

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE MEDECINE

Rôle de l'Oncostatine M sur les mélanomes métastatiques et étude des mécanismes de résistance à cette cytokine

THESE DE DOCTORAT

Ecole doctorale : CHIMIE BIOLOGIE
Biologie-Médecine-santé
Cancérologie, Génétique, Hématologie, Immunologie

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Aline Lacreusette

Le 3 Mars 2008, devant le jury ci-dessous

Présidente

Mme Dréno Brigitte

Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Nantes

Rapporteurs

Mr Gascan Hugues

Directeur de Recherche, INSERM U564, Angers

Mr Chouaib Salem

Directeur de Recherche, INSERM U753, Villejuif

Examineur

Mr Lecron Jean-Claude

**Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier,
Poitiers**

Directeurs de thèse

Mme Godard Anne

Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier, Nantes

Mr Blanchard Frédéric

Chargé de Recherche, INSERM-ERI7, Nantes

Table des Matières

Liste des abréviations	6
Introduction	9
I. Le mélanome	10
A. Incidence, classification et étiologie du mélanome	10
B. Les traitements du mélanome	16
1. La chimiothérapie	17
2. L'immunothérapie	17
a. Les thérapies basées sur les cytokines	17
b. L'immunothérapie active ou vaccination	18
c. L'immunothérapie passive ou par transfert adoptif de LT	19
3. Les thérapies ciblées	20
C. Les mécanismes de résistance des mélanomes aux différents traitements	22
II. L'Oncostatine M, une cytokine anti-proliférative des cellules de mélanome	25
A. Activité anti-proliférative des cytokines sur les cellules de mélanome	25
B. L'Oncostatine M, une cytokine multifonctionnelle	26
1. Rôle de l'Oncostatine M dans l'hématopoïèse	26
2. Rôle de l'Oncostatine M dans l'inflammation	27
3. Rôle de l'Oncostatine M dans la prolifération et la différenciation cellulaire	29
4. Autres rôles de l'Oncostatine M	29
C. La signalisation intracellulaire de l'Oncostatine M et/ou des cytokines de type Interleukine-6	30
1. Les récepteurs des cytokines de type Interleukine-6	30
2. Signalisation par la voie des JAK/STAT	31
3. Signalisation par la voie des MAPK	35
4. Signalisation par la voie des PI3K/Akt	35

5. Régulation négative de la signalisation	36
D. La résistance à l'Interleukine-6 des cellules de mélanome métastatique <i>in vitro</i>	36
III. Objectifs de la thèse	37
Partie 1 : Etude des mécanismes de résistance à l'Oncostatine M de lignées cellulaires issues de mélanomes métastatiques de grade III	39
I. La résistance à l'OSM par perte d'expression de son récepteur, l'OSMR β	40
A. Introduction	40
B. Article I	42
C. Complément de discussion à l'article I	85
II. La résistance à l'Oncostatine M et le rôle respectif de STAT3 et des isoformes de PKC et d'Akt	89
A. Introduction	89
B. Article II	91
C. Complément de discussion à l'article II	130
Partie 2 : La sensibilité à l'Oncostatine M et/ou l'Interleukine-6 des lignées cellulaires issues de mélanome métastatique corrèle avec la survie sans rechute des patients traités par des lymphocytes infiltrant les tumeurs	133
A. Introduction	134
B. Article III	135
C. Complément de discussion à l'article III	165

Conclusion et perspectives	167
Bibliographie	173

Liste des abréviations

α 1-PI = α 1-protéinase
AGM = Aorta/Gonad/Mesonephros
AJCC = American Joint Committee on Cancer
APAF-1 = Apoptotic Peptidase Activating Factor-1
APP = protéines de la phase aigue de l'inflammation
ARF = Alternate Reading Frame
Bad = Bcl-2 Antagonist of cell Death
Bax = Bcl-2-Associated X protein
CCl(4) = tétrachlorure de carbone
CDKN2A = cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
CLC = Cardiotrophin-Like Cytokine
CMH = Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CNTF = Ciliary neurotrophic factor
CPA = Cellule Présentatrice d'Antigènes
CSF = facteurs stimulant les colonies
CT-1 = Cardiotrophine-1
CTLA4 = antigène inhibiteur des LT cytotoxiques
DNMT = DNA Methyl-Transferases
ERK = Extracellular Regulated Kinase
FDA = Food and Drug Administration
FKHR = Forkhead receptor
Gab1 = Growth-factor-receptor-bound protein Associated Binder 1
GF = facteurs de croissance
GM-CSF = Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
Gp130 = glycoprotéine 130
GPL = gp130-like
Grb2/SOS = growth-factor-receptor-bound protein/Son of Sevenless
HAT = Histone Acetyl-Transferases
HDAC = histone déacétylases
ICAM-1 = Intercellular Adhesion Molecule-1
IFN = Interféron

IL = Interleukine
 IL-11R α = récepteur α à l'IL-11
 IL-6R α = récepteur α à l'IL-6
 INK4A = cell-cycle inhibitor of kinase 4A
 IRF-1 = Interferon-Regulatory Factor-1
 JAK = Janus kinase
 LIF = Leukemia Inhibitory Factor
 LIFR α = récepteur α au LIF
 LT = Lymphocyte T
 MAPK = Mitogen Activated Protein Kinases
 MBD = Methyl-CpG Binding Domain proteins
 MDA = Melanoma Differentiation-Associated gene
 MDM2 = Mouse Double Minute 2
 MeCP = Methyl-CpG binding Proteins
 MEK = MAPK/ERK Kinase
 MITF = Microphthalmia-associated Transcription Factor
 MMP = métalloprotéinases de la matrice
 mTor = mammalian Target of rapamycin
 NP = Neuropoïétine
 OSM = Oncostatine M
 OSMR β = récepteur β à l'OSM
 PDGFR = récepteur au Platelet-derived Growth Factor
 PDK1 = Phosphoinositide-Dependent protein Kinase 1
 PI3K = phosphatidylinositol 3 kinase
 PIAS = inhibiteurs des STAT activés
 PIP2 = Phosphatidyl-inositol-diphosphate
 PIP3 = Phosphatidyl-inositol-triphosphate
 PKB = Protéine Kinase B
 PKC = Protéine Kinase C
 PLC γ = Phospholipase C γ
 PTEN = Phosphatase and TENsin homolog
 Puma = p53-Upregulated Modulator of Apoptosis
 RASSF1A = Ras association domain family 1

Rb = Retinoblastome
SBE = éléments de liaison aux STAT
Ser = Sérine
SH2 = Src Homology 2
Shc = SH2 and Collagen homology domain containing protein
SHP2 = SH2-domain-containing tyrosine Phosphatase
SOCS = suppresseurs de signalisation des cytokines
SQ = métastases sous-cutanées
STAT = Signal Transducer and Activator of Transcription
Thr = Thréonine
TIL = lymphocytes infiltrant les tumeurs
TIMP = inhibiteurs des métalloprotéinases de la matrice
TNF-R = récepteur au facteur nécrotique des tumeurs
TNM = Tumor-Node-Metastasis
TORC2 = rictor-mammalian target of rapamycin
TRAIL-R = récepteur au TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand
Treg = lymphocytes T régulateurs
TSA = Trichostatine A
Tyr = Tyrosine
UV = Ultra-Violets
VCAM-1 = Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VEGF = Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR = récepteur au VEGF

Introduction

I. Le mélanome

A. Incidence, classification et étiologie du mélanome

Le mélanome est le résultat d'une transformation tumorale des mélanocytes, cellules responsables de la pigmentation de la peau par leur production de mélanine, dont l'incidence ne cesse d'augmenter (doublement tous les 10 ans) avec actuellement 132000 cas par an dans le monde. Ce chiffre reste faible en comparaison des 2 à 3 millions de cancers de la peau mais le mélanome est le plus dangereux d'entre eux en terme de décès (données de l'Organisation Mondiale de la Santé et (Gray-Schopfer et al. 2007)).

Le mélanome cutané peut se présenter sous 4 sous-types cliniques selon son mode de croissance et sa localisation : le mélanome acro-lentigineux plutôt trouvé sur la paume des mains, la plante des pieds et sous les ongles ; le mélanome lentigineux caractéristique de la tête et du cou des personnes âgées ; le mélanome nodulaire (20% des cas) ; et le plus répandu d'entre eux (70% des cas), le mélanome à développement superficiel, à croissance aplatie (Chudnovsky et al. 2005). Quelque soit la forme clinique du mélanome, ils suivent tous le modèle de Clark des changements histologiques en 5 étapes qui accompagnent la transition du naevus bénin au mélanome métastatique (Figure 1A et B) (Miller et al. 2006). Ainsi, les mélanocytes de la membrane basale de l'épiderme commencent à proliférer conduisant à la formation du naevus bénin (flèches figure 1A, et figure 1B). Cette prolifération peut devenir incontrôlée, que ce soit à partir d'un naevus bénin préexistant ou non, ce qui résulte en un naevus dysplasique (flèches figure 1A, et figure 1B). La phase de croissance radiale est marquée par une prolifération des mélanocytes dans l'épiderme, avec quelques invasions du derme. La phase de croissance verticale est caractérisée par la prolifération nodulaire des mélanocytes transformés dans le derme. Etant donné que le derme contient des vaisseaux sanguins et lymphatiques, les cellules de mélanomes peuvent alors disséminer dans ces vaisseaux et métastaser ultérieurement dans d'autres cibles telles que les ganglions lymphatiques, la peau ou des organes solides tels que les poumons, le foie et le cerveau.

