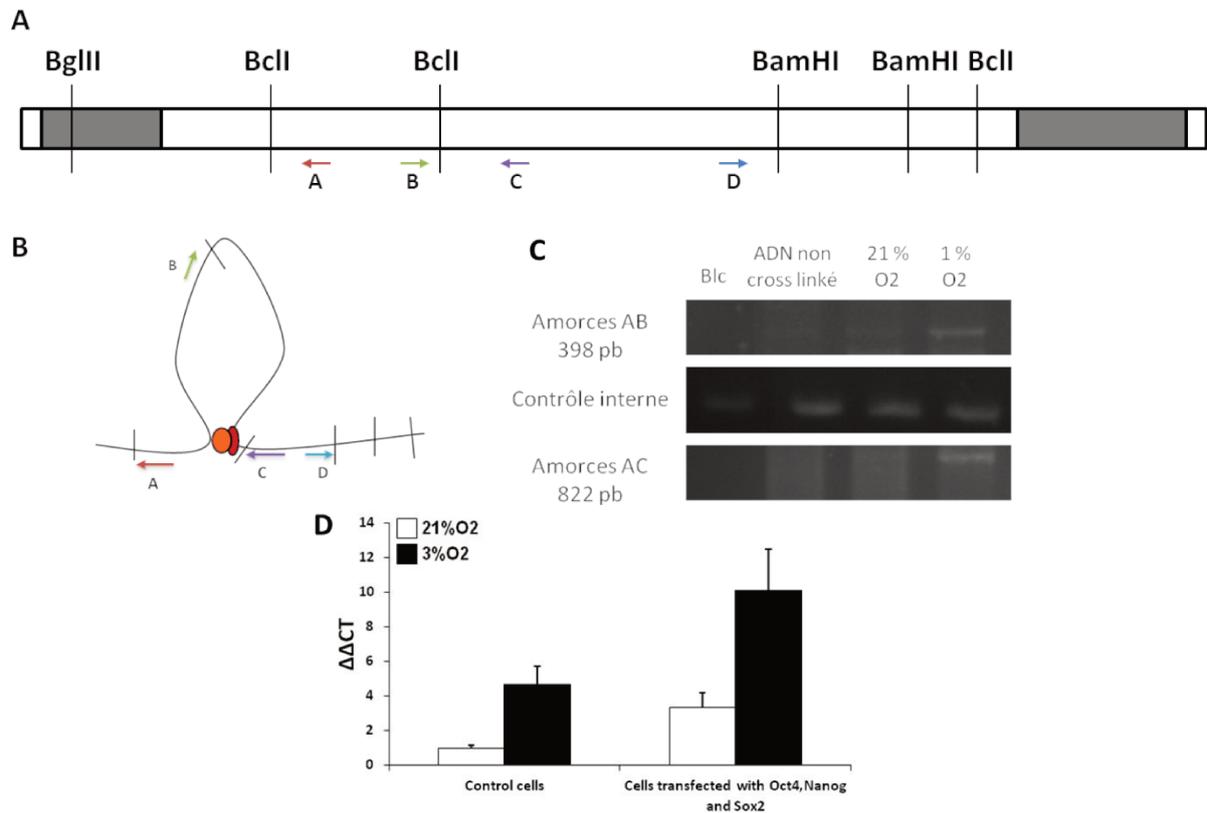
Il a été rapporté que Nanog et Oct4 peuvent avoir une activité activatrice ou répressive selon les cofacteurs recrutés. (Liang et al., 2008) Nanog, Oct4 et Sox2 peuvent être impliqués dans des modifications de la conformation de la chromatine, par exemple en recrutant des cofacteurs régulateurs de l'accessibilité à l'ADN cible, soit des coactivateurs comme CBP ou p300 qui influencent l'acétylation des histones ou au contraire des corépresseurs avec une activité déacétylase. (Chen et al., 2008) D'autre part, en interagissant entre eux ou avec d'autres éléments distants ces facteurs pourraient également permettre la formation d'une boucle de l'ADN. Il a été montré que ce type d'évènements peut activer la transcription en augmentant la concentration locale de certains facteurs de transcription, de cofacteurs et de facteurs modifiant la chromatine à proximité du site de début de transcription. (Dekker, 2002; Scheif, 1992) (Figure 53)



**Figure 53: Mode d'action des facteurs de cellule souche sur le promoteur du gène inhibiteur de différenciation, (Id3) dans des cellules souche embryonnaires**

Oct4 permet la liaison de Sox2 et Nanog puis le recrutement de différents facteurs de transcription comme Sma1 et STAT3. Ce complexe interagit avec p300 et l'ARN polymérase II (Pol II) pour moduler la transcription du gène. *D'après Chambers & Tomlinson, 2009*

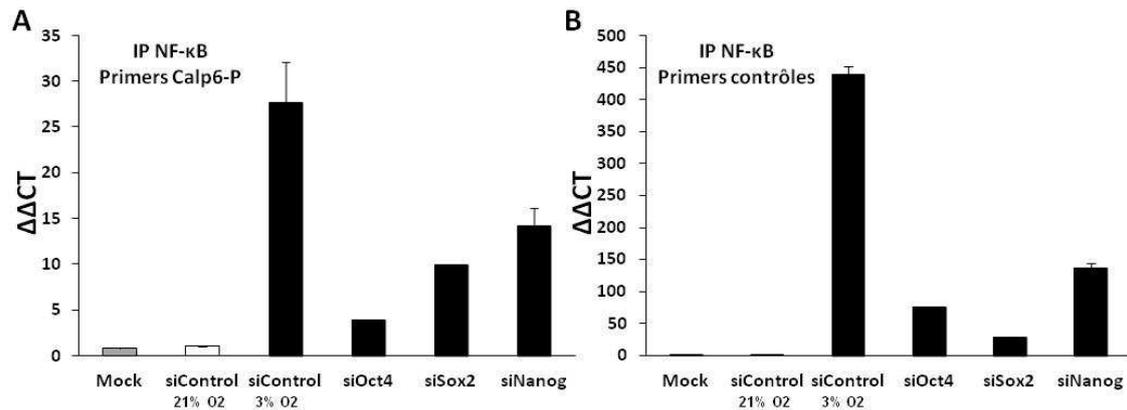
Etant donné la répartition des sites consensus pour les facteurs Oct4, Nanog et Sox2 sur la séquence régulatrice Calp6-P, nous avons émis l'hypothèse que ces facteurs pourraient former de tels complexes et modifier la conformation de la chromatine dans la séquence Calp6-P. Nous avons donc réalisé une étude de capture de la conformation de chromatine (3C). (Figure 54A) Nos résultats suggèrent que les séquences situées vers - 1912 pb et - 4580pb dans Calp6-P pourraient être liées. (Figure 54B) Cette modification de la chromatine semble bien dépendre de la présence d'Oct4 Sox2 et Nanog, puisque les produits de PCR correspondants à cette conformation sont plus abondants quand les cellules sont cultivées en hypoxie ou quand les facteurs sont surexprimés (Figure 54C et D) On peut émettre l'hypothèse que la modification de conformation induite par la formation du complexe de facteurs de transcription pourrait mettre hors circuit la séquence répressive de Calp6-P.



**Figure 54: Analyse par 3C de la séquence régulatrice de la calpaïne-6**

- (A) Représentation schématique des coupures enzymatiques effectuées et des amorces utilisées pour la 3C, le couple d'amorces AB servent de contrôle interne. Les couples d'amorces, AC et AD nous permettent par PCR de mettre en évidence des liaisons de régions éloignées de l'ADN comme illustré.
- (B) Représentation schématique de la boucle d'ADN attendue entre -1912 pb et -4580 pb.
- (C) PCR effectuée sur l'ADN extrait après immunoprécipitation.
- (D) qPCR sur les ADN extraits de cellules contrôles ou transfectées avec des plasmides codant pour Oct4, Sox2 et Nanog. Les amorces AD ont été utilisées. Les résultats sont exprimés en moyenne de  $\Delta\Delta CT \pm SEM$  (n=3 extraits de différentes cultures).

Il est apparu intéressant de mieux caractériser la formation du complexe de facteurs de transcription impliquant Oct4 Sox2 et Nanog afin d'inhiber l'expression de la calpaïne-6. Nous avons notamment déterminé si la présence d'Oct4, Nanog et Sox2 sur Calp6-P pouvait moduler les interactions entre NF- $\kappa$ B et cette séquence. Nous avons montré que l'inhibition de l'expression d'Oct4, Sox2 ou Nanog altérait la liaison de NF- $\kappa$ B à la région promotrice de la calpaïne-6. (Figure 55A) Mais de façon surprenante l'inhibition de ces facteurs altérait de la même façon la liaison de NF- $\kappa$ B sur le promoteur de la GAPDH qui était utilisé comme contrôle positif du CHIP. Or, ce promoteur ne contient pas de sites pour Oct4, Nanog ou Sox2. (Figure 55B)



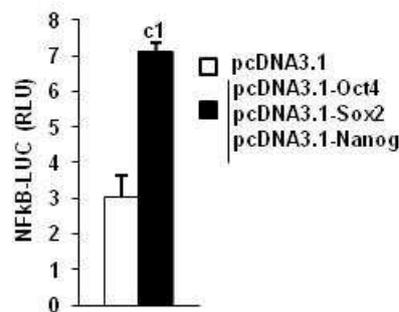
**Figure 55: Les facteurs Oct4, Sox2 et Nanog modulent la liaison de NFκB à la région promotrice de la calpaïne-6**

L'ADN et les protéines associées ont été fixée avec du PFA extraits des cellules 143B cultivées en hypoxie et incubés avec des anti-NF-κB. Après séparation sur des billes magnétiques couplées aux protéines A et G, l'ADN a été purifié et la séquence du promoteur de la calpaïne a été amplifiée par qPCR. De l'ADN non précipité a servi de contrôle (Input). Les  $\Delta\Delta CT$  sont calculés en prenant les valeurs des cellules si contrôle 21%O2 comme valeurs de référence. Les résultats exprimés sont la moyenne de 3 mesures  $\pm$  SEM.

(A) qPCR réalisée en utilisant des amorces spécifiques de Calp6-P.

(B) qPCR réalisée en utilisant des amorces spécifiques d'une séquence ne comportant pas de sites de liaisons à Oct4, Sox2 et Nanog.

De façon cohérente, l'inhibition comme la surexpression des facteurs Oct4, Nanog et Sox2 modulent l'activité transcriptionnelle contrôlée par la voie NF-κB. Il semble donc que les facteurs de cellule souche influencent cette signalisation. (Figure 56) Pour étudier spécifiquement les interactions des différents facteurs avec Calp6-P il faudra donc sur exprimer NF-κB en même que les autres facteurs.



**Figure 56: La surexpression d'Oct4, Sox2 et Nanog régule la signalisation NF-κB**

Les cellules d'otéosarcome 143B ont été ensemencées en plaques 24 puits et transfectées avec le plasmide pGL4.10 ou la construction rapporteur NF-KB et le plasmide pcDNA3.1 vide ou un cocktail de plasmides codants pour Oct-4, Sox2 et Nanog. Les résultats sont des valeurs moyennes des unités de lumière relative (RLU) de 3-4 puits  $\pm$  SEM.  $c1 = 1,0603E-05$  est la valeur p de la différence entre les cellules transfectées avec pcDNA3.1 et les cellules transfectées avec pcDNA3.1-Oct4, Sox2 et Nanog

# Discussion Générale et perspectives

---

## I. Discussion

Pour améliorer les chances de survie des patients ayant développé des tumeurs osseuses, un effort considérable a été apporté ces dernières années pour déchiffrer les anomalies génétiques à l'origine de ces tumeurs et pour comprendre les relations entre la tumeur et le tissu hôte. (Taran et al., 2017) (Limin & Dennis, 2015) Cependant, plusieurs arguments poussent à envisager la progression tumorale sous un autre angle. Les tumeurs sont des tissus hétérogènes constitués de cellules qui ont des capacités diverses pour résister aux agents de chimiothérapie ou pour former de métastases. Ces métastases et les récurrences locales peuvent se développer longtemps après une période de rémission. (Eide & Druker, 2017; Valent et al., 2012) Ainsi, des cellules tumorales peuvent rester dans un état latent ou dormant et reproduire une tumeur après un stimulus inconnu. (Aponte & Caicedo, 2017; Zaidi et al., 2017) Ces données suggèrent que le développement des sarcomes osseux implique des cellules avec des caractéristiques de CSC.