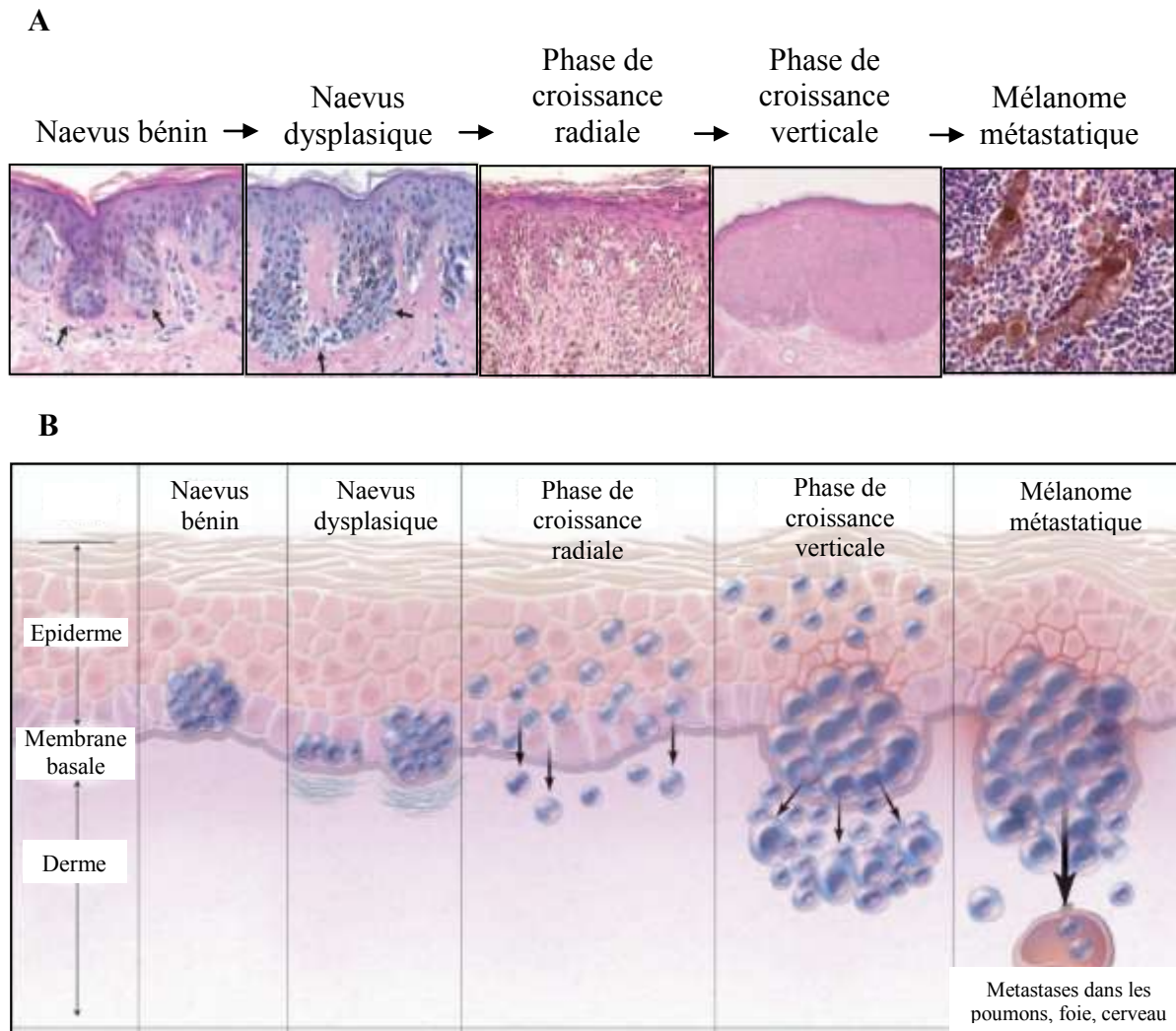


Figure 1: Le modèle de Clark d'après (Miller et al. 2006)

A: Histologie

B: Représentation schématique

Afin d'améliorer le diagnostic, le pronostic et les traitements des différents stades cliniques du mélanome, des critères clinico-pathologiques supplémentaires ont été définis comme facteurs pronostiques et ont conduit à une classification du mélanome approuvée par l'“American Joint Committee on Cancer” (AJCC) (Balch et al. 2001). Ainsi, 4 grades distinguent les mélanomes cutanés et ils peuvent être encore sous-classés, notamment avec la classification “Tumor-Node-Metastasis” (TNM). Le grade I correspond à un mélanome localisé à la peau, de faible épaisseur et d'un taux de survie à 5 ans de plus de 90% (Table 1 et figure 2). Le grade II correspond à un mélanome également localisé à la peau, mais d'épaisseur plus importante, accompagné ou non d'une ulcération (absence d'épiderme au niveau de la tumeur) et son taux de survie à 5 ans commence à être plus faible que le grade I

Grade	TNM	Epaisseur (mm)	Ulcération	Nbr gangl. envahis	Charge tumorale gangl.	Métastases distantes	Nbr de patients	Survie $\pm$ SE			
								1 an	2 ans	5 ans	10 ans
IA	T1a	1	No	0	-	-	4,510	99.7 $\pm$ 0.1	99.0 $\pm$ 0.2	95.3 $\pm$ 0.4	87.9 $\pm$ 1.0
IB	T1b	1	Yes or level IV, V	0	-	-	1,380	99.8 $\pm$ 0.1	98.7 $\pm$ 0.3	90.9 $\pm$ 1.0	83.1 $\pm$ 1.5
	T2a	1.01-2.0		0	-	-	3,285	99.5 $\pm$ 0.1	97.3 $\pm$ 0.3	89.0 $\pm$ 0.7	79.2 $\pm$ 1.1
IIA	T2b	1.01-2.0	Yes	0	-	-	958	98.2 $\pm$ 0.5	92.9 $\pm$ 0.9	77.4 $\pm$ 1.7	64.4 $\pm$ 2.2
	T3a	2.01-4.0	No	0	-	-	1,717	98.7 $\pm$ 0.3	94.3 $\pm$ 0.6	78.7 $\pm$ 1.2	63.8 $\pm$ 1.7
IIB	T3b	2.01-4.0	Yes	0	-	-	1,523	95.1 $\pm$ 0.6	84.8 $\pm$ 1.0	63.0 $\pm$ 1.5	50.8 $\pm$ 1.7
	T4a	> 4.0	No	0	-	-	563	94.8 $\pm$ 1.0	88.6 $\pm$ 1.5	67.4 $\pm$ 2.4	53.9 $\pm$ 3.3
IIC	T4b	> 4.0	Yes	0	-	-	978	89.9 $\pm$ 1.0	70.7 $\pm$ 1.6	45.1 $\pm$ 1.9	32.3 $\pm$ 2.1
IIIA	N1a	Any	No	1	Micro	-	252	95.9 $\pm$ 1.3	88.0 $\pm$ 2.3	69.5 $\pm$ 3.7	63.0 $\pm$ 4.4
	N2a	Any	No	2-3	Micro	-	130	93.0 $\pm$ 2.4	82.7 $\pm$ 3.8	63.3 $\pm$ 5.6	56.9 $\pm$ 6.8
IIIB	N1a	Any	Yes	1	Micro	-	217	93.3 $\pm$ 1.8	75.0 $\pm$ 3.2	52.8 $\pm$ 4.1	37.8 $\pm$ 4.8
	N2a	Any	Yes	2-3	Micro	-	111	92.0 $\pm$ 2.7	81.0 $\pm$ 4.1	49.6 $\pm$ 5.7	35.9 $\pm$ 7.2
	N1b	Any	No	1	Macro	-	122	88.5 $\pm$ 2.9	78.5 $\pm$ 3.7	59.0 $\pm$ 4.8	47.7 $\pm$ 5.8
	N2b	Any	No	2-3	Macro	-	93	76.8 $\pm$ 4.4	65.6 $\pm$ 5.0	46.3 $\pm$ 5.5	39.2 $\pm$ 5.8
IIIC	N1b	Any	Yes	1	Macro	-	98	77.9 $\pm$ 4.3	54.2 $\pm$ 5.2	29.0 $\pm$ 5.1	24.4 $\pm$ 5.3
	N2b	Any	Yes	2-3	Macro	-	109	74.3 $\pm$ 4.3	44.1 $\pm$ 4.9	24.0 $\pm$ 4.4	15.0 $\pm$ 3.9
	N3	Any	Any	4	Micro/macro	-	396	71.0 $\pm$ 2.4	49.8 $\pm$ 2.7	26.7 $\pm$ 2.5	18.4 $\pm$ 2.5
IV	M1a	Any	Any	Any	Any	Skin, SQ	179	59.3 $\pm$ 3.7	36.7 $\pm$ 3.6	18.8 $\pm$ 3.0	15.7 $\pm$ 2.9
	M1b	Any	Any	Any	Any	Lung	186	57.0 $\pm$ 3.7	23.1 $\pm$ 3.2	6.7 $\pm$ 2.0	2.5 $\pm$ 1.5
	M1c	Any	Any	Any	Any	Other Visceral	793	40.6 $\pm$ 1.8	23.6 $\pm$ 1.5	9.5 $\pm$ 1.1	6.0 $\pm$ 0.9
Total							17,600				

Table 1: Classification du mélanome et taux de survie (AJCC) d'après (Balch et al. 2001). TNM : "Tumor-Node-Metastasis", SQ : métastases sous-cutanées.

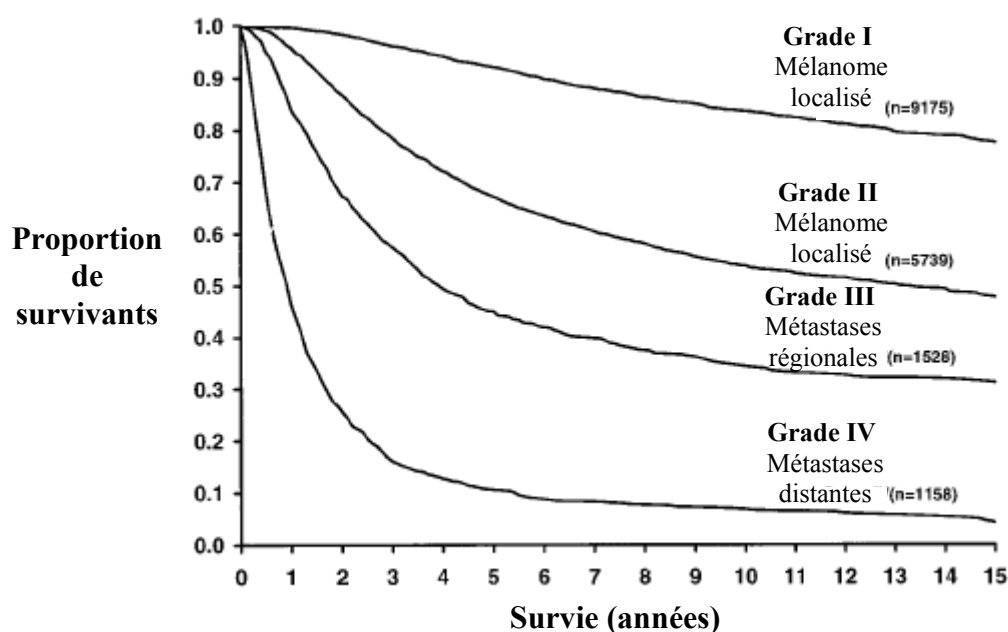


Figure 2: Courbes de survie à 15 ans d'après (Balch et al. 2001)

puisque'il est de moins de 70% (Table 1 et figure 2). Ces grades I et II correspondent au stade "Tumor" de la classification TNM (Table 1), ainsi qu'aux 4 premières étapes du modèle de Clark (jusqu'à la phase de croissance verticale, figure 1). Le grade III correspond à un mélanome capable de métastaser dans un ou plusieurs ganglions lymphatiques régionaux avec une charge tumorale variable (micro-métastases ou macro-métastases), quelque soit l'épaisseur de la tumeur primaire, accompagnée ou non d'une ulcération. Le taux de survie à 5 ans des patients atteints de mélanomes de grade III est nettement plus faible que le grade I ou II puisque'il est de moins de 50 % (Table 1 et figure 2). Ce grade III correspond au stade "Node" (ganglion) de la classification TNM (Table 1), ainsi qu'à l'étape 5 du modèle de Clark (mélanome métastatique, figure 1). Le grade IV correspond à un mélanome capable de métastaser à distance dans la peau ou dans d'autres organes tels que les poumons, quelque soit l'historique de la tumeur primaire et ganglionnaire. Le taux de survie à 5 ans des patients atteints de mélanomes de grade IV est encore plus faible que le grade III puisque'il chute à environ 10 % et la médiane de survie pour ces patients est de 6 à 9 mois seulement (Table 1 et figure 2). Ce grade IV correspond au stade "Metastasis" de la classification TNM (Table 1), ainsi qu'à l'étape 5 du modèle de Clark (mélanome métastatique, figure 1).

Toujours afin d'améliorer la classification du mélanome, d'autres critères clinico-pathologiques à potentiel pronostique sont en cours de validation pour constituer la future réévaluation (2009) de la classification du mélanome par l'AJCC. Ainsi, l'index mitotique, indicateur de la prolifération propre aux cellules de mélanomes, remplacera peut-être l'ulcération et l'invasion lymphovasculaire péri-tumorale devra certainement être prise en compte pour les grades III. De plus, l'observation de certains défauts du système actuel de classification, notamment le taux de survie assez variable de patients de même grade, soulève la nécessité de trouver de nouveaux et meilleurs critères pronostiques (Ross 2006).

Ainsi, l'étiologie du mélanome a permis de mettre en évidence une classification moléculaire qui pourrait compléter et expliquer les facteurs pronostiques clinico-pathologiques actuels, et améliorer les traitements (cf. paragraphe I, B, 3). L'exposition aux forts rayonnements ultra-violets (UV) de manière intermittente constitue un facteur de risque important pour le développement d'un mélanome. En effet, les UV induisent la mort cellulaire des kératinocytes, principales cellules de l'épiderme, mais les mélanocytes de la membrane basale de l'épiderme sont résistants aux UV et assurent la production des pigments de mélanine qui sont transmis aux kératinocytes, alors responsables du bronzage et de la

protection contre des rayons UV ultérieurs. En cas de fortes intensités d'UV, les mélanocytes peuvent subir des mutations génétiques leur permettant d'acquérir des gains de fonction au niveau de protooncogènes tels que *B-RAF* et *N-RAS*, mutés dans 70% et 15% des cas respectivement. Les protéines RAS et RAF sont responsables de l'activation des "Mitogen Activated Protein Kinases" (MAPK) telles que les "Extracellular Regulated Kinase" (ERK) 1/2, et qui induisent lors de leur activation constitutive la prolifération cellulaire, la migration, l'invasion ainsi que la production de "Vascular Endothelial Growth Factor" (VEGF) (Figure 3A) (Miller et al. 2006; Gray-Schopfer et al. 2007).

D'autres mutations ou délétions du suppresseur de tumeur "Phosphatase and TENsin homolog" (*PTEN*) ou une surexpression du protooncogène *Akt3*, caractérisent également 50% des mélanomes. Les protéines Akt, activées par l'intermédiaire du Phosphatidyl-inositol-triphosphate (PIP3) généré par les phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K), sont responsables de l'inactivation notamment de "Bcl-2 Antagonist of cell Death" (Bad), un inducteur de mort cellulaire et du "Forkhead receptor" (FKHR), un suppresseur de croissance. PTEN bloque l'activation d'Akt en déphosphorylant le PIP3 (Figure 3B). Ainsi, en cas d'activation constitutive d'Akt, les mélanomes peuvent être résistants à l'apoptose (mort cellulaire programmée) et survivre anormalement (Miller et al. 2006). Etant donné que l'activation des voies BRAF/MAPK et PI3K/Akt dépend de RAS, en cas de mutation de RAS, les activations constitutives de BRAF ou d'Akt ne sont pas retrouvées, vu le chevauchement de ces voies (Gray-Schopfer et al. 2007).

De plus, des mutations, délétions et répressions épigénétiques du locus du suppresseur de tumeur "cyclin-dependent kinase inhibitor 2A" (*CDKN2A*) se produisent dans 30 à 70% des cas sporadiques de mélanomes ainsi que dans 25 à 40% des cas familiaux. Le locus *CDKN2A* code pour deux protéines : p16^{INK4A} et p14^{ARF} (Figure 3D). La "cell-cycle inhibitor of kinase 4A" (INK4A) est un inhibiteur des CDK4/6 et bloque la phosphorylation de la protéine du Retinoblastome (Rb) par le complexe CDK4/6-Cycline D. Le facteur de transcription E2F est alors séquestré par Rb et n'active pas les gènes responsables de la transition G1-S du cycle cellulaire. Ainsi, lorsque INK4A est mutée ou absente, les mélanomes ne possèdent plus ce contrôle essentiel de la prolifération. La "Alternate Reading Frame" (ARF) est responsable de la stabilisation de p53, protéine impliquée dans la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN occasionés par les UV entre autres. Cette stabilisation de p53 est obtenue grâce à la séquestration par ARF de "Mouse Double Minute 2" (MDM2), qui induit normalement la dégradation de p53 (Figure 3C). Lorsque ARF est mutée ou absente, p53 est dégradée et les mélanomes ne peuvent plus assurer le blocage du cycle cellulaire nécessaire à la réparation de

l'ADN, ni entrer en apoptose via p53 et l'induction de "Bcl-2-Associated X protein" (Bax) (Gray-Schopfer et al. 2005; Miller et al. 2006; Gray-Schopfer et al. 2007).