Parce que la calpaïne-6 permet d'identifier des cellules à la tête de la hiérarchie cellulaire, initiatrices de tumeur et de métastase et également plus résistantes aux traitements, nous proposons la calpaïne-6 comme nouveau marqueur de cellules souche des sarcomes.

Cependant, une des questions importantes qu'il reste à résoudre est celle de la contribution réelle de ce type de cellules à l'initiation et/ou au développement des sarcomes. Pour répondre à cette question, nous avons construit 1 plasmide qui code la CRE recombinase fusionnée avec le récepteur aux œstrogènes (CRE-ER) sous le contrôle de Calp6-P. Ce plasmide associé avec Rosa26 mT/mG (#17787, Addgene) nous permettra de tracer la descendance des cellules calpaïne-6<sup>+</sup> implantées chez la souris. Nous avons précédemment montré que les tumeurs osseuses qui sont des récurrences sont très enrichies en calpaïne-6. Cela suggère que les cellules calpaïne-6<sup>+</sup> pourraient jouer un rôle dans le développement de ces récurrences. Il sera particulièrement important de définir ce rôle non seulement dans les récurrences locales mais aussi métastatiques. En effet, il semble impossible de prévoir et donc de prévenir la survenue d'un sarcome puisqu'il dépend d'une équation complexe impliquant des altérations géniques et un environnement particulier. Les progrès de la chirurgie permettent des résections conservatrices de la tumeur. Il reste donc crucial

de comprendre le processus métastatique qui est le principal évènement qui réduit la survie des patients.

Bien que nous ayons précédemment montré une corrélation inverse entre l'expression de la protéine calpaïne-6 dans des tumeurs osseuse primaires et la réponse à la chimiothérapie, les analyses de transcriptome effectués sur des extraits de tumeurs n'ont pas permis d'associer de façon significative l'expression de la calpaïne-6 à des caractéristiques cliniques comme le grade ou la présence de métastases. La seule publication rapportant une analyse de tumeurs de la tête et du cou ne montre aucune association, excepté une corrélation inverse entre l'expression de calpaïne-6 et la survie des patients. (Xiang et al., 2017) Ces résultats contradictoires avec les fonctions de la calpaïne-6 montrées par ailleurs, sont peut-être dus à la possible rareté des cellules de type souche dans des tumeurs déjà bien évoluées. Il semble donc impossible de se servir de la calpaïne -6 comme marqueur pronostic. Par contre, la calpaïne-6 pourrait servir de marqueur de cellules souche pour des analyses de transcriptome et de génome de cellules individuelles qui permettraient de mieux caractériser sur le plan moléculaire des cellules souche des tumeurs et ainsi d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

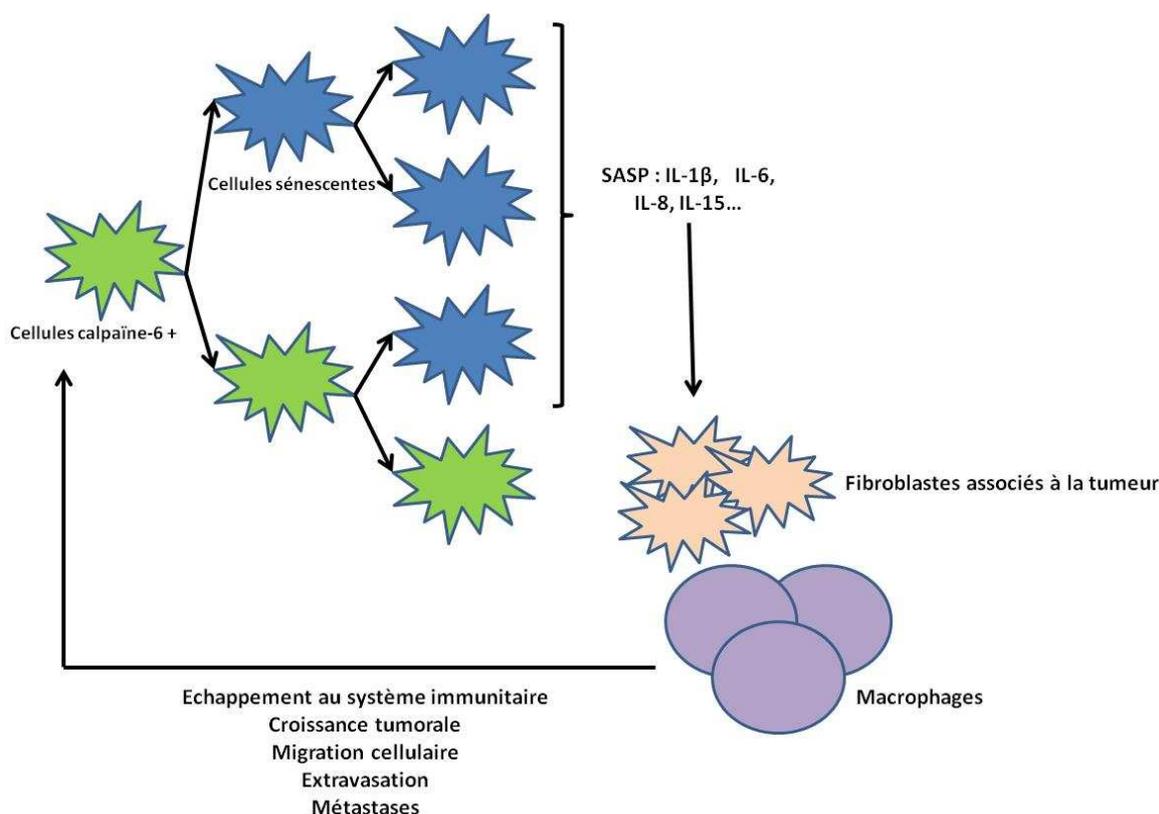
La calpaïne-6 apparaît elle-même comme une cible thérapeutique. En effet, nos résultats indiquent qu'elle remplit des fonctions importantes au sein de ces cellules en contrôlant leur destin. La calpaïne-6 est un médiateur des effets de l'hypoxie directement impliqué dans le processus d'autophagie et dans la prévention de l'entrée en sénescence.

Il semble que la progression tumorale implique la production de cellules sénescents. Ces cellules produisent des cytokines inflammatoires qui servent à recruter les cellules du stroma tumoral notamment les cellules qui sont éduquées pour devenir des fibroblastes associés à la tumeur (TAF) qui eux-mêmes participent au développement tumoral en modelant le microenvironnement pour faciliter l'échappement des cellules cancéreuses vers des sites métastatiques et pour leurrer le système immunitaire. (Prime et al., 2016) Nous avons observé que l'injection de la population totale de cellules K7M2 dans le tibia des souris induisait le développement d'un plus grand nombre de nodules métastatiques par rapport à l'injection de cellules triées GFP<sup>+</sup> (Fig. 1 de l'article). Ce résultat pourrait indiquer que le processus métastatique précoce dépend en partie d'une coopération entre des

cellules calpaïne-6<sup>+</sup> et des autres cellules de la tumeur. Il peut donc sembler contradictoire d'avoir pour objectif d'induire la sénescence des cellules tumorales.

De façon intéressante Erenpreisa & Cragg ont décrit des mécanismes cellulaires qui sont propres aux CSC et leur permettent de passer les points de contrôle et d'échapper à l'arrêt du cycle cellulaire malgré l'instabilité génomique. (Erenpreisa & Cragg, 2013) Ces mécanismes impliquent des processus de sénescences et d'autophagie. Ils ont montré que des dommages à l'ADN induit par un agent de chimiothérapie ou par une catastrophe mitotique entraînent une polyploïdie associée à un état de sénescence réversible dans les CSC. Les dommages à l'ADN entraînent une augmentation de l'expression de p21 et/ ou p16 ce qui a pour effet un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M et l'augmentation de l'expression d'Oct4 puis de Nanog et Sox2. L'expression d'Oct4 induit l'activation de l'autophagie qui permet aux CSC de passer d'un état polyploïde à un état diploïde en dégradant les nucléi en surnombre et les protéines liées à la sénescence. Ce processus a été nommé « néosis ». (Rajaraman et al, 2005) Nos résultats indiquent que les cellules qui expriment la calpaïne-6 ont de nombreux points communs avec les CSC décrites par Erenpreisa & Cragg. Elles sont arrêtées en phase G2/M, elles sont polyploïdes et ont un flux autophagique dynamique et essentiel à leur survie. C'est un argument qui renforce nos conclusions sur le caractère souche des cellules qui expriment la calpaïne-6. Cela indique également qu'induire la sénescence spécifiquement de ces cellules souche pourrait être une stratégie thérapeutique efficace.

Finalement, l'expression de la calpaïne-6 nous a permis de distinguer au moins 2 types de cellules tumorales avec des destins très différents. Un type cellulaire est capable de s'auto renouveler, l'autre est susceptible d'entrée en sénescence. Nos résultats suggèrent que la descendance des cellules exprimant la calpaïne-6 forme la masse tumorale et serait essentiellement composée de cellules sénescences. Le fait que la suppression de la population des cellules exprimant la calpaïne-6 résulte en une inhibition du développement tumoral conforte l'idée que ces cellules constituent la source qui restaure continuellement les autres populations cellulaires tumorales. La figure 57 schématise l'organisation tumorale que l'on peut proposer à partir de nos résultats.



**Figure 57: Schéma de l'organisation tumorale possible dans les sarcomes osseux**

Les cellules exprimant la calpaïne-6 s'auto-renouvellent pour maintenir un pool stable de CSC et donnent des cellules capables d'entrer en sénescence qui composent la masse tumorale. Ces cellules sènescentes produisent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, l'IL-8 ou encore l'IL-15 appartenant au SASP. Ce qui a pour effet de recruter et d'éduquer des cellules du stroma afin de permettre aux cellules exprimant la calpaïne-6 d'échapper au système immunitaire, de migrer hors de la tumeur et de permettre la croissance tumorale et le développement des métastases.

## II. 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.

### II.1. Autophagie et développement métastatique

Nos résultats suggèrent que la calpaïne-6 est directement impliquée dans le processus d'autophagie mais pas dans la signalisation qui le contrôle en amont. En effet, nous n'avons pas observé que la suppression ou la surexpression induise des modifications des gènes *Atg*. Tonami et coll., ont montré que la calpaïne-6 stabilise le réseau de

microtubules. Le même groupe de chercheur a montré que la calpaïne-6 contrôle la dynamique des vésicules pinocytaires dans des macrophages. (Miyazaki et coll., 2016) Notre hypothèse est donc que la calpaïne-6 pourrait moduler le flux autophagique en agissant sur les microtubules et/ou en contrôlant le trafic vésiculaire qui dépend de ce réseau.

Récemment, il a été mis en évidence que le processus d'autophagie pouvait être lié à la migration cellulaire. En effet, l'autophagie via un récepteur cargo, NBR1, permet le désassemblage des adhésions focales au cours de la migration cellulaire. Les autophagosomes sont associés aux adhésions focales lors de ce désassemblage, ce qui pourrait permettre le recyclage des intégrines tels que l'intégrine  $\beta 1$  et des protéines du cytosquelette. L'inhibition de l'autophagie inhibe partiellement la dynamique des adhésions focales et empêche la migration cellulaire. (Kenific et al., 2016)

Ainsi, la calpaïne-6 pourrait contrôler les capacités métastatiques des cellules de sarcome en modulant les capacités migratoires des cellules tumorales. Notre premier objectif sera donc d'inhiber l'autophagie en utilisant la chloroquine pour déterminer si cela supprime les capacités métastatiques des cellules Calp6-P-GFP+. Le deuxième objectif sera de déterminer comment la surexpression ou la suppression de calpaïne-6 influence la migration des cellules d'ostéosarcome et modifie le cytosquelette d'actine, de vimentine et/ou des microtubules, la dynamique des autophagosomes, des adhésions focales et le recyclage des intégrines pour mettre en évidence les mécanismes impliqués.