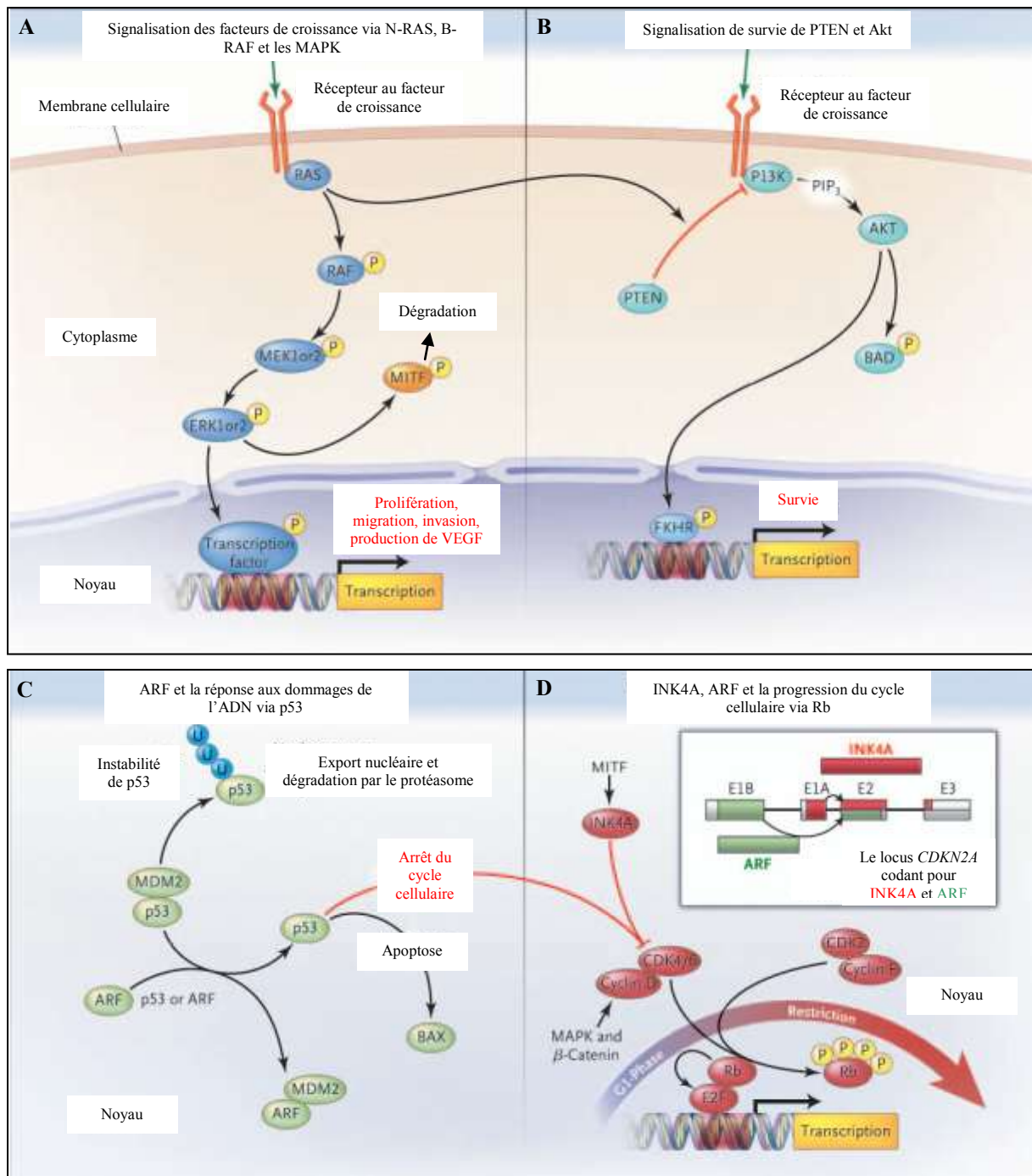


Figure 3: La voie des MAPK, PTEN/Akt et le locus CDKN2A d'après (Miller et al. 2006)

Des répressions épigénétiques de gènes pro-apoptotiques tel que le “Apoptotic Peptidase Activating Factor-1” (*APAF-1*) sont observées dans 40% des mélanomes, tout comme une surexpression du facteur anti-apoptotique Bcl-2 (Flaherty 2006; Gray-Schopfer et al. 2007). Enfin, des amplifications du protooncogène “Microphthalmia-associated Transcription Factor” (MITF), facteur de transcription essentiel à la différenciation et à la survie des mélanocytes, sont retrouvées dans environ 20% des mélanomes. De plus, MITF est une cible des MAPK, ce qui induit une dégradation de MITF (Figure 3A). Ainsi, lorsque les mélanomes sont mutés sur BRAF et amplifiés sur MITF, ceci résulte en un niveau intermédiaire de MITF qui correspondrait à la condition idéale pour la prolifération et la survie du mélanome, par son induction de la transcription de la CDK2 et de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 respectivement (Miller et al. 2006; Gray-Schopfer et al. 2007; Fecher et al. 2007). Actuellement, toutes ces altérations génétiques ou les régulations épigénétiques de la transcription des protooncogènes ou des suppresseurs de tumeurs, font l’objet d’une classification moléculaire du mélanome, qui reste cependant à étoffer. Ainsi, il semblerait que les mutations dans *B-RAF* et *N-RAS* surviendraient généralement sous l’effet des UV dès le stade de naevus bénin, permettant ainsi aux mélanocytes de se mettre à proliférer. Avec des altérations supplémentaires au niveau de *CDKN2A* et *PTEN*, ces mélanocytes perdent totalement le contrôle de leur prolifération et de la survie cellulaire, ce qui conduit au naevus dysplasique (Figure 1) (Miller et al. 2006). Pour les autres altérations génétiques citées précédemment, la classification n’est pas encore bien établie.

B. Les traitements du mélanome

Le meilleur moyen pour réduire la mortalité des patients atteints de mélanome est la détection précoce et l’excision chirurgicale complète des mélanomes localisés (grade I-II). Cependant, pour les stades plus avancés avec des métastases ganglionnaires (grade III) et ciblées dans des organes vitaux (grade IV), la chirurgie n’est pas suffisante ou inutilisable, et la mortalité reste très élevée (Figure 2) (Balch et al. 2001). Des traitements alternatifs ont donc été développés afin de prolonger la vie des patients atteints de mélanomes de grade III et IV.

1. La chimiothérapie

Depuis 30 ans, plusieurs agents chimiothérapeutiques ont été utilisés sur les patients atteints de mélanomes de grade III et IV, comme la Dacarbazine (DTIC) seule approuvée par la “Food and Drug Administration” (FDA) américaine. Certaines chimiothérapies utilisant la Dacarbazine ou son dérivé, le Témozolomide, ciblé sur les métastases du système nerveux central (pour les grades IV), ou encore le Cisplatine, jouent sur la méthylation des acides nucléiques, ce qui résulte en des dommages de l’ADN tels que des cassures et des liaisons covalentes sur le brin d’ADN. D’autres agents chimiothérapeutiques tels que le Taxol et la Vinblastine jouent sur l’assemblage des microtubules. Ces chimiothérapies ont toutes le même but : induire l’apoptose des cellules cancéreuses via p53. Cependant, malgré un grand nombre d’études cliniques de phase III randomisées, utilisant divers agents chimiothérapeutiques seuls ou en combinaison, les réponses restent très limitées et de courte durée: par exemple, 10 à 20% des patients répondent à la Dacarbazine pendant 4 à 6 mois (Hersey 2006; Chin et al. 2006). Les cellules de mélanomes montrent ainsi une résistance intrinsèque aux chimiothérapies (cf. paragraphe I, C).

2. L’immunothérapie

a. Les thérapies basées sur les cytokines

Les cytokines : Interféron (IFN) α et Interleukine (IL)-2 ont été approuvées par la FDA respectivement pour la thérapie systémique adjuvante des patients atteints de mélanome de grade II/III et IV. Les mécanismes d’action de l’IFN α passent par l’augmentation de la réponse immune ainsi que de la présentation antigénique (Atkins 2006). Ceux de l’IL-2 passent par l’activation et la prolifération des Lymphocytes T (LT) spécifiques des tumeurs (Atkins 2006). Cependant, que ce soit en utilisation seule ou en combinaison avec la chimiothérapie (biochimiothérapie), ces traitements par les cytokines n’ont pas montré à ce jour des résultats cliniques de phase III vraiment convaincants : taux de réponse de 10 à 15% (Atkins 2006). Les cellules de mélanomes montrent ainsi une résistance aux immunothérapies basées sur les cytokines (cf. paragraphe I, C).

L’IFN α et l’IL-2 sont tout de même actuellement en études de phase II/III, comme le “Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor” (GM-CSF) et l’IL-18, en traitement systémique seul ou en combinaison avec la chimiothérapie ou l’immunothérapie (Atkins 2006;

Kirkwood et al. 2006). Les mécanismes d'action du GM-CSF passent par l'activation des cellules dendritiques qui peut mener à une réponse immunitaire anti-tumorale plus efficace. Ceux de l'IL-18 passent par l'induction d'IFN γ , de Fas et de l'activité tumoricide des LT ; mais aussi par l'induction de LT mémoires et enfin par un processus anti-angiogénique. De plus, des thérapies basées sur les cytokines ciblées sur les mélanomes telles que l'immunocytokine : IL-2 fusionnée à un anti-disialoganglioside (GD) 2, et la "Melanoma Differentiation-Associated gene" (MDA)-7/IL-24, ont montré de bons résultats de phase I (King et al. 2004; Fisher et al. 2006). La MDA-7/IL-24 augmente non seulement la réponse immunitaire anti-tumorale et bloque l'angiogénèse, mais induit aussi l'apoptose spécifique de la tumeur via l'induction de Bax (Fisher et al. 2006).

b. L'immunothérapie active ou vaccination

Le principe de l'immunothérapie active est de générer une réponse immunitaire à médiation cellulaire via des LT CD8⁺ cytotoxiques capables de reconnaître et d'éliminer les cellules tumorales. Pour cela, plusieurs types de vaccins ont été mis en place.