Les travaux de Miyazaki et coll. sur les macrophages recrutés dans les plaques d'athéroscléroses montrent également que la calpaïne-6 est présente dans certaines vésicules associées aux lysosomes mais différentes des vésicules pinocytaires, des endosomes ou des mitochondries. De plus, la calpaïne-6 interagit avec CWC22 (spliceosome associated protein homolog) et régule la localisation cellulaire de ce facteur et par conséquent son activité. (Miyazaki et al., 2016) Ces données suggèrent que la calpaïne-6 pourrait avoir un rôle de protéine chaperonne comme p62 ou NBR1 et servir pour recruter des ligands spécifiques dans les autophagosomes et ainsi contribuer à une autophagie sélective de ces ligands. Nous chercherons donc à identifier des partenaires moléculaires de la calpaïne-6 par des méthodes de protéomique puis nous déterminerons si l'interaction

avec la calpaïne-6 permet de modifier la compartimentation subcellulaire et/ou le niveau d'expression des partenaires dans la cellule.

## **II.2. Inhibition des activités de la calpaïne-6 à des fins thérapeutiques**

L'objectif général de ce projet est d'apporter la preuve de concept que la calpaïne-6 peut être ciblée pour contrôler la croissance des tumeurs osseuses, le développement des métastases et la réponse à la chimiothérapie. La calpaïne-6 est une calpaïne atypique qui n'a pas d'activité catalytique connue. Nous ne pouvons donc pas envisager d'utiliser des inhibiteurs pharmacologiques comme pour les calpaïnes classiques. Notre stratégie sera plutôt d'essayer de perturber les interactions entre la calpaïne-6 et ses partenaires moléculaires. Pour cela nous étudierons les effets de l'expression de formes tronquées de la calpaïne-6. Nous avons réalisé des constructions pour exprimer dans les cellules cancéreuses les différents domaines de la calpaïne-6 (domaine II, III ou C2 terminal). Nous étudierons les effets sur le flux autophagique et la sénescence. Nous espérons à partir de cette étude concevoir des peptides pour inhiber les interactions et altérer les fonctions pro-tumorales de la calpaïne-6.

L'inhibition de la calpaïne-6 pourrait être un complément aux traitements classiques qui ciblent l'ensemble des cellules composant la tumeur mais qui ne sont pas efficaces sur les CSC. L'expression de la calpaïne-6 étant restreinte chez l'Homme après la naissance, nous espérons pouvoir obtenir un effet spécifique sur la tumeur et ne pas affecter les cellules saines.

## Liste des Abréviations

**2-HG:** Hydroxyglutarate  
**ABC:** ATP Binding Cassette  
**ADN:** Acide DésoxyriboNucléique  
**AKT:** Protein Kinase B  
**ALDH:** ALdéhyde DésHydrogénase  
**ARN:** Acide Ribo Nucléique  
**ATG:** Autophagy Related  
**ATP:** Adénosine Tri phosphate  
**BMP:** Bone Morphogenetic Protein  
**CBP:** Cyclic AMP response element-Binding Protein  
**CD:** Cluster of differentiation  
**CDK:** Cyclin-Dependent Kinase  
**ChIP:** Immuno Précipitation de la Chromatine  
**CRE:** CRE recombinase  
**CSC:** Cellules Souche Cancéreuses  
**CSE :** Cellule Souche Embryonnaire  
**CWC22:** spliceosome associated protein homolog  
**CXCR4:** CXC chemokine Receptor 4  
**DCV:** Dye Cycle Violet  
**DISC:** Death-Inducing Signaling Complex  
**DKK:** Dickkopf  
**DLL:** Delta Like Ligand  
**DNMT:** ADN méthyltransférases  
**DNMT:** DNA MethylTransferase  
**EGFR:** Epidermal Growth Factor Receptor  
**ERG:** ETS-Related Gene  
**ERK:** Extracellular signal-Related protein Kinase  
**ET :** EndoThéline  
**ETBR:** Endothelin type B receptor  
**EWS:** EWing Sarcoma  
**EZH:** Enhancer of Zeste Homolog  
**FLI1:** Friend Leukemia Integration 1 transcription factor  
**GFP:** Green Fluorescent Protein  
**Gli:** Glioma-associated oncogene homolog  
**GRP:** Gastrin-releasing peptide  
**GSF:** Groupe Sarcome Français  
**H:** Histone H  
**H3K9me:** méthylation de la lysine n de l'Histone H3  
**HDAC:** histone désacétylase  
**HES:** mammalian homolog of the hairy gene  
**HEY:** Hairy Ears, Y-Linked  
**Hh:** Hedgehog  
**HIF:** Hypoxia Inducible Factor  
**HRE :** Eléments de Réponse à l'Hypoxie  
**IDH:** Isocitrate DeHydrogenase  
**IFN:** Interféron  
**IGF1:** Insulin-like Growth Factor 1 Receptor  
**IGS:** Inhibitors of the Gamma Secretase  
**IL-:** InterLeukin-

**iPSC:** induced Pluripotent Stem Cell  
**I $\kappa$ B:** Inhibitors of NF- $\kappa$ B  
**LMC:** Leucémie Myéloïde Chronique  
**lncRNA:** long non coding RNA  
**MAPK:** Mitogen-Activated Protein Kinase  
**MDR:** MultiDrug Resistance  
**MEC:** Matrice ExtraCellulaire  
**miR:** micro ARN  
**MMP:** Matrix Metallo Proteinase  
**mTOR:** mammalian Target Of Rapamycin  
**NF- $\kappa$ B:** Nuclear Factor of Kappa light polypeptide gene enhancer in B-cell  
**NGF:** Nerve Growth Factor  
**NICD:** Notch IntraCellular Domain  
**NK:** Natural Killer  
**NRB1:** NeuraBin-1  
**Oct:** Octamer-binding transcription factor  
**OPG:** OstéoProtéGérine  
**PDGF:** Platelet Derived Growth factor  
**PK1:** Pyruvate Dehydrogenase Kinase isozyme 1  
**PDL:** Programmed Death Ligand  
**PDX:** Xénogreffe dérivée de Patients  
**PI3K:** Phosphatidylinositol 3 Kinase  
**PKC:** Protéine Kinase C  
**pRb:** Protéine du RétinoBlastome  
**Prx:** Paired related homeobox  
**PTEN:** Phosphatase and TENsin homolog  
**PTHrP:** ParaThyroid Hormone-related Protein  
**RANKL:** receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand  
**RECQL4:** hélicase à acide désoxyribonucléique  
**Smo:** Smoothened  
**Sox:** SRY (sex determining region Y)-box  
**STAT:** Signal Transducer and Activator of Transcription  
**TAZ:** Tafazzin  
**TGF:** Transforming Growth factor  
**TGF $\beta$ R:** Transforming growth factor, beta receptor  
**TNF:** Tumor Necrosis Factor  
**TRAIL:** TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand  
**UPR:** Unfolded Proteine Response  
**VEGF:** Vascular Endothelial Growth Factor  
**Wnt:** *wingless integration site*  
**WRN:** Werner Syndrome RecQ Like Helicase  
**YAP:** Yes-associated *protein*

## Bibliographie

[www.infosarcomes.org](http://www.infosarcomes.org)

[www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org)

- Adelman, D. M., Maltepe, E., & Simon, M. C. (1999). Multilineage embryonic hematopoiesis requires hypoxic ARNT activity. *Genes and Development*, *13*(19), 2478–2483. <http://doi.org/10.1101/gad.13.19.2478>
- Adhikari, A. S., Agarwal, N., Wood, B. M., Porretta, C., Ruiz, B., Pochampally, R. R., & Iwakuma, T. (2010). CD117 and Stro-1 identify osteosarcoma tumor-initiating cells associated with metastasis and drug resistance. *Cancer Research*, *70*(11), 4602–12. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3463>
- Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., & Clarke, M. F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci*, *100*. <http://doi.org/10.1073/pnas.0530291100>
- Alava, De, Antonescu CR, Panizo A, Leung D, Meyers PA, Huvos AG, Pardo-Mindán FJ, Healey JH, L. M. (2000). Pronostic impact of P53 status in Ewing sarcoma. *Cancer*, (89), 783–792. Retrieved from <https://www-ncbi-nlm-nih-gov.gate2.inist.fr/pubmed/?term=antonescu+p53+status+ewing+sarcoma+2000>
- Alfranca, A., Martinez-Cruzado, L., Tornin, J., Abarategi, A., Amaral, T., De Alava, E., ... Rodriguez, R. (2015). Bone microenvironment signals in osteosarcoma development. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *72*(16), 3097–3113. <http://doi.org/10.1007/s00018-015-1918-y>
- Allemani, C., Weir, H. K., Carreira, H., Harewood, R., Spika, D., Bannon, F., ... Coleman, M. P. (2016). HHS Public Access, *385*(9972), 977–1010. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)62038-9](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)62038-9). Global
- Allen, M., & Jones, J. L. (2011). Jekyll and Hyde: The role of the microenvironment on the progression of cancer. *Journal of Pathology*, *223*(2), 162–176. <http://doi.org/10.1002/path.2803>
- Amary, M. F., Bacsi, K., Maggiani, F., Damato, S., Halai, D., Berisha, F., ... Flanagan, A. M. (2011). IDH1 and IDH2 mutations are frequent events in central chondrosarcoma and central and periosteal chondromas but not in other mesenchymal tumours. *Journal of Pathology*, *224*(3), 334–343. <http://doi.org/10.1002/path.2913>
- Antonescu CR, Gerald WI, Magid MS, et al. (1998). Molecular variants of EWS-WT1 gene fusion in desmoplastic small round cell tumor. *Diagn Mol Pathol*, (7), 24–28. Retrieved from <https://www-ncbi-nlm-nih-gov.gate2.inist.fr/pubmed/9646031>
- Aponte, P. M., & Caicedo, A. (2017). Stemness in cancer: Stem cells, cancer stem cells, and their microenvironment. *Stem Cells International*, 2017. <http://doi.org/10.1155/2017/5619472>
- Armstrong, L. (2012). Epigenetic Control of Embryonic Stem Cell Differentiation. *Stem Cell*