Des cellules tumorales inactivées ou des lysats cellulaires totaux autologues ou allogéniques, dont les épitopes antigéniques sont présentés par les Cellules Présentatrices d'Antigènes (CPA) aux LT cytotoxiques, ont été évalués en phase III. De même, des vaccins peptidiques de synthèse correspondant le plus souvent à des antigènes tumoraux de différenciation de 8 à 11 acides aminés et restreints aux Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de classe I, ont été testés en phase III. Aucun effet notable sur la survie des patients atteints de mélanomes de grade III ou IV n'a pu être observé avec ces vaccins (Ribas 2006; Parmiani et al. 2007).

Les vaccins tumoraux ont été également mélangés à des adjuvants ou modifiés avec des gènes de cytokines telles que le GM-CSF afin de stimuler les cellules dendritiques. Des résultats prometteurs ont été obtenus dans des modèles de mélanome murin et sont en cours d'étude chez l'homme (Ribas 2006).

Après leur différenciation et leur maturation *ex-vivo*, les cellules dendritiques, qui sont les CPA les plus efficaces, peuvent être manipulées afin de générer une réponse cytotoxique *in vivo*. Ainsi, les cellules dendritiques autologues peuvent être chargées avec des antigènes tumoraux totaux ou des peptides, transfectées avec de l'ADN ou de l'ARN de tumeurs, infectées par des virus recombinants exprimant des antigènes tumoraux, et modifiées génétiquement afin qu'elles expriment des antigènes tumoraux et des molécules de costimulation (Ribas 2006; Parmiani et al. 2007). Ces cellules dendritiques peuvent également

être fusionnées avec des cellules tumorales (Adamina et al. 2005). Malheureusement, dans les études de phase III, aucune réponse clinique vraiment efficace n'a pu être notée.

Des anticorps antagonistes de l'antigène inhibiteur des LT cytotoxiques (CTLA4) utilisés seuls ou en combinaison avec des vaccins ou des cytokines, ont montré des résultats encourageants malgré des problèmes d'autoimmunité (Ribas 2006) ; taux de réponse globale de 22% pour un traitement avec l'anti-CTLA4 combiné à l'IL-2 en phase I, par exemple (Wolchok et al. 2007).

Des anticorps activateurs des antigènes CD137 (4-1BB) ou CD40, costimulateurs des LT cytotoxiques, sont en développement chez l'homme (Ribas 2006).

Ainsi, malgré un grand nombre d'essais cliniques d'immunothérapies actives, la réponse immunitaire peut être générée dans 30 à 80% des patients mais le taux de réponse des patients en études de phases III n'est que de 5 à 15% à ce jour. L'efficacité des vaccinations n'est donc pas supérieure aux autres traitements par chimiothérapie ou aux thérapies basées sur les cytokines. Les cellules de mélanomes montrent ainsi, à ce jour, une résistance aux immunothérapies actives (cf. paragraphe I, C).

c. L'immunothérapie passive ou par transfert adoptif de Lymphocytes T

L'immunothérapie par transfert adoptif de LT permet d'éviter les étapes d'activation des CPA puis leur coopération avec les LT, qui doivent normalement mener à une activation des LT cytotoxiques, mais qui peuvent être limitantes pour le succès des immunothérapies actives. Après leur purification, les lymphocytes infiltrant les tumeurs (TIL) sont amplifiés *ex-vivo* et activés par l'IL-2 puis réadministrés aux patients. Trois études cliniques d'immunothérapies passives se démarquent des autres essais.

Une étude de phase II/III sur des patients atteints de mélanome de grade III a utilisé des TIL autologues stimulés par de l'IL-2 et les auteurs ont montré que dans le groupe de patients ayant un seul ganglion envahi par le mélanome, 10 patients sur 15, soit 66% des patients ont une réponse durable jusqu'à 10 ans après l'étude (Dreno et al. 2002; Khammari et al. 2007).

Deux autres études de phase I sur des patients atteints de mélanome de grade IV ont utilisé des TIL CD8⁺ cytotoxiques autologues stimulés par de l'IL-2, et sélectionnés *in vitro* pour leur spécificité à un antigène tumoral. Les patients qui ont été injectés avec ces TIL avaient auparavant été lymphodéplétés par chimiothérapie afin d'éliminer les lymphocytes T régulateurs (Treg), inhibiteurs de la réponse cytotoxique anti-tumorale. Dans la première

étude, 6 patients sur 13, soit 46% des patients et dans la deuxième étude, 18 patients sur 35, soit 51% des patients, ont répondu au traitement mais avec des problèmes d'autoimmunité (Dudley et al. 2002; Dudley et al. 2005).

Ainsi, il semblerait que ces immunothérapies par transfert adoptif de TIL chez des patients lymphodéplétés ou pas, résultent en des taux de réponses cliniques nettement supérieurs à toutes les autres chimiothérapies ou immunothérapies conduites à ce jour. Cependant, certains patients ne répondent toujours pas, même avec ce type de traitement, et les cellules de mélanomes peuvent donc être également résistantes à ces immunothérapies passives (cf. paragraphe I, C).

3. Les thérapies ciblées

Plus récemment, les différentes altérations génétiques ou les régulations de la transcription des protooncogènes ou suppresseurs de tumeurs, ont fait l'objet de nouvelles thérapies pour le traitement du mélanome de grade III et IV.

Les mutations dans la voie des MAPK au niveau de *B-RAF* et *N-RAS* sont ciblées grâce à des inhibiteurs de RAS utilisés seuls ou en combinaison avec la chimiothérapie dans des études en cours de phase I (Fecher et al. 2007). Un inhibiteur des kinases RAF, le Sorafenib, mais aussi inhibiteur des récepteurs au VEGF (VEGFR) et au "Platelet-derived Growth Factor" (PDGFR) qui possèdent une activité kinase intrinsèque, ne fonctionne pas quand il est utilisé seul mais il a donné des bons résultats quand il est utilisé en combinaison avec les chimiothérapies telles que la Dacarbazine (phase II/III en cours) ou le Carboplatine et le Paclitaxel (phase III) (Flaherty 2006). Le Sorafenib est également actuellement testé en phase II en combinaison avec d'autres inhibiteurs de RAS ou du VEGF. Des inhibiteurs de la "MAPK/ERK Kinase" (MEK) (Figure 3A), qui est une cible de RAF, sont également en cours d'évaluation en phase II (Fecher et al. 2007; Gray-Schopfer et al. 2007).

L'activation constitutive d'Akt a été ciblée grâce à des inhibiteurs d'Akt mais ceux-ci n'ont pas montré d'effet thérapeutique. Des inhibiteurs du "mammalian Target of rapamycin" (mTor), cible d'Akt, ont donné des résultats encourageants en combinaison avec le Sorafenib (phase I/II) ou un inhibiteur du VEGF (phase II) (Fecher et al. 2007; Gray-Schopfer et al. 2007).

Les altérations de *CDKN2A* peuvent être neutralisées par des inhibiteurs des CDK, qui sont aussi inhibiteurs des VEGFR et PDGFR, et sont actuellement en cours de phase I (Fecher et al. 2007).

Des inhibiteurs des chaperones Hsp90, qui ciblent les trois voies de signalisation précédemment citées et hyperactivées dans les mélanomes, à savoir les kinases RAF, Akt et les CDK4/6, ont engendré de bonnes réponses cliniques et sont en cours de phase II actuellement (Fecher et al. 2007; Gray-Schopfer et al. 2007).

La surexpression du facteur anti-apoptotique Bcl-2 est ciblée par des oligonucléotides antisens, qui donnent des résultats cliniques uniquement lorsqu'ils sont combinés avec la Dacarbazine (phase III) (Tarhini et al. 2007).

Enfin, des inhibiteurs d'histone déacétylases (HDAC) sont en cours de phase II (Boyle et al. 2005). Les régulations épigénétiques de l'expression des suppresseurs de tumeurs et des protooncogènes occupent une place importante dans les mécanismes de transformation des cellules cancéreuses. En particulier, la méthylation de l'ADN et l'acétylation des histones sont les mieux décrites, notamment pour le mélanome (Rothhammer et al. 2007). La méthylation des Cytosines de l'ADN au niveau d'ilôts CpG situés dans les promoteurs des gènes est assurée par des "DNA Methyl-Transferases" (DNMT) et correspond à une répression transcriptionnelle. L'acétylation de la queue N-terminale basique des histones est assurée par des "Histone Acetyl-Transferases" (HAT) et neutralise cette région N-terminale, ce qui permet un relâchement de la chromatine et le recrutement des coactivateurs transcriptionnels. L'état acétylé des histones au niveau d'un promoteur traduit en général une activation transcriptionnelle. Cette acétylation des histones est finement régulée par d'autres enzymes, les HDAC, qui déacétylent les histones et sont responsables de la condensation de la chromatine et en général de la répression transcriptionnelle. Ces HDAC peuvent être également associées, dans des complexes de corépresseurs transcriptionnels, aux protéines qui se lient à l'ADN méthylé, les "Methyl-CpG binding Proteins" (MeCP) et les "Methyl-CpG Binding Domain proteins" (MBD) (Jaenisch et al. 2003). La méthylation de l'ADN peut être ainsi reliée à la déacétylation des histones, qui est responsable de la répression transcriptionnelle. Une surexpression des HDAC de classe I (HDAC1, 2 et 3) et de classe III (Sirtuin1) a été mise en évidence dans les cellules de mélanome (Rothhammer et al. 2007). Des inhibiteurs d'HDAC ont été développés et sont responsables d'une variation d'expression d'environ 10% des gènes. Cette régulation est en général une augmentation transcriptionnelle mais peut également être une réduction transcriptionnelle, selon l'effet des inhibiteurs des HDAC sur l'acétylation des facteurs de transcription régulant le promoteur des gènes. Les inhibiteurs des HDAC ont une activité plus importante dans les mélanomes que dans les mélanocytes, car ils ciblent certains suppresseurs de tumeurs et protooncogènes dont l'expression a été altérée dans les mélanomes et dont ils sont devenus dépendants pour leur

survie (Boyle et al. 2005). Ces inhibiteurs des HDAC sont ainsi capables de bloquer le cycle cellulaire des cellules de mélanome en réinduisant l'expression de l'inhibiteur du complexe CDK2/Cycline E, la protéine p21^{WAF1/CIP1} ainsi qu'en diminuant l'expression de la Cycline D (Figure 3D). Les inhibiteurs des HDAC sont également capables d'induire l'apoptose en augmentant les facteurs pro-apoptotiques Bax, Bak et Bid, les caspases 3 et 8 ainsi qu'APAF-1, mais aussi en réduisant l'expression de l'anti-apoptotique Bcl-2 (Boyle et al. 2005).