*Reviews and Reports*, 8(1), 67–77. <http://doi.org/10.1007/s12015-011-9300-4>

- Awad, O., Yustein, J. T., Shah, P., Gul, N., Katuri, V., O'Neill, A., ... Loeb, D. M. (2010). High ALDH activity identifies chemotherapy-resistant Ewing's sarcoma stem cells that retain sensitivity to EWS-Fli1 inhibition. *PLoS ONE*, 5(11). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0013943>
- Bajaj, J., Zimdahl, B., & Reya, T. (2015). Fearful symmetry: Subversion of asymmetric division in cancer development and progression. *Cancer Research*, 75(5), 792–797. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-2750>
- Balamuth, N. J., & Womer, R. B. (2010). Ewing's sarcoma. *The Lancet Oncology*, 11(2), 184–192. [http://doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70286-4](http://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70286-4)
- Balicki, D. (2007). Moving Forward in Human Mammary Stem Cell Biology and Breast Cancer Prognostication Using ALDH1. *Cell Stem Cell*, 1(5), 485–487. <http://doi.org/10.1016/j.stem.2007.10.015>
- Bannister, A. J., & Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research*, 21(3), 381–395. <http://doi.org/10.1038/cr.2011.22>
- Ben-Porath, I., Thomson, M., Carey, V., Ge, R., Bell, G., Regev, A., & Weinberg, R. (2008). An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nature Genetics*, 40(5), 499–507. <http://doi.org/doi:10.1038/ng.127>
- Berika, M., Elgayyar, M. E., & El-Hashash, A. H. K. (2014). Asymmetric cell division of stem cells in the lung and other systems. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2, 33. <http://doi.org/10.3389/fcell.2014.00033>
- Bi, M., Naczki, C., Koritzinsky, M., Fels, D., Blais, J., Hu, N., ... Koumenis, C. (2005). ER stress-regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and promotes tumor growth. *The EMBO Journal*, 24(19), 3470–3481. <http://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600777>
- Bielack, S. S., Werner, M., Tunn, P. U., Helmke, K., Jürgens, H., Calaminus, G., ... Dhooge, C. (2015). Methotrexate, doxorubicin, and cisplatin (MAP) plus maintenance pegylated interferon alfa-2b versus MAP alone in patients with resectable high-grade osteosarcoma and good histologic response to preoperative MAP: First results of the EURAMOS-1 good respons. *Journal of Clinical Oncology*, 33(20), 2279–2287. <http://doi.org/10.1200/JCO.2014.60.0734>
- Blattmann, C., Thiemann, M., Stenzinger, A., Roth, E. K., Dittmar, A., Witt, H., ... Kulozik, A. E. (2015). Establishment of a patient-derived orthotopic osteosarcoma mouse model. *Journal of Translational Medicine*, 13(1), 136. <http://doi.org/10.1186/s12967-015-0497-x>
- Borst, P., Evers, R., Kool, M., & Wijnholds, J. (2000). A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(16), 1295–1302. <http://doi.org/10.1093/jnci/92.16.1295>
- Bouvier, C., Macagno, N., Nguyen, Q., Loundou, A., Jiguet-Jiglaire, C., Gentet, J.-C., ... Salas, S.

- (2016). Prognostic value of the Hippo pathway transcriptional coactivators YAP/TAZ and beta 1-integrin in conventional osteosarcoma. *Oncotarget*, 7(40), 64702–64710. <http://doi.org/10.18632/oncotarget.11876>
- Brown, H. K., Tellez-Gabriel, M., & Heymann, D. (2017). Cancer stem cells in osteosarcoma. *Cancer Letters*, 386, 189–195. <http://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.11.019>
- Brown SA, Clines GA, G. T. (2007). Local effects of malignancy on bone. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. <http://doi.org/10.1097/MED.0b013e3282f15419>
- Cahu, J., Bustany, S., & Sola, B. (2012). Senescence-associated secretory phenotype favors the emergence of cancer stem-like cells. *Cell Death & Disease*, 3(12), e446. <http://doi.org/10.1038/cddis.2012.183>
- Cancer Genome Atlas Research Network. (2013). Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult De Novo Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 368(22), 2059–2074. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa1301689>
- Castillero-Trejo, Y., Eliazer, S., Xiang, L., Richardson, J. A., & Ilaria, R. L. (2005). Expression of the EWS/FLI-1 oncogene in murine primary bone-derived cells results in EWS/FLI-1-dependent, Ewing sarcoma-like tumors. *Cancer Research*, 65(19), 8698–8705. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1704>
- Castresana JS, Barrios C, Gómez L, K. A. (1992). Amplification of the c-myc proto-oncogene in human chondrosarcoma. *Diagn Mol Pathol*. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pubmed/?term=castresana+1992++chondrosarcoma>
- Cavazzana, A. O., Miser, J. S., Jefferson, J., & Triche, T. J. (1987). Experimental evidence for a neural origin of Ewing's sarcoma of bone. *The American Journal of Pathology*, 127(3), 507–18. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1899764&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Chambers, I., & Tomlinson, S. R. (2009). The transcriptional foundation of pluripotency. *Development (Cambridge, England)*, 136(14), 2311–22. <http://doi.org/10.1242/dev.024398>
- Charafe-Jauffret, E., Ginestier, C., Bertucci, F., Cabaud, O., Wicinski, J., Finetti, P., ... Birnbaum, D. (2013). ALDH1-positive cancer stem cells predict engraftment of primary breast tumors and are governed by a common stem cell program. *Cancer Research*, 73(24), 7290–7300. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4704>
- Charafe-jauffret, E., Ginestier, C., F, F. I., Tarpin, C., Diebel, M., Esterni, B., ... Wicha, M. S. (2010). ALDH1-positive cancer stem cells mediate metastasis and poor clinical outcome in inflammatory breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 16(1), 45–55. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-1630.ALDH1-positive>
- Chen, X., Fang, F., Liou, Y.-C., & Ng, H.-H. (2008). Zfp143 Regulates *Nanog* Through Modulation of Oct4 Binding. *Stem Cells*, 26(11), 2759–2767. <http://doi.org/10.1634/stemcells.2008-0398>

- Chiba, T., Kita, K., Zheng, Y. W., Yokosuka, O., Saisho, H., Iwama, A., ... Taniguchi, H. (2006). Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties. *Hepatology*, *44*(1), 240–251. <http://doi.org/10.1002/hep.21227>
- Choy, S. W., & Cheng, S. H. (2012). *Hedgehog Signaling. Vitamins and Hormones* (1st ed., Vol. 88). Elsevier Inc. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-394622-5.00001-8>
- Chu, Q. S., Mahipal, A., Schuler, M., De Braud, F. G. M., Dirix, L., Rampersad, A., ... Wen, P. Y. (2014). 445Odose-Escalation Study of Sonidegib (Lde225) Plus Buparlisib (Bkm120) in Patients (Pts) With Advanced Solid Tumors. *Annals of Oncology*, *25*(suppl\_4), iv147–iv148. <http://doi.org/10.1093/annonc/mdu331.5>
- Coppé, J.-P., Patil, C. K., Rodier, F., Sun, Y., Muñoz, D. P., Goldstein, J., ... Campisi, J. (2008). Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the p53 Tumor Suppressor. *PLoS Biology*, *6*(12), e301. <http://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060301>
- Cornaz-Buros, S., Riggi, N., Devito, C., Sarre, A., Letovanec, I., Provero, P., & Stamenkovic, I. (2014). Targeting cancer stem-like cells as an approach to defeating cellular heterogeneity in Ewing sarcoma. *Cancer Research*, *74*(22), 6610–6622. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-1106>
- Crea, F., Paolicchi, E., Marquez, V. E., & Danesi, R. (2012). Polycomb genes and cancer: Time for clinical application? *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, *83*(2), 184–193. <http://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2011.10.007>
- Croall, D. E., & Ersfeld, K. (2007). The calpains: modular designs and functional diversity. *Genome Biology*, *8*(6), 218. <http://doi.org/10.1186/gb-2007-8-6-218>
- Dear, N., Matena, K., Vingron, M., & Boehm, T. (1997). A New Subfamily of Vertebrate Calpains Lacking a Calmodulin-Like Domain: Implications for Calpain Regulation and Evolution, *184*(45), 175–184.
- Dear, T. N., & Boehm, T. (1999a). Diverse mRNA expression patterns of the mouse calpain genes Capn5, Capn6 and Capn11 during development. *Mechanisms of Development*, *89*(1–2), 201–209. [http://doi.org/10.1016/S0925-4773\(99\)00214-2](http://doi.org/10.1016/S0925-4773(99)00214-2)
- Dekker, J. (2002). Capturing Chromosome Conformation. *Science*, *295*(5558), 1306–1311. <http://doi.org/10.1126/science.1067799>
- Dierks, C., Beigi, R., Guo, G. R., Zirlik, K., Stegert, M. R., Manley, P., ... Warmuth, M. (2008). Expansion of Bcr-Abl-Positive Leukemic Stem Cells Is Dependent on Hedgehog Pathway Activation. *Cancer Cell*, *14*(3), 238–249. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.08.003>
- Douville, J., Beaulieu, R., & Balicki, D. (2009). ALDH1 as a Functional Marker of Cancer Stem and Progenitor Cells. *Stem Cells and Development*, *18*(1), 17–26. <http://doi.org/10.1089/scd.2008.0055>
- Eggert, T., Wolter, K., Ji, J., Ma, C., Yevsa, T., Klotz, S., ... Greten, T. F. (2016). Distinct Functions of Senescence-Associated Immune Responses in Liver Tumor Surveillance and Tumor Progression. *Cancer Cell*, *30*(4), 533–547.

<http://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.09.003>

- Eide, C. A., & Druker, B. J. (2017). Understanding cancer from the stem cells up. *Nature Medicine*, 23(6), 656–657. <http://doi.org/10.1038/nm.4353>
- El-Hashash, A. H. K., & Warburton, D. (2012). Numb expression and asymmetric versus symmetric cell division in distal embryonic lung epithelium. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society*, 60(9), 675–82. <http://doi.org/10.1369/0022155412451582>
- Erenpreisa, J., & Cragg, M. S. (2013). Three steps to the immortality of cancer cells: senescence, polyploidy and self-renewal. *Cancer Cell International*, 13(1), 92. <http://doi.org/10.1186/1475-2867-13-92>
- Ewing James. (1921). Diffuse endothelioma of bone. *Proc New York Path*, 21, 17–24.
- Fan, X., Matsui, W., Khaki, L., Stearns, D., Chun, J., Li, Y. M., & Eberhart, C. G. (2006). Notch pathway inhibition depletes stem-like cells and blocks engraftment in embryonal brain tumors. *Cancer Research*, 66(15), 7445–7452. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0858>
- Farnie G, C. R. (2007). Mammary stem cells and breast cancer--role of Notch signalling. *Stem Cell Rev.* Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pubmed/17873349>
- Felx, M., Guyot, M.-C., Isler, M., Turcotte, R. E., Doyon, J., Khatib, A.-M., ... Moldovan, F. (2006). Endothelin-1 (ET-1) promotes MMP-2 and MMP-9 induction involving the transcription factor NF-kappaB in human osteosarcoma. *Clinical Science (London, England : 1979)*, 110(6), 645–54. <http://doi.org/10.1042/CS20050286>
- Fizazi, K., Yang, J., Peleg, S., Sikes, C. R., Kreimann, E. L., Daliani, D., ... Navone, N. M. (2003). Prostate Cancer Cells-Osteoblast Interaction Shifts Expression of Growth / Survival-related Genes in Prostate Cancer and Reduces Expression of Osteoprotegerin in Osteoblasts Prostate Cancer Cells-Osteoblast Interaction Shifts Expression of Growth / Surviv, 9(July), 2587–2597.
- Fletcher; Unni ; Mertens. (2002). World Health Organization Classification of Tumours Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone, 177(3), 1365–76. <http://doi.org/10.1016/j.suronc.2004.03.001>
- Folkerts, H., Hilgendorf, S., Wierenga, A. T. J., Jaques, J., Mulder, A. B., Coffey, P. J., ... Vellenga, E. (2017). Inhibition of autophagy as a treatment strategy for p53 wild-type acute myeloid leukemia. *Cell Death and Disease*, 8(7), e2927. <http://doi.org/10.1038/cddis.2017.317>
- Franchi A, Calzolari A, Z. G. (1998). Immunohistochemical detection of c-fos and c-jun expression in osseous and cartilaginous tumours of the skeleton. *Virchows Archiv.* Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pubmed/?term=franchi+A+c-fos+c-jun+skeleton+1998>
- Fu, T.-Y., Hsieh, I.-C., Cheng, J.-T., Tsai, M.-H., Hou, Y.-Y., Lee, J.-H., ... Ger, L.-P. (2016).

- Association of OCT4, SOX2, and NANOG expression with oral squamous cell carcinoma progression. *Journal of Oral Pathology & Medicine: Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, 45(2), 89–95. <http://doi.org/10.1111/jop.12335>
- Fujiwara, T., & Ozaki, T. (2016). Overcoming Therapeutic Resistance of Bone Sarcomas: Overview of the Molecular Mechanisms and Therapeutic Targets for Bone Sarcoma Stem Cells. *Stem Cells International*, 2016. <http://doi.org/10.1155/2016/2603092>
- García-prat, L., Martínez-vicente, M., Perdiguero, E., Ortet, L., Rodríguez-ubreva, J., & Rebollo, E. (2016). Autophagy maintains stemness by preventing senescence. *Nature*, 529(7584), 37–42. <http://doi.org/10.1038/nature16187>
- Gelderblom, H., Hogendoorn, P. C. W., Dijkstra, S. D., Van Rijswijk, C. S., Krol, A. D., Taminiau, A. H. M., & Bovée, J. V. M. G. (2016). The Clinical Approach Towards Chondrosarcoma LEARNING OBJECTIVES, (0), 320–329. <http://doi.org/10.1634/theoncologist.2007-0237>
- Gibbs, C. P., Kukekov, V. G., Reith, J. D., Tchigrinova, O., Suslov, O. N., Scott, E. W., ... Steindler, D. A. (2005a). Stem-like cells in bone sarcomas: implications for tumorigenesis. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 7(11), 967–76. <http://doi.org/10.1593/neo.05394>
- Ginestier, C., Hur, M. H., Charafe-Jauffret, E., Monville, F., Dutcher, J., Brown, M., ... Dontu, G. (2007). ALDH1 Is a Marker of Normal and Malignant Human Mammary Stem Cells and a Predictor of Poor Clinical Outcome. *Cell Stem Cell*, 1(5), 555–567. <http://doi.org/10.1016/j.stem.2007.08.014>
- Gonzalez, M. E., Moore, H. M., Li, X., Toy, K. A., Huang, W., Sabel, M. S., ... Kleer, C. G. (2014). EZH2 expands breast stem cells through activation of NOTCH1 signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(8), 3098–3103. <http://doi.org/10.1073/pnas.1308953111>
- Gras, E., Belaidi, E., Briançon-Marjollet, A., Pépin, J., Arnaud, C., & Godin-Ribuot, D. (2016). Endothelin-1 mediates intermittent hypoxia-induced inflammatory vascular remodeling through HIF-1 activation. *Journal of Applied Physiology*, 120(4), 437–443. <http://doi.org/10.1152/jappphysiol.00641.2015>
- Guijarro, M. V., Ghivizzani, S. C., & Gibbs, C. P. (2014). Animal Models in Osteosarcoma. *Frontiers in Oncology*, 4(July), 1–7. <http://doi.org/10.3389/fonc.2014.00189>
- Gustafsson, M. V., Zheng, X., Pereira, T., Gradin, K., Jin, S., Lundkvist, J., ... Bondesson, M. (2005). Hypoxia requires Notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Developmental Cell*, 9(5), 617–628. <http://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.09.010>
- Gwak, J. M., Kim, M., Kim, H. J., Jang, M. H., & Park, S. Y. (2017). Expression of embryonal stem cell transcription factors in breast cancer: Oct4 as an indicator for poor clinical outcome and tamoxifen resistance. *Oncotarget*, 8(22), 36305–36318. <http://doi.org/10.18632/oncotarget.16750>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*,

144(5), 646–674. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

- Haraguchi, N., Utsunomiya, T., Inoue, H., Tanaka, F., Mimori, K., Barnard, G. F., & Mori, M. (2006). Characterization of a side population of cancer cells from human gastrointestinal system. *Stem Cells*, 24(3), 506–513. <http://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0282>
- Hirschmann-Jax, C., Foster, A. E., Wulf, G. G., Nuchtern, J. G., Jax, T. W., Gobel, U., ... Brenner, M. K. (2004). A distinct “side population” of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(39), 14228–33. <http://doi.org/10.1073/pnas.0400067101>
- Ho, M. M., Ng, A. V., Lam, S., & Hung, J. Y. (2007). Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells. *Cancer Research*, 67(10), 4827–4833. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3557>
- Hoey, T., Yen, W. C., Axelrod, F., Basi, J., Donigian, L., & Dylla, S. (2009). DLL4 blockade inhibits tumor growth and reduces tumor-initiating cell frequency. *Cell Stem Cell*, 5. <http://doi.org/10.1016/j.stem.2009.05.019>
- Hong, J. M., Teitelbaum, S. L., Kim, T.-H., Ross, F. P., Kim, S.-Y., & Kim, H.-J. (2011). Calpain-6, a target molecule of glucocorticoids, regulates osteoclastic bone resorption via cytoskeletal organization and microtubule acetylation. *Journal of Bone and Mineral Research : The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 26(3), 657–65. <http://doi.org/10.1002/jbmr.241>
- Honoki, K., Fujii, H., Kubo, A., Kido, A., Mori, T., Tanaka, Y., & Tsujiuchi, T. (2010). Possible involvement of stem-like populations with elevated ALDH1 in sarcomas for chemotherapeutic drug resistance, 501–505. <http://doi.org/10.3892/or>
- Ida K. (1995). EWS-FLI1 and EWS-ERG chimeric mRNAs in Ewing’s sarcoma and primitive neuroectodermal tumor, 100.
- Ifergan, I., Meller, I., Issakov, J., & Assaraf, Y. G. (2003). Reduced Folate Carrier Protein Expression in Osteosarcoma: Implications for the Prediction of Tumor Chemosensitivity. *Cancer*, 98(9), 1958–1966. <http://doi.org/10.1002/cncr.11741>
- Iida, H., Suzuki, M., Goitsuka, R., & Ueno, H. (2012). Hypoxia induces CD133 expression in human lung cancer cells by up-regulation of OCT3/4 and SOX2. *International Journal of Oncology*, 40(1), 71–79. <http://doi.org/10.3892/ijo.2011.1207>
- Iriondo, O., Rábano, M., Domenici, G., Carlevaris, O., López-Ruiz, J. A., Zabalza, I., ... Vivanco, M. dM. (2015). Distinct breast cancer stem/progenitor cell populations require either HIF1 $\alpha$  or loss of PHD3 to expand under hypoxic conditions. *Oncotarget*, 6(31), 31721–39. <http://doi.org/10.18632/oncotarget.5564>
- Jamil, N., Howie, S., & Salter, D. M. (2010). Therapeutic molecular targets in human chondrosarcoma. *International Journal of Experimental Pathology*, 91(5), 387–393. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2010.00749.x>
- Kager, L., Zoubek, A., Dominkus, M., Lang, S., Bodmer, N., Jundt, G., ... Bielack, S. (2010).

- Osteosarcoma in very young children. *Cancer*, 116(22), 5316–5324. <http://doi.org/10.1002/cncr.25287>
- Kang, T.-W., Yevsa, T., Woller, N., Hoenicke, L., Wuestefeld, T., Dauch, D., ... Zender, L. (2011). Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature*, 479(7374), 547–551. <http://doi.org/10.1038/nature10599>
- Kansara, M., Teng, M. W., Smyth, M. J., & Thomas, D. M. (2014). Translational biology of osteosarcoma. *Nature Publishing Group*, 14(11), 722–735. <http://doi.org/10.1038/nrc3838>
- Kaur, J., & Debnath, J. (2015). Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(8), 461–472. <http://doi.org/10.1038/nrm4024>
- Kenific, C. M., Stehbens, S. J., Goldsmith, J., Leidal, A. M., Faure, N., Ye, J., ... Debnath, J. (2016). NBR 1 enables autophagy-dependent focal adhesion turnover. *Journal of Cell Biology*, 212(5), 577–590. <http://doi.org/10.1083/jcb.201503075>
- Knoblich, J. a. (2010). Asymmetric cell division: recent developments and their implications for tumour biology. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 11(12), 849–860. <http://doi.org/10.1038/nrm3010>
- Ko, A. H., LoConte, N., Tempero, M. A., Walker, E. J., Kate Kelley, R., Lewis, S., ... Kindler, H. L. (2015). A Phase I Study of FOLFIRINOX Plus IPI-926, a Hedgehog Pathway Inhibitor, for Advanced Pancreatic Adenocarcinoma. *Pancreas*, 0(0), 1–6. <http://doi.org/10.1097/MPA.0000000000000458>
- Kondo, T., Setoguchi, T., & Taga, T. (2004). Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(3), 781–6. <http://doi.org/10.1073/pnas.0307618100>
- Koong, A., Che, K., & Giaccia, A. (1994). Hypoxia causes the activation of nuclear factor kappa through the phosphorylation of I-kB on tyrosine residues. *Cancer Res*, (54), 1425–1430.
- Kovar, H., & Bernard Alain. (2006). CD99-Positive “Ewing’s Sarcoma” from Mouse Bone Marrow-Derived Mesenchymal Progenitor Cells? *Cancer Research*, 66(19), 9786–9787. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0205>
- Kreso, A., & Dick, J. E. (2014). Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell*, 14(3), 275–291. <http://doi.org/10.1016/j.stem.2014.02.006>
- Lacerda, L., Pusztai, L., & Woodward, W. A. (2010). The role of tumor initiating cells in drug resistance of breast cancer: Implications for future therapeutic approaches. *Drug Resistance Updates*, 13(4–5), 99–108. <http://doi.org/10.1016/j.drug.2010.08.001>
- Lamoureux, F., Moriceau, G., Picarda, G., Rousseau, J., Trichet, V., & Rédini, F. (2010). Regulation of osteoprotegerin pro- or anti-tumoral activity by bone tumor microenvironment. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1805(1), 17–24. <http://doi.org/10.1016/j.bbcan.2009.08.004>

- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., & Caceres-Cortes, J. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, *367*. <http://doi.org/10.1038/367645a0>
- Lawlor, E. R., Lim, J. F., Tao, W., Poremba, C., Chow, C. J., Kalousek, I. V., ... Sorensen, P. H. B. (1998). The Ewing tumor family of peripheral primitive neuroectodermal tumors expresses human gastrin-releasing peptide. *Cancer Research*, *58*(11), 2469–2476.
- Lee, N., Kim, D., Kim, and D., & Kim, D. (2016). Cancer Metabolism: Fueling More than Just Growth. *Molecules and Cells*, *39*(12), 847–854. <http://doi.org/10.14348/molcells.2016.0310>
- Lee, S. J., Kim, B. G., Choi, Y. La, & Lee, J. W. (2008). Increased expression of calpain 6 during the progression of uterine cervical neoplasia: Immunohistochemical analysis. *Oncology Reports*, *19*(4), 859–863.
- Lee, Y. H., Yang, H. W., Yang, L. C., Lu, M. Y., Tsai, L. L., Yang, S. F., ... Hu, F. W. (2017). DHFR and MDR1 upregulation is associated with chemoresistance in osteosarcoma stem-like cells. *Oncology Letters*, *14*(1), 171–179. <http://doi.org/10.3892/ol.2017.6132>
- Letouzé, E., Martinelli, C., Loriot, C., Burnichon, N., Abermil, N., Ottolenghi, C., ... Favier, J. (2013). SDH Mutations Establish a Hypermethylator Phenotype in Paraganglioma. *Cancer Cell*, *23*(6), 739–752. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.04.018>
- Letson, G. D., & Muro-Cacho, C. A. (2001). Genetic and molecular abnormalities in tumors of the bone and soft tissues. *Cancer Control*, *8*(3), 239–251.
- Li, E. (2002). Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nature Reviews Genetics*, *3*(9), 662–673. <http://doi.org/10.1038/nrg887>
- Liang, J., Wan, M., Zhang, Y., Gu, P., Xin, H., Jung, S. Y., ... Songyang, Z. (2008). Nanog and Oct4 associate with unique transcriptional repression complexes in embryonic stem cells. *Nature Cell Biology*, *10*(6), 731–739. <http://doi.org/10.1038/ncb1736>
- Liao, F., Xu, H., Torrey, N., Road, P., & Jolla, L. (2015). Navigating the bone marrow niche: translational insights and cancer-driven dysfunction. *Nature Reviews Rheumatol*, *2*(74), 154–168. <http://doi.org/10.1126/scisignal.274pe36>
- Limin, R. K. R., & Dennis, Z. (2015). Bone Sarcomas in Pediatrics: Progress in Our Understanding of Tumor Biology and Implications for Therapy. *Pediatric Drugs*, *17*(4), 257–271. <http://doi.org/10.1007/s40272-015-0134-4>
- Lin, P. P., Pandey, M. K., Jin, F., Raymond, A. K., Akiyama, H., & Lozano, G. (2009). Targeted mutation of p53 and Rb in mesenchymal cells of the limb bud produces sarcomas in mice. *Carcinogenesis*, *30*(10), 1789–1795. <http://doi.org/10.1093/carcin/bgp180>
- Liu, Y., Mei, C., Sun, L., Li, X., Liu, M., Wang, L., ... Zha, X. (2011). The PI3K-Akt pathway regulates calpain 6 expression, proliferation, and apoptosis. *Cellular Signalling*, *23*(5), 827–836. <http://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.01.005>