C. Les mécanismes de résistance des mélanomes aux différents traitements

Bien que quelques études cliniques aient donné des résultats prometteurs, de nombreux patients atteints de mélanomes de grade III ou IV ne répondent pas aux traitements, et les mécanismes de résistance des mélanomes sont multiples et dépendants du type de traitement.

En plus des facteurs pronostiques classiques établis par l'AJCC (Balch et al. 2001), le nombre de ganglions envahis apparaît important pour l'efficacité du traitement TIL+IL-2 de patients atteints de mélanomes de grade III (Dreno et al. 2002; Khammari et al. 2007). Deux études rétrospectives sur ces mêmes patients ont montré que la spécificité des TIL injectés joue également un rôle dans la réponse au traitement (Labarriere et al. 2002; Benlalam et al. 2007), comme précédemment décrit (Kawakami et al. 1995). Les maladies autoimmunes représentent un signe d'activation de la réponse anti-tumorale et elles ont été aussi corrélées à la survie des patients traités à l'IFN α (Gogas et al. 2006) ou aux anti-CTLA4 (Ribas et al. 2005).

La présence de Treg a été corrélée à la résistance des mélanomes à l'immunothérapie (Wrzesinski et al. 2005) et leur régulation négative du système immunitaire peut être renforcée par les cytokines immunosuppressives produites par les cellules de mélanome, qui corrèle également avec un faible pronostic (Quereux et al. 2007). D'autres stratégies d'échappement à la reconnaissance par le système immunitaire sont développées par les cellules de mélanome, comme la diminution de l'expression du CMH de classe I ou II, ou des antigènes de tumeurs, mais cela n'est pas toujours associé à la survie des patients (Quereux et al. 2007; Hofbauer et al. 2004; van Houdt et al. 2005).

La résistance à la voie intrinsèque de l'apoptose (ou voie mitochondriale) caractérise une forte proportion des cellules de mélanome, et est liée aux différentes altérations génétiques ou aux régulations épigénétiques de la transcription des protooncogènes ou suppresseurs de tumeurs précédemment citées (cf. Paragraphe I, A) : inhibition de Bad par Akt, perte de p14^{ARF} et

dégradation de p53, perte d'APAF-1, augmentation de Bcl-2 via MITF entre autres. Ainsi, des altérations de cette voie intrinsèque de l'apoptose ont pu être corrélées à une mauvaise survie des patients: mutation de p53 (Daniotti et al. 2004), perte de "p53-Upregulated Modulator of Apoptosis" (Puma) (Karst et al. 2005) et augmentation de l'expression d'un inhibiteur de l'apoptose, la survivine (Takeuchi et al. 2005). La prolifération incontrôlée caractérise également les cellules de mélanome (cf. Paragraphe I, A), et de la même manière que pour le blocage de l'apoptose, la perte du régulateur négatif de la cycline D : "Ras association domain family 1" (RASSF1A), est associée à un mauvais pronostic pour des patients traités par biochimiothérapie (Mori et al. 2005).

Les cellules de mélanome montrent souvent une résistance à la voie extrinsèque de l'apoptose ou voie des récepteurs de mort cellulaire, qui sont le récepteur au facteur nécrotique des tumeurs (TNF)-R, le récepteur au "TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand" (TRAIL)-R et le récepteur de Fas. La voie extrinsèque étant connectée à la voie intrinsèque via la protéine pro-apoptotique Bid, tous les mécanismes de résistance à la voie intrinsèque précédemment cités s'appliquent donc également à la voie des récepteurs de mort cellulaire (Soengas et al. 2003). La perte d'expression de ces récepteurs, liée notamment à l'activation constitutive des MAPK, est aussi à l'origine de ce type de résistance à l'apoptose (Ivanov et al. 2003). Ainsi, la réponse clinique de patients traités au TNF α corrèle significativement avec l'expression par les cellules de mélanome d'un facteur régulateur du TNF-R (van Horssen et al. 2006).

Enfin, des défauts de signalisation en réponse à l'IFN γ dans les cellules de mélanomes de patients traités par l'IFN γ sont associés à un mauvais pronostic (Boudny et al. 2005), alors que ce n'est pas le cas pour la thérapie à l'IFN α (Lesinski et al. 2005). De plus, la présence chronique d'IL-6 dans le sérum de patients avant une bio- et/ou chimiothérapie est corrélée à une mauvaise survie, et de manière importante à une perte d'expression du récepteur à l'IL-6 par les cellules de mélanome (Tartour et al. 1994; Tas et al. 2005; Mouawad et al. 1999).

Ainsi, l'échec des chimiothérapies peut s'expliquer par la résistance à l'apoptose intrinsèque et la prolifération accrue des cellules de mélanome. Les résultats des chimiothérapies s'améliorent en effet lorsqu'elles sont combinées avec les thérapies ciblées sur les différentes voies altérées dans les mélanomes (cf. paragraphe I, B, 3). Ces thérapies ciblées ont d'ailleurs donné des résultats encourageants en utilisation combinée, ciblant ainsi plusieurs voies défectueuses dans les mélanomes (cf. paragraphe I, B, 3). Pour les patients réfractaires aux

immunothérapies basées sur les cytokines, aux vaccinations ou aux transferts adoptifs de TIL, plusieurs mécanismes de résistance peuvent être à l'origine de ces échecs:

- une absence de reconnaissance des cellules tumorales par les LT cytotoxiques et leur défaut d'activation par l'immunosuppression générée par la tumeur
- une impossibilité de ces LT cytotoxiques à éliminer les cellules tumorales par leurs mécanismes effecteurs (c'est-à-dire l'activation des récepteurs de mort cellulaire), par l'altération des voies intrinsèques et extrinsèques de l'apoptose dans les cellules de mélanome
- une perte possible de la capacité des LT cytotoxiques à réduire la prolifération des cellules de mélanome par l'activité directe anti-proliférative de certaines cytokines telles que l'IFN γ et l'IL-6

Afin d'améliorer l'efficacité des immunothérapies des patients atteints de mélanomes de grade III et IV, leur combinaison avec les thérapies ciblées pourrait être envisagée, comme c'est le cas pour les chimiothérapies.

Comme indiqué dans la paragraphe II, A ci-dessous, certaines cytokines comme les IFN et l'IL-6 ont des effets anti-prolifératifs majeurs sur les cellules de mélanome, et des résistances apparaissent dans les stades métastatiques. Une meilleure compréhension des mécanismes de résistance de ces cytokines est bien sûr nécessaire et surtout son impact sur la réponse clinique des patients traités par immunothérapie doit être maintenant étudié. En effet, la contribution des cytokines anti-prolifératives (IFN γ , TNF α et IL-6) produites par les lymphocytes T dans le contrôle direct (indépendamment du système immunitaire) de la progression des mélanomes n'est pas connue.

II. L'Oncostatine M, une cytokine anti-proliférative des cellules de mélanome

A. Activité anti-proliférative des cytokines sur les cellules de mélanome

Les cytokines sont des protéines généralement solubles qui assurent la communication intercellulaire dans différents organes et systèmes. Elles sont impliquées notamment dans l'hématopoïèse et la réponse immunitaire et leur activité biologique s'effectue par la fixation sur leur récepteur membranaire spécifique. Les cytokines sont caractérisées par leur pléiotropie (action d'une même cytokine sur plusieurs cibles cellulaires exprimant leur récepteur spécifique) et leur redondance (action similaire de plusieurs cytokines sur la même cible cellulaire). Lorsqu'elles sont secrétées, les cytokines peuvent agir à de très faibles concentrations sur les cellules avoisinantes (paracrinie), sur les cellules productrices elles-mêmes (autocrinie) ou à l'intérieur des cellules productrices (intracrinie). Les cytokines sont généralement regroupées selon leur fonction biologique, qui dépend de leur récepteur spécifique. Ainsi, les cytokines peuvent être classées en 6 groupes ou familles : les interleukines (IL-), les interférons (IFN), les facteurs nécrotiques des tumeurs (TNF), les facteurs stimulant les colonies (CSF), les facteurs de croissance (GF) et les chimiokines.