- Liu, Y., Wang, Y., Sun, X., Mei, C., Wang, L., Li, Z., & Zha, X. (2015). miR-449a promotes liver cancer cell apoptosis by down regulation of Calpain 6 and POU2F1, 7(12), 13491–13501.
- Lu, R., Wang, P., Parton, T., Zhou, Y., Chrysovergis, K., Rockowitz, S., ... Wang, G. G. (2016). Epigenetic Perturbations by Arg882-Mutated DNMT3A Potentiate Aberrant Stem Cell Gene-Expression Program and Acute Leukemia Development. *Cancer Cell*, 30(1), 92–107. <http://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.05.008>
- Ludovic Leloup and Alan Wells. (2010). Calpains as potential anti-cancer targets. *Expert Opin Ther Targets*, 119(Pt 24), 5124–5136. <http://doi.org/10.1242/jcs.03292>.Multiple
- Marcato, P., Dean, C. A., Giacomantonio, C. A., & Lee, P. W. K. (2011). Aldehyde dehydrogenase its role as a cancer stem cell marker comes down to the specific isoform. *Cell Cycle*, 10(9), 1378–1384. <http://doi.org/10.4161/cc.10.9.15486>
- Marion, A., Dieudonné, F. X., Patiño-Garcia, A., Lecanda, F., Marie, P. J., & Modrowski, D. (2012). Calpain-6 is an endothelin-1 signaling dependent protective factor in chemoresistant osteosarcoma. *International Journal of Cancer*, 130(11), 2514–2525. <http://doi.org/10.1002/ijc.26246>
- Markiewicz K, Zeman K, Kozar A, G.-W. M. (2011). Evaluation of selected cytokines in children and adolescents with osteosarcoma at diagnosis - preliminary report. *Med Wieku Rozwoj*. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pubmed/?term=markiewicz+2011+cytokines+in+children+osteosarcoma>
- Martins-Neves, S. R., Lopes, Á. O., do Carmo, A., Paiva, A. A., Simões, P. C., Abrunhosa, A. J., & Gomes, C. M. (2012). Therapeutic implications of an enriched cancer stem-like cell population in a human osteosarcoma cell line. *BMC Cancer*, 12(1), 139. <http://doi.org/10.1186/1471-2407-12-139>
- Mathieu, J., Zhang, Z., Zhou, W., Wang, A. J., Heddleston, J. M., Pinna, C. M. A., ... Ruohola-Baker, H. (2011). HIF induces human embryonic stem cell markers in cancer cells. *Cancer Research*, 71(13), 4640–52. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3320>
- Mayle, A., Yang, L., Rodriguez, B., Zhou, T., Chang, E., Curry, C. V., ... Goodell, M. A. (2015). Dnmt3a loss predisposes murine hematopoietic stem cells to malignant transformation, 125(4), 629–639. <http://doi.org/10.1182/blood-2014-08-594648>.A.M.
- McConnell, B. B., & Yang, V. W. (2010). *Mammalian Krueppel-Like Factors in Health and Diseases*. *Physiological Reviews* (Vol. 90). <http://doi.org/10.1152/physrev.00058.2009>.Mammalian
- Mehlen, P., & Puisieux, A. (2006). Metastasis: a question of life or death. *Nature Reviews Cancer*, 6(6), 449–458. <http://doi.org/10.1038/nrc1886>
- Merchant, A. (2010). Targeting Hedgehog - a Cancer Stem Cell Pathway. *Clin Cancer Res*, 86(12), 3279–3288. <http://doi.org/10.1007/s11103-011-9767-z>.Plastid

- Miller, B. J., Gao, Y., & Duchman, K. R. (2017). Does surgery or radiation provide the best overall survival in Ewing's sarcoma? A review of the National Cancer Data Base. *Journal of Surgical Oncology*, *116*(3), 384–390. <http://doi.org/10.1002/jso.24652>
- Mitsutake, N., Iwao, A., Nagai, K., Namba, H., Ohtsuru, A., Saenko, V., & Yamashita, S. (2007). Characterization of side population in thyroid cancer cell lines: Cancer stem-like cells are enriched partly but not exclusively. *Endocrinology*, *148*(4), 1797–1803. <http://doi.org/10.1210/en.2006-1553>
- Miyazaki, T., Tonami, K., Hata, S., Aiuchi, T., Ohnishi, K., Lei, X., ... Miyazaki, A. (2016). Calpain-6 confers atherogenicity to macrophages by dysregulating pre-mRNA splicing. *Journal of Lipid Research*, *57*(12), 3417–3432. <http://doi.org/10.1177/JCI85880>
- Miyazawa, K., Tanaka, T., Nakai, D., Morita, N., & Suzuki, K. (2014). Immunohistochemical expression of four different stem cell markers in prostate cancer: High expression of NANOG in conjunction with hypoxia-inducible factor-1?? expression is involved in prostate epithelial malignancy. *Oncology Letters*, *8*(3), 985–992. <http://doi.org/10.3892/ol.2014.2274>
- Moitra, K., Lou, H., & Dean, M. (2011). Multidrug Efflux Pumps and Cancer Stem Cells: Insights Into Multidrug Resistance and Therapeutic Development. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, *89*(4), 491–502. <http://doi.org/10.1038/clpt.2011.14>
- Moore, J. B., Loeb, D. M., Hong, K. U., Sorensen, P. H., Triche, T. J., Lee, D. W., ... Arceci, R. J. (2015). Epigenetic reprogramming and re-differentiation of a Ewing sarcoma cell line. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *3*(March), 15. <http://doi.org/10.3389/fcell.2015.00015>
- Muñoz-Espín, D., & Serrano, M. (2014). Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *15*(7), 482–496. <http://doi.org/10.1038/nrm3823>
- Murar, M., & Vaidya, A. (2015). Cancer stem cell markers: premises and prospects. *Biomarkers in Medicine*, *9*(12), 1331–42. <http://doi.org/10.2217/bmm.15.85>
- Mutsaers, A. J., & Walkley, C. R. (2014). Cells of origin in osteosarcoma: Mesenchymal stem cells or osteoblast committed cells? *Bone*, *62*, 56–63. <http://doi.org/10.1016/j.bone.2014.02.003>
- Namløs, H. M., Kresse, S. H., Müller, C. R., Henriksen, J., Holdhus, R., Sæter, G., ... Myklebost, O. (2012). Global gene expression profiling of human osteosarcomas reveals metastasis-associated chemokine pattern. *Sarcoma*, *2012*. <http://doi.org/10.1155/2012/639038>
- Neumeister, V., & Rimm, D. (2010). Is ALDH1 a good method for definition of breast cancer stem cells? *Breast Cancer Research and Treatment*, *123*(1), 109–111. <http://doi.org/10.1007/s10549-009-0656-y>
- O'Brien, C. A., Pollett, A., Gallinger, S., & Dick, J. E. (2007). A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*, *445*(7123), 106–110. <http://doi.org/10.1038/nature05372>

- Olive, K. P., Jacobetz, M. a, Davidson, C. J., McIntyre, D., Honess, D., Madhu, B., ... Iacobuzio-donahue, C. (2010). Chemotherapy in a Mouse Model of Pancreatic Cancer. *Cancer Research*, 324(5933), 1457–1461. <http://doi.org/10.1126/science.1171362>. Inhibition
- Onda, M., Matsuda, S., Higaki, S., Iijima, T., Fukushima, J. I., Yokokura, A., ... Yamamoto, T. (1996). ErbB-2 expression is correlated with poor prognosis for patients with osteosarcoma. *Cancer*, 77(1), 71–78. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0142\(19960101\)77:1<71::AID-CNCR13>3.0.CO;2-5](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0142(19960101)77:1<71::AID-CNCR13>3.0.CO;2-5)
- Pagotto, A., Pilotto, G., Mazzoldi, E. L., Nicoletto, M. O., Frezzini, S., Pastò, A., & Amadori, A. (2017). Autophagy inhibition reduces chemoresistance and tumorigenic potential of human ovarian cancer stem cells. *Cell Death and Disease*, 8(7), e2943. <http://doi.org/10.1038/cddis.2017.327>
- Pattabiraman, D. R., & Weinberg, R. A. (2014). Tackling the cancer stem cells — what challenges do they pose? *Nature Reviews Drug Discovery*, 13(7), 497–512. <http://doi.org/10.1038/nrd4253>
- Piperno-Neumann, S., Le Deley, M. C., Rédini, F., Pacquement, H., Marec-Bérard, P., Petit, P., ... Brugières, L. (2016). Zoledronate in combination with chemotherapy and surgery to treat osteosarcoma (OS2006): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, 17(8), 1070–1080. [http://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30096-1](http://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30096-1)
- Poulson, D. F. (1937). Chromosomal Deficiencies and the Embryonic Development of *Drosophila Melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 23(3), 133–137. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1076884/>
- Prasad, P., Mittal, S. A., Chongtham, J., Mohanty, S., & Srivastava, T. (2017). Hypoxia-Mediated Epigenetic Regulation of Stemness in Brain Tumor Cells. *Stem Cells*, 35(6), 1468–1478. <http://doi.org/10.1002/stem.2621>
- Prime, S. S., Cirillo, N., Hassona, Y., Lambert, D. W., Paterson, I. C., Mellone, M., ... Parkinson, E. K. (2016). Fibroblast activation and senescence in oral cancer. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. <http://doi.org/10.1111/jop.12456>
- Rajaraman, R., Rajaraman, M. M., & Rajaraman, S. R. (2005). Neosis e a paradigm of self-renewal in cancer, 29, 1084–1097. <http://doi.org/10.1016/j.cellbi.2005.10.003>
- Resetskova, E., Reis-Filho, J. S., Jain, R. K., Mehta, R., Thorat, M. A., Nakshatri, H., & Badve, S. (2010). Prognostic impact of ALDH1 in breast cancer: A story of stem cells and tumor microenvironment. *Breast Cancer Research and Treatment*, 123(1), 97–108. <http://doi.org/10.1007/s10549-009-0619-3>
- Rho, S. B., Byun, H. J., Park, S. Y., & Chun, T. (2008). Calpain 6 supports tumorigenesis by inhibiting apoptosis and facilitating angiogenesis. *Cancer Letters*, 271(2), 306–313. <http://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.06.020>