En plus de leurs propriétés immunostimulatrices aboutissant à l'activation des LT cytotoxiques responsables de la réponse immunitaire anti-tumorale, plusieurs cytokines ont été montrées comme étant capables de restreindre directement la prolifération du mélanome *in vivo* et *in vitro*. Ainsi, l'IFN α , l'IFN γ et l'IL-12 ont des activités anti-prolifératives et pro-apoptotiques sur des cellules de mélanome injectées dans des souris (Krepler et al. 2004; Yu et al. 2001; Airoidi et al. 2007). La réponse des cellules de mélanome à l'IFN γ et au TNF α a aussi été associée à la survie des patients atteints de mélanomes et traités par l'IFN γ et le TNF α respectivement (cf. paragraphe I, C) (Boudny et al. 2005; van Horssen et al. 2006). La protéine de fusion entre le récepteur soluble de l'IL-6 et l'IL-6 est également responsable de l'inhibition de la croissance et du rejet des cellules B16 de mélanome murin *in vivo* (Ozbek et al. 2001). La réponse à l'IL-6, compromise dans des cellules de mélanome ayant perdu l'expression du récepteur à l'IL-6, est corrélée à un mauvais pronostic pour les patients (cf. paragraphe I, C) (Mouawad et al. 1999). Enfin, l'Oncostatine M (OSM), qui appartient à la

famille de l'IL-6, a été montrée récemment comme étant capable d'inhiber les métastases pulmonaires des cellules B16 de mélanome murin (Ouyang et al. 2006).

In vitro, la prolifération des mélanocytes et des lignées cellulaires issues de mélanomes de stades précoces (croissance radiale) est inhibée par l'IFN α , β , γ et l'IFN λ , le TNF α , l'IL-6 et l'OSM. Cependant, les lignées cellulaires issues des lésions plus avancées ou métastatiques perdent souvent la sensibilité aux cytokines anti-prolifératives. Ce phénomène de résistance à de multiples cytokines suggère un rôle important de ces cytokines dans le contrôle de la progression du mélanome (Sato et al. 2006; Bani et al. 1996; Lu et al. 1993).

B. L'Oncostatine M, une cytokine multifonctionnelle

L'OSM fait partie de la famille de l'IL-6 (Gearing et al. 1992), qui contient également l'IL-11, le "Leukemia Inhibitory Factor" (LIF), l'IL-27, l'IL-31, le "Ciliary neurotrophic factor" (CNTF), la Cardiotrophine-1 (CT-1), la "Cardiotrophin-Like Cytokine" (CLC) et la Neuropoïétine (NP) (Tanaka et al. 2003; Murakami et al. 2004; Dillon et al. 2004; Chen et al. 2004; Derouet et al. 2004). Cette appartenance à la famille de l'IL-6 est due au partage d'une même chaîne réceptrice transmembranaire: la gp130, à l'exception de l'IL-31 qui utilise la gp130-like (GPL) (Dillon et al. 2004).

L'OSM est une cytokine multifonctionnelle produite principalement par les LT et les macrophages activés, les cellules dendritiques et les neutrophiles (Brown et al. 1987; Malik et al. 1989; Suda et al. 2002; Grenier et al. 1999). Le clonage et séquençage de l'OSM humaine ont mis en évidence un ADN complémentaire qui code pour un précurseur protéique de 252 acides aminés contenant un peptide signal hydrophobe de 25 acides aminés en NH₂-terminal. Après clivage de ce peptide signal, la forme soluble de pro-OSM de 227 acides aminés est générée (Malik et al. 1989). La forme mature et active de l'OSM de 196 acides aminés est alors obtenue après un second clivage de 31 acides aminés en C-terminal (Linsley et al. 1990). Chez la souris, l'OSM est principalement exprimée dans les tissus hématopoïétiques comme la moelle osseuse, le thymus et la rate (Yoshimura et al. 1996).

1. Rôle de l'Oncostatine M dans l'hématopoïèse

L'OSM est impliquée dans l'hématopoïèse foetale puisqu'elle est capable de stimuler les cellules endothéliales de la zone aortique (région AGM) des souris qui induisent à leur tour l'expansion des progéniteurs hématopoïétiques pluripotents (Mukoyama et al. 1998).

L'hématopoïèse adulte est également dépendante de l'OSM, cette cytokine étant responsable du maintien des progéniteurs des mégacaryocytes et des érythrocytes par son activité sur les cellules stromales de la moelle osseuse. Cet effet a été démontré chez des souris déficientes pour le récepteur de l'OSM : OSMR β (Tanaka et al. 2003), ce qui n'exclue pas une implication de l'IL-31 utilisant la même chaîne réceptrice. L'OSM peut aussi être responsable d'une lymphopoïèse extrathymique qui se produit dans les ganglions lymphatiques. En effet, dans des souris transgéniques qui expriment l'OSM dans les LT précoces (sous le promoteur lck), une accumulation de LT immatures et matures se produit dans ces ganglions et les LT ont des caractéristiques fonctionnelles de LT mémoires plus sensibles à l'apoptose (Clegg et al. 1996; Clegg et al. 1999; Blais et al. 2006).

2. Rôle de l'Oncostatine M dans l'inflammation

L'OSM est par ailleurs impliquée dans l'inflammation. En effet, l'OSM induit la production d'IL-6, qui stimule fortement l'inflammation, par les cellules endothéliales notamment (Brown et al. 1991). De plus, l'OSM joue un rôle important dans le recrutement des leucocytes au niveau des sites inflammatoires (Tanaka et al. 2003) et plus précisément au niveau des cellules endothéliales, cette cytokine induit la production de chimiokines (Modur et al. 1997; Sugaya et al. 2006) et de molécules d'adhésion intercellulaire (P-selectine, E-selectine, "Intercellular Adhesion Molecule-1" (ICAM-1) et "Vascular Cell Adhesion Molecule-1" (VCAM-1)) (Yao et al. 1996; Modur et al. 1997).

Dans les hépatocytes, l'OSM comme l'IL-6 sont responsables de la sécrétion des protéines de la phase aigue de l'inflammation (APP), à savoir des anti-protéases et le fibrinogène favorisant la réparation tissulaire (Richards et al. 1992; Kopf et al. 1994; Kerr et al. 1999).

L'OSM assure le remodelage de la matrice extracellulaire par sa régulation de l'équilibre entre les métalloprotéinases de la matrice (MMP) et leurs inhibiteurs (TIMP). L'OSM augmente en effet fortement l'expression du TIMP-1 dans des fibroblastes synoviaux ou pulmonaires, alors que ce n'est pas le cas pour l'IL-6 et le LIF (Richards et al. 1993). De même, l'OSM induit l'expression de MMP-1 et MMP-9 dans les fibroblastes (Korzus et al. 1997). L'OSM murine injectée dans le cartilage induit son inflammation ainsi que la destruction de celui-ci (Langdon et al. 2000), de manière indépendante de l'IL-6 (de Hooge et al. 2002); tout comme l'OSM humaine agit sur les chondrocytes en induisant les MMP-1, -3, -13 et le TIMP-3, et participe à la destruction du cartilage (Li et al. 2001). Au niveau des

cellules épithéliales pulmonaires, l'OSM stimule la synthèse d'anti-protéases comme l' α 1-antichymotrypsine et l'inhibiteur de l' α 1-protéinase (α 1-PI) (Cichy et al. 1995; Cichy et al. 1998).

L'OSM est également impliquée dans l'inflammation du système nerveux central, par son action sur l'expression d'IL-6, de prostaglandine E2 et des MMP-1 et -3 dans les astrocytes (Chen et al. 2004).

Enfin, l'OSM participe à l'inflammation cutanée et à la cicatrisation. Dans les kératinocytes, l'OSM induit la transcription de gènes codant pour des protéines anti-microbiennes de l'immunité innée telles que la “ β -defensin2”, les protéines S100A7, 8, 9 et la “S100 neutrophil protein” ; ainsi que les molécules inflammatoires : chimiokines et MMP-1 (Boniface et al. 2007). L'OSM est surexprimée dans les lésions de psoriasis, une pathologie inflammatoire cutanée, par rapport à la peau saine (Bonifati et al. 1998). L'OSM stimule la production de composants de la matrice extracellulaire comme le collagène par les fibroblastes dermiques (Duncan et al. 1995). Une augmentation de l'expression de l'OSM par les neutrophiles et de l'OSMR β dans les blessures cutanées est retrouvée chez l'homme (Goren et al. 2006). Les autres cytokines de type IL-6 sont également impliquées dans l'inflammation cutanée. En effet, la surexpression d'IL-6 dans les kératinocytes induit une réaction inflammatoire avec une infiltration de LT (Sawamura et al. 1998), et les monocytes et les kératinocytes de patients atteints de psoriasis produisent plus d'IL-6 (Neuner et al. 1991). Des souris déficientes en IL-6 ont une cicatrisation retardée par rapport aux souris sauvages (Gallucci et al. 2000; Lin et al. 2003). L'IL-11 est également surexprimée dans les lésions psoriatiques par rapport à la peau saine (Ameglio et al. 1997). La surexpression d'IL-31 murine dans la peau de souris transgéniques entraîne un phénotype ressemblant à la dermatite atopique, une autre pathologie inflammatoire cutanée; l'IL-31 induit une production de chimiokines par les kératinocytes humains ; et l'injection intradermique d'IL-31 murine augmente l'infiltration leucocytaire (Dillon et al. 2004). L'ARN messager de l'IL-31 est surexprimé dans la peau lésée par la dermatite atopique (Neis et al. 2006; Sonkoly et al. 2006).