- Ricci-Vitiani, L., Lombardi, D. G., Pilozzi, E., Biffoni, M., Todaro, M., & Peschle, C. (2007). Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*, *445*. <http://doi.org/10.1038/nature05384>
- Riggi, N., Cironi, L., Provero, P., Suva, M.-L., Kaloulis, K., Garcia-Echeverria, C., ... Stamenkovic, I. (2005). Development of Ewing's Sarcoma from Primary Bone Marrow-Derived Mesenchymal Progenitor Cells. *Cancer Res*, *65*(24), 11459–11468. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1696>
- Riggi, N., & Stamenkovic, I. (2007). The Biology of Ewing sarcoma. *Cancer Letters*, *254*(1), 1–10. <http://doi.org/10.1016/j.canlet.2006.12.009>
- Riggi, N., Suvà, M. L., Suvà, D., Cironi, L., Provero, P., Tercier, S., ... Stamenkovic, I. (2008). EWS-FLI-1 expression triggers a ewing's sarcoma initiation program in primary human mesenchymal stem cells. *Cancer Research*, *68*(7), 2176–2185. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1761>
- Riggs, A., & Porter, T. (1996). *Overview of epigenetic mechanisms. In Epigenetic mechanisms of gene regulation* (ed. Russo). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Rubio, R., Gutierrez-Aranda, I., Sáez-Castillo, A. I., Labarga, A., Rosu-Myles, M., Gonzalez-Garcia, S., ... Rodriguez, R. (2013). The differentiation stage of p53-Rb-deficient bone marrow mesenchymal stem cells imposes the phenotype of in vivo sarcoma development. *Oncogene*, *32*(41), 4970–4980. <http://doi.org/10.1038/onc.2012.507>
- Salas, S., Jiguet-Jiglaire, C., Campion, L., Bartoli, C., Frassinetti, F., Deville, J.-L., ... Bouvier, C. (2014). Correlation between ERK1 and STAT3 expression and chemoresistance in patients with conventional osteosarcoma. *BMC Cancer*, *14*, 606. <http://doi.org/10.1186/1471-2407-14-606>
- Samuel, A. M., Costa, J., & Lindskog, D. M. (2014). Genetic alterations in chondrosarcomas - Keys to targeted therapies? *Cellular Oncology*, *37*(2), 95–105. <http://doi.org/10.1007/s13402-014-0166-8>
- Scheiff, R. (1992). DNA looping. *Annu Rev Biochem*, *61*, 199–223. <http://doi.org/10.1146/annurev.bi.61.070192.001215>
- Schinkel, A. H., Smit, J. J. M., van Tellingen, O., Beijnen, J. H., Wagenaar, E., van Deemter, L., ... Borst, P. (1994). Disruption of the mouse mdr1a P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell*, *77*(4), 491–502. [http://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90212-7](http://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90212-7)
- Schuetz, A. N., Rubin, B. P., Goldblum, J. R., Shehata, B., Weiss, S. W., Liu, W., ... Folpe, A. L. (2005). Intercellular junctions in Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumor: additional evidence of epithelial differentiation. *Modern Pathology : An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, *18*(11), 1403–10. <http://doi.org/10.1038/modpathol.3800435>

- Schulenburg, A., Br??mswig, K., Herrmann, H., Karlic, H., Mirkina, I., Hubmann, R., ... Valent, P. (2010). Neoplastic stem cells: Current concepts and clinical perspectives. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 76(2), 79–98. <http://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2010.01.001>
- Sheffield, N. C., Pierron, G., Klughammer, J., Datlinger, P., Sch?negger, A., Schuster, M., ... Tomazou, E. M. (2017). DNA methylation heterogeneity defines a disease spectrum in Ewing sarcoma. *Nature Medicine*, 23(3), 386–395. <http://doi.org/10.1038/nm.4273>
- Shen, J. K., Cote, G. M., Choy, E., Yang, P., Harmon, D., Nielsen, G. P., ... Duan, Z. (2015). NIH Public Access, 2(7), 690–698. <http://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-13-0224>. Programmed
- Skubitz, K. M., & Skubitz, A. P. N. (2003). Differential gene expression in leiomyosarcoma. *Cancer*, 98(5), 1029–1038. <http://doi.org/10.1002/cncr.11586>
- Soeda, A., Park, M., Lee, D., Mintz, A., Androutsellis-Theotokis, A., McKay, R. D., ... Park, D. M. (2009). Hypoxia promotes expansion of the CD133-positive glioma stem cells through activation of HIF-1alpha. *Oncogene*, 28(45), 3949–3959. <http://doi.org/10.1038/onc.2009.252>
- Stergachis, A. B., Neph, S., Reynolds, A., Humbert, R., Miller, B., Paige, S. L., ... Stamatoyannopoulos, J. A. (2013). Developmental fate and cellular maturity encoded in human regulatory DNA landscapes. *Cell*, 154(4), 888–903. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.020>
- Storr, S. J., Carragher, N. O., Frame, M. C., Parr, T., & Martin, S. G. (2011). The calpain system and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 11(5), 364–374. <http://doi.org/10.1038/nrc3050>
- Suvà, M. L., Riggi, N., Janiszewska, M., Radovanovic, I., Provero, P., Stehle, J. C., ... Stamenkovic, I. (2009). EZH2 is essential for glioblastoma cancer stem cell maintenance. *Cancer Research*, 69(24), 9211–9218. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1622>
- Suva, M. L., Riggi, N., Stehle, J. C., Baumer, K., Tercier, S., Joseph, J. M., ... Stamenkovic, I. (2009). Identification of cancer stem cells in Ewing's sarcoma. *Cancer Res*, 69(5), 1776–1781. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2242>
- Szotek, P. P., Pieretti-Vanmarcke, R., Masiakos, P. T., Dinulescu, D. M., Connolly, D., Foster, R., ... Donahoe, P. K. (2006). Ovarian cancer side population defines cells with stem cell-like characteristics and Mullerian Inhibiting Substance responsiveness. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(30), 11154–11159. <http://doi.org/10.1073/pnas.0603672103>
- Szutorisz, H., Canzonetta, C., Georgiou, A., Chow, C.-M., Tora, L., & Dillon, N. (2005). Formation of an Active Tissue-Specific Chromatin Domain Initiated by Epigenetic Marking at the Embryonic Stem Cell Stage. *Molecular and Cellular Biology*, 25(5), 1804–1820. <http://doi.org/10.1128/MCB.25.5.1804-1820.2005>

- Takebe, N., Harris, P. J., Warren, R. Q., & Ivy, S. P. (2011). Targeting cancer stem cells by inhibiting Wnt, Notch, and Hedgehog pathways. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 8(2), 97–106. <http://doi.org/10.1038/nrclinonc.2010.196>
- Tan, J., Yan, Y., Wang, X., Jiang, Y., & Xu, H. E. (2014). EZH2: biology, disease, and structure-based drug discovery. *Acta Pharmacologica Sinica*, 35(2), 161–174. <http://doi.org/10.1038/aps.2013.161>
- Tannishtha, R., Morrison, S. J., Clarke, M. F., & Weissman, I. L. (2001). Stem Cells, Cancer, and Cancer Stem Cells. *Nature*, 414(November), 105–111. <http://doi.org/10.1007/978-1-60327-933-8>
- Tao, H., Li, H., Su, Y., Feng, D., Wang, X., Zhang, C., ... Hu, Q. (2014). Histone methyltransferase G9a and H3K9 dimethylation inhibit the self-renewal of glioma cancer stem cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 394(1), 23–30. <http://doi.org/10.1007/s11010-014-2077-4>
- Taran, S., Taran, R., & Malipatil, N. (2017). Pediatric osteosarcoma: An updated review. *Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology*. <http://doi.org/10.4103/0971-5851.203513>
- Tirino, V., Desiderio, V., D'Aquino, R., De Francesco, F., Pirozzi, G., Graziano, A., ... Giordano, A. (2008). Detection and characterization of CD133+ cancer stem cells in human solid tumours. *PLoS One*, 3(10), e3469. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0003469>
- Tirino, V., Desiderio, V., Paino, F., De Rosa, A., Papaccio, F., Fazioli, F., ... Papaccio, G. (2011). Human primary bone sarcomas contain CD133+ cancer stem cells displaying high tumorigenicity in vivo. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 25(6), 2022–2030. <http://doi.org/10.1096/fj.10-179036>
- Tirode, F., Laud-Duval, K., Prieur, A., Delorme, B., Charbord, P., & Delattre, O. (2007). Mesenchymal Stem Cell Features of Ewing Tumors. *Cancer Cell*, 11(5), 421–429. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.02.027>
- Tonami, K., Hata, S., Ojima, K., Ono, Y., Kurihara, Y., Amano, T., ... Sorimachi, H. (2013b). Calpain-6 Deficiency Promotes Skeletal Muscle Development and Regeneration. *PLoS Genetics*, 9(8), 1–11. <http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003668>
- Tonami, K., Kurihara, Y., Aburatani, H., Uchijima, Y., Asano, T., & Kurihara, H. (2007). Calpain 6 is involved in microtubule stabilization and cytoskeletal organization. *Molecular and Cellular Biology*, 27(7), 2548–61. <http://doi.org/10.1128/MCB.00992-06>
- Tonami, K., Kurihara, Y., Arima, S., Nishiyama, K., Uchijima, Y., Asano, T., ... Ge, R. (2011). Cancer stem cells in osteosarcoma: Recent progress and perspective. *Cancer Research*, 71(1), 1311–1328. <http://doi.org/10.1038/ng.127>

- Tonami, K., Kurihara, Y., Arima, S., Nishiyama, K., Uchijima, Y., Asano, T., ... Kurihara, H. (2011). Calpain-6, a microtubule-stabilizing protein, regulates Rac1 activity and cell motility through interaction with GEF-H1. *Journal of Cell Science*, 124(Pt 8), 1214–1223. <http://doi.org/10.1242/jcs.072561>
- Valent, P., Bonnet, D., Maria, R. De, Lapidot, T., Schuringa, J. J., Stassi, G., ... Johnsen, H. E. (2012). terminology : the devil is in the details. *Nature Publishing Group*, 12(11), 767–775. <http://doi.org/10.1038/nrc3368>
- Virmani AK, Rathi A, Sathyanarayana UG, Padar A, Huang CX, Cunningham HT, Farinas AJ, Milchgrub S, Euhus DM, Gilcrease M, Herman J, Minna JD, G. A. (2001). Aberrant methylation of the adenomatous polyposis coli (APC) gene promoter 1A in breast and lung carcinomas. *Clin Cancer Res*, 7(7), 1998–2004.
- Wang, J., Guo, L.-P., Chen, L.-Z., Zeng, Y.-X., & Lu, S. H. (2007). Identification of Cancer Stem Cell-Like Side Population Cells in Human Nasopharyngeal Carcinoma Cell Line. *Cancer Research*, 67(8), 3716–3724. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4343>
- Wang, X., Zheng, B., Zhang, R. R., Li, S., Mulvihill, J. J., Lu, X., ... Liu, H. (2011). Notch Promotes Radioresistance of Glioma Stem Cells Jialiang. *Cancer Research*, 9(3), 231–242. <http://doi.org/10.1002/stem.261>
- Warburg Otto. (1925). The metabolism of carcinoma cells. *J Cancer Res*, 9, 148–163.
- Ward, P. S., Patel, J., Wise, D. R., Abdel-Wahab, O., Bennett, B. D., Collier, H. A., ... Thompson, C. B. (2010). The Common Feature of Leukemia-Associated IDH1 and IDH2 Mutations Is a Neomorphic Enzyme Activity Converting ??-Ketoglutarate to 2-Hydroxyglutarate. *Cancer Cell*, 17(3), 225–234. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.01.020>
- Weber, M., Hellmann, I., Stadler, M. B., Ramos, L., Pääbo, S., Rebhan, M., & Schübeler, D. (2007). Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nature Genetics*, 39(4), 457–466. <http://doi.org/10.1038/ng1990>
- Wong, S. H. K., Goode, D. L., Iwasaki, M., Wei, M. C., Kuo, H. P., Zhu, L., ... Cleary, M. L. (2015). The H3K4-Methyl Epigenome Regulates Leukemia Stem Cell Oncogenic Potential. *Cancer Cell*, 28(2), 198–209. <http://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.06.003>
- Wong, T. L., Che, N., & Ma, S. (2017). Reprogramming of central carbon metabolism in cancer stem cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1863(7), 1728–1738. <http://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.05.012>
- Wu, C., Wei, Q., Utomo, V., Nadesan, P., Whetstone, H., Kandel, R., ... Alman, B. A. (2007). Side population cells isolated from mesenchymal neoplasms have tumor initiating potential. *Cancer Research*, 67(17), 8216–8222. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0999>
- Xiang, Y., Li, F., Wang, L., Zheng, A., Zuo, J., Li, M., ... Tao, Z. (2017). Decreased calpain 6 expression is associated with tumorigenesis and poor prognosis in HNSCC. *Oncology Letters*, 13(4), 2237–2243. <http://doi.org/10.3892/ol.2017.5687>

- Xu, W., Yang, H., Liu, Y., Yang, Y., Wang, P., Kim, S. H., ... Xiong, Y. (2011). Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of  $\alpha$ -ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer Cell*, *19*(1), 17–30. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.12.014>
- Xu, X. D., Shao, S. X., Jiang, H. P., Cao, Y. W., Wang, Y. H., Yang, X. C., ... Niu, H. T. (2015). Warburg effect or reverse warburg effect? a review of cancer metabolism. *Oncology Research and Treatment*, *38*(3), 117–122. <http://doi.org/10.1159/000375435>
- Yang, M., Yan, M., Zhang, R., Li, J., & Luo, Z. (2011b). Side population cells isolated from human osteosarcoma are enriched with tumor-initiating cells. *Cancer Science*, *102*(10), 1774–1781. <http://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2011.02028.x>
- Yang, M., Zhang, R., Yan, M., Ye, Z., Liang, W., & Luo, Z. (2010). Detection and characterization of side population in Ewing's sarcoma SK-ES-1 cells in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *391*(1), 1062–1066. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.12.020>
- Yang, Y., Yu, L., Li, J., Yuan, Y. H., Wang, X. L., Yan, S. R., ... Ding, Y. (2017). Autophagy regulates the stemness of cervical cancer stem cells. *Biologics: Targets and Therapy*, *11*, 71–79. <http://doi.org/10.2147/BTT.S134920>
- Zaidi, S. K., Fietze, S. E., Gordon, J. A., Heath, J. L., Messier, T., Hong, D., ... Stein, G. S. (2017). Bivalent Epigenetic Control of Oncofetal Gene Expression in Cancer. *Molecular and Cellular Biology*, (September), MCB.00352-17. <http://doi.org/10.1128/MCB.00352-17>
- Zhang, H., Wu, H., Zheng, J., Yu, P., Xu, L., Jiang, P., ... Zhang, Y. (2013). Transforming growth factor  $\beta$ 1 signal is crucial for dedifferentiation of cancer cells to cancer stem cells in osteosarcoma. *Stem Cells*, *31*(3), 433–446. <http://doi.org/10.1002/stem.1298>
- Zhu, T. S., Costello, M. A., Talsma, C. E., Flack, C. G., Jessica, G., Hamm, L. L., ... Fan, X. (2012). NIH Public Access, *71*(18), 6061–6072. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-4269>. Endothelial
- Zou, Y., Huang, Y., Yang, J., Wu, J., & Luo, C. (2017). miR-34a is downregulated in human osteosarcoma stem-like cells and promotes invasion, tumorigenic ability and self-renewal capacity. *Molecular Medicine Reports*, *15*(4), 1631–1637. <http://doi.org/10.3892/mmr.2017.6187>

## ANNEXE 1

### Liste des présentations des travaux de recherche

**Février 2015** : Présentation orale (10 min)

Congrès des Journées Françaises des Tissus Minéralisés (JFBTM), Super Besse, France  
" Calpain-6 expression identifies a stem cell population in osteosarcoma"

**Avril 2015** : Présentation Orale (3min) et poster

European Calcified Tissue Society (ECTS) et Cancer and Bone Society, Rotterdam, Pays-Bas  
"Calpain-6 expression identifies a stem cell population in osteosarcoma"  
Prix reçu: New investigator award

**Juillet 2016**: Présentation Orale (10 min)

PhD training course de l'European Calcified Tissue Society (ECTS), Oxford, Royaume-Unis  
"Calpain-6 acts as a cell fate determinant and identifies osteosarcoma stem cells"

**Octobre 2016** : Présentation Orale (15 min)

Journées BIOSARC (Groupe Sarcome Français), Strasbourg, France  
"La calpaïne-6 identifie des cellules souche des ostéosarcomes"

**Avril 2017** : Ma thèse en 180s

Journées Paris Diderot- Paris 7, Paris France  
"Calpaïne-6 : Biomarqueur des cellules souche des ostéosarcomes. Régulateur du destin cellulaire "

## ANNEXE 2

### Soumission de l'article au journal Cell Stem Cell

#### Réponse des éditeurs

Nov 01, 2017

RE: CELL-STEM-CELL-D-17-00677

"Calpain-6 controls the fate of sarcoma stem cells by promoting autophagy and preventing senescence"

Dear Dr. Modrowski,

Thank you for submitting your paper to Cell Stem Cell. I have carefully read it, assessed the related literature, and discussed it within the editorial team. We recognize that your paper reports that calpain-6 expressing cells have a tumorigenic capacity and may exist at the top of a sarcoma cell hierarchy. We also see that your study reports that knockdown of calpain-6 increases senescence phenotypes and that calpain-6 is involved in hypoxia dependent autophagy. We appreciate that study of cancer stem cell populations may offer potential avenues for targeting and therapy in difficult to eradicate cancers, particularly solid tumors.

From an editorial perspective, however, we are concerned whether the paper would be a strong candidate at Cell Stem Cell. Based on our experience with broadly related papers, it seems likely to us that reviewers would look for the use of primary patient samples and/or strong genetic models to support your conclusions that calpain-6 mediates cancer stem cell activity, and that without this level of data, the overall physiological relevance of these findings is somewhat unclear. The burden of proof for introducing a cancer stem cell population and a potential hierarchy in sarcoma is high, and it seems likely to us that reviewers would be looking for serial transplantations and substantially stronger characterization of stemness. Based on these considerations, we unfortunately need to let you know that we do not view the paper as a strong candidate for Cell Stem Cell, and would instead like to suggest that you target the paper to another journal.

I am sorry to be sending you disappointing news on this occasion. I appreciate that you and your colleagues invested a significant amount of time and effort into this study and were no doubt hoping for a more positive outcome. Our overall goal in making this decision is to help you publish your work in as timely a way as possible. From our careful consideration of this study, it seems to us that it is not a sufficiently strong candidate for publication in Cell Stem Cell to make in-depth review a productive route to take, and it therefore seems best to us to save time for both you and potential reviewers by communicating about that at this stage.

We very much appreciate your interest in publishing with Cell Stem Cell and your decision to submit your paper to us. I hope you will choose to do so again in the future with your next exciting project, and would look forward to working with you at that time. In the interim, I also hope that you are soon able to find a good home for this current paper.

Yours sincerely,

Anh

Anh Nguyen, Ph.D. Scientific Editor, Cell Stem Cell

### **Rebuttal letter**

Dear Dr. Nguyen

Thank you for the constructive comments about our manuscript entitled "Calpain-6 controls the fate of sarcoma stem cells by promoting autophagy and preventing senescence" by Marion et al. We appreciate that you are convinced that we provided evidence that calpain-6 expression confers specific tumorigenic capacities to sarcoma cells and that calpain-6 knockdown blocks autophagy and induces senescence. However, we acknowledge that you have concerns about the overall physiological relevance of our data.

We would like to stress that we used mouse and human cell lines with different cellular origin and genetic alterations. We also used syngeneic and immunodeficient mouse models to support our conclusion that calpain-6 mediates cancer stem cell-like activity. Nevertheless, there is a lack of strong genetic model that properly mimic sarcoma development. This actually penalizes the visibility of the researches on these rare tumors.

But cell grafts are good alternatives to reveal cell intrinsic mechanisms. Indeed, modifying the whole genotype of the mice would not allow for discrimination of the effect on cancer cells from the possible one on cell microenvironment.

To our point of view, we provided the best argument to characterize stemness of cancer cells showing that calpain-6 expression depends on the master transcription factors which control multipotency and renewal of embryonic stem cells and reporting that calpain-6 expressing cells are at the top of cellular hierarchy, able to reconstitute tumor heterogeneity, highly tumorigenic and involved in metastases progression. However, we agree that evidence obtained from primary patient samples and especially in patient-derived tumor transplantations would be even stronger.

We would like to address the questions about the relevance and provide a better proof-of-concept. Therefore, we are currently collecting paraffin-embedded sections of sarcoma tissues that have served for xenograft attempts in mouse. We aim to determine whether calpain-6 expression within primary patient samples may correlate with growth and transplantation capacities in mice. Based on previous findings showing that relapses of primary osteosarcoma strongly expressed calpain-6 as compared to primary tumors (Marion et al., *Int J cancer*, 2012), we will also study whether patient-derived tumors in mouse are enriched in calpain-6 expressing cells. Despite of the resource scarcity we believe that this could be performed within a couple of months. If we successfully enrich our study with such data, we hope that the manuscript will be sufficiently strengthened and we would be grateful if you could consider it again for review in your journal?

Yours sincerely

**Titre :** La calpaïne-6 identifie et maintient la population de cellules souche des sarcomes osseux en contrôlant les processus d'autophagie et de sénescence.

**Résumé :** Les cellules souche cancéreuses contribuent au développement des sarcomes, mais le manque de marqueurs spécifiques empêche leur caractérisation et la possibilité de cibler ce type de cellules. Nous avons utilisé la séquence régulatrice de la calpaïne-6 dans des systèmes rapporteurs pour identifier les cellules exprimant la calpaïne-6. Ces cellules étaient des cellules initiatrices de tumeurs et se comportaient comme des cellules souche, au sommet de la hiérarchie cellulaire. L'expression de la calpaïne-6 dépend d'un programme génique de cellules souche qui implique Oct4, Nanog et Sox2 et est activée par l'hypoxie. L'inhibition de la calpaïne-6 a bloqué le développement tumoral et a induit la diminution du nombre de cellules souche cancéreuses dans les sarcomes osseux. L'expression de la calpaïne-6 était inversement corrélée à l'expression de marqueurs de sénescence mais était associé à un flux autophagique dynamique. L'inhibition de la calpaïne-6 a induit l'entrée des cellules en sénescence et a supprimé le flux autophagique. Nos résultats révèlent que la calpaïne-6 identifie les cellules souche des sarcomes et joue un rôle important dans le maintien des cellules souche cancéreuses en contrôlant les processus d'autophagie et de sénescence. La calpaïne-6 semble être une cible thérapeutique prometteuse pour éradiquer les cellules souche dans les sarcomes.

**Mots Clefs :** Calpaïne-6, Sarcomes osseux, Cellules souche cancéreuses, autophagie, sénescence

---

**Title:** Calpain-6 controls the fate of sarcoma stem cells by promoting autophagy and preventing senescence.

**Abstract:** Cancer stem cells contribute to sarcoma development, but lack of specific markers prevents their characterization and the possibility of targeting. We used the regulatory sequence of calpain-6 in reporter constructions to identify calpain-6-expressing cells. These cells were tumor-initiating cells and behaved like stem cells at the apex of the cellular hierarchy. Calpain-6 expression depended on the stem-cell transcription network that involves Oct4, Nanog, and Sox2 and was activated by hypoxia. Calpain-6 knockdown blocked tumor development and induced depletion of sarcoma stem cells. Calpain-6 was inversely associated with expression of senescence markers but was associated with a dynamic autophagy flux. Calpain-6 knockdown induced cell entry into senescence and suppressed autophagy flux. Our results reveal that calpain-6 identifies sarcoma stem-cell and plays an important role as a regulator of cancer cell fate driving a switch between autophagy and senescence. Calpain-6 may be a promising therapeutic target to eradicate sarcoma stem cells.

**Keywords:** Calpain-6, Bone sarcoma, Cancer stem cells, autophagy, senescence