3. Rôle de l'Oncostatine M dans la prolifération et la différenciation cellulaire

L'OSM est capable de réguler la prolifération et/ou la différenciation des différents types cellulaires précédemment cités, à savoir les cellules endothéliales, les hépatocytes, les fibroblastes, les cellules épithéliales pulmonaires, les astrocytes et les kératinocytes, ainsi que les ostéoblastes et les cellules épithéliales mammaires (Grant et al. 1999; Grant et al. 2001). D'une manière intéressante, l'OSM est la cytokine de type IL-6 la plus efficace pour inhiber la prolifération de nombreuses lignées cellulaires issues de tumeurs solides telles que l'hépatocarcinome, le glioblastome, l'ostéosarcome, le cancer des ovaires, du sein et des poumons, ainsi que le mélanome (Grant et al. 1999; Tanaka et al. 2003), avec lequel l'OSM a été mise en évidence et clonée (Zarling et al. 1986). *In vivo*, l'OSM exprimée par des cellules de glioblastomes transfectées empêche la formation de tumeurs cérébrales dans des souris nude (Friedrich et al. 2001). Dans un modèle d'adénocarcinome pulmonaire, l'OSM exprimée par les cellules tumorales transfectées engendre une régression et même une disparition des tumeurs (Wang et al. 2004). La surexpression de l'OSM murine suite à l'injection d'adénovirus codant cette cytokine, en combinaison avec un inhibiteur de kinases (Midostaurine), ralentit la progression d'ostéosarcomes chez le rat (Brounais). Enfin, l'injection d'OSM bloque la formation de métastases pulmonaires des cellules B16 de mélanome murin (Ouyang et al. 2006). Il est à noter que l'OSM peut également être un facteur de croissance pour les sarcomes de Kaposi (Miles et al. 1992; Nair et al. 1992), les myélomes multiples (Zhang et al. 1994; Nishimoto et al. 1994) et les carcinomes des cellules squameuses œsophagiennes et cervicales (Sharma et al. 2003; Ng et al. 2007). Cependant, relativement peu d'études se sont focalisées sur les effets anti-tumoraux de l'OSM, notamment sur le mélanome, et les mécanismes moléculaires qui régulent cette activité restent très peu compris.

4. Autres rôles de l'Oncostatine M

L'OSM joue enfin un rôle dans le développement du foie, par son action sur la différenciation et la maturation fonctionnelle des hépatocytes fœtaux (Miyajima et al. 2000). La régénération du foie est également sous la dépendance de l'OSM puisque des souris déficientes pour l'OSMR β ont une prolifération des hépatocytes plus lente par rapport aux

souris sauvages ainsi qu'une réparation tissulaire altérée, suite à une exposition au tétrachlorure de carbone (CCl₄) ou à une hépatectomie partielle (Nakamura et al. 2004).

L'OSM est impliquée dans le développement de neurones nociceptifs, comme ceci a été montré sur des souris déficientes en OSM, qui possèdent un nombre plus faible de ces neurones (Morikawa et al. 2004).

L'OSM module le métabolisme de l'os, comme ceci a été montré dans des modèles murins de calvaria où cette cytokine a un effet biphasique selon le stade de différenciation cellulaire. Aux stades précoces de la formation osseuse, les ostéoblastes se différencient sous l'effet de l'OSM et induisent la formation osseuse, alors qu'aux stades tardifs l'OSM inhibe la formation osseuse par les ostéoblastes (Malaval et al. 2005; Chipoy et al. 2004). L'OSM stimule également la différenciation des ostéoclastes et la dégradation osseuse par ces cellules (Palmqvist et al. 2002).

L'OSM inhibe le processus de décidualisation, essentiel à l'implantation embryonnaire dans l'utérus et caractérisé par une infiltration leucocytaire et un remaniement de la matrice extracellulaire (Tanaka et al. 2003).

C. La signalisation intracellulaire de l'Oncostatine M et/ou des cytokines de type Interleukine-6

1. Les récepteurs des cytokines de type Interleukine-6

D'une manière générale, les cytokines de type IL-6 initient leur signalisation intracellulaire en se fixant à une sous-unité réceptrice membranaire spécifique puis forment un complexe actif capable de transduire un signal en s'associant avec une seconde sous-unité réceptrice commune à cette famille de cytokines, la gp130. Ainsi, l'IL-6 et l'IL-11 se fixent d'abord au récepteur spécifique à l'IL-6 (IL-6R α) ou à l'IL-11 (IL-11R α) respectivement, puis transduisent leur signal via un homodimère de gp130. Le LIF se fixe d'abord au récepteur spécifique au LIF (LIFR α) puis transduit son signal via un hétérodimère LIFR α -gp130 (Figure 4) (Heinrich et al. 2003).

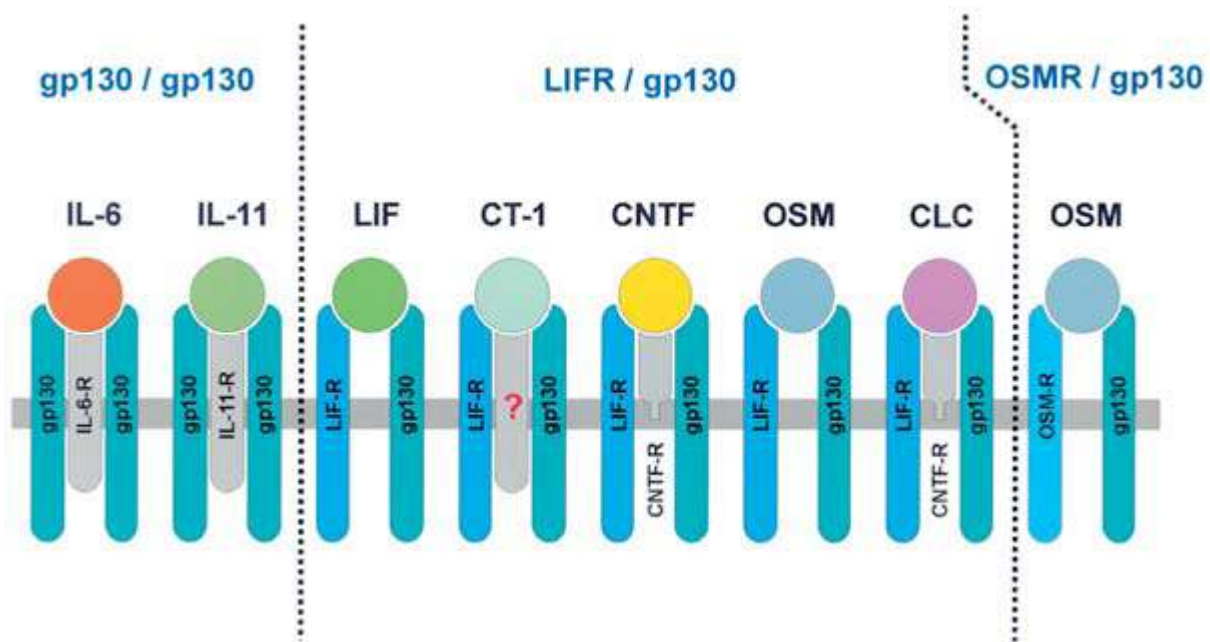


Figure 4: Les complexes de récepteurs des cytokines de type IL-6 d'après (Heinrich et al. 2003)

L'OSM représente un cas particulier dans ces cytokines de type IL-6 car elle est capable de se fixer à la gp130 en premier puis de recruter soit le LIFR α , soit l'OSMR β , ce qui lui permet de transduire le signal (Figure 4). L'OSM est d'ailleurs la cytokine de type IL-6 la plus proche du LIF en terme de séquence, localisation de son gène et de structure secondaire. Ainsi, les activités spécifiques à l'OSM, notamment ses effets anti-tumoraux, peuvent s'expliquer par son utilisation exclusive du complexe récepteur gp130-OSMR β . Il est à noter que l'OSM humaine injectée chez la souris donne un effet "LIF-like" car elle se fixe uniquement sur le complexe LIFR α -gp130 murin (Grant et al. 1999).

2. Signalisation par la voie des JAK/STAT

Comme beaucoup d'autres cytokines, la signalisation intracellulaire de l'OSM et de l'IL-6 implique rapidement l'activation de Tyrosine kinases "Janus kinase" (JAK), qui sont associées constitutivement aux chaînes transductrices des récepteurs. Dans le cas des cytokines de type IL-6, les kinases JAK1, JAK2 et TYK2 sont liées à la gp130, au LIFR α et à l'OSMR β au niveau de motifs conservés de la partie intracytoplasmique juxtamembranaire

des récepteurs, les “boîtes 1 et 2”. D’autres kinases telles que celles de la famille des Src ou Tec peuvent aussi être associées à la transduction du signal des cytokines de type IL-6, mais leur contribution à cette signalisation reste encore à définir (Heinrich et al. 2003). La liaison de la cytokine à son récepteur entraîne le rapprochement des 2 sous-unités le constituant et ainsi des JAK, qui s’activent par phosphorylation mutuelle et peuvent alors phosphoryler des résidus Tyrosine (Tyr) présents dans la partie intracytoplasmique du récepteur, créant ainsi des sites d’ancrage pour les protéines contenant un domaine “Src Homology 2” (SH2) (Figure 5).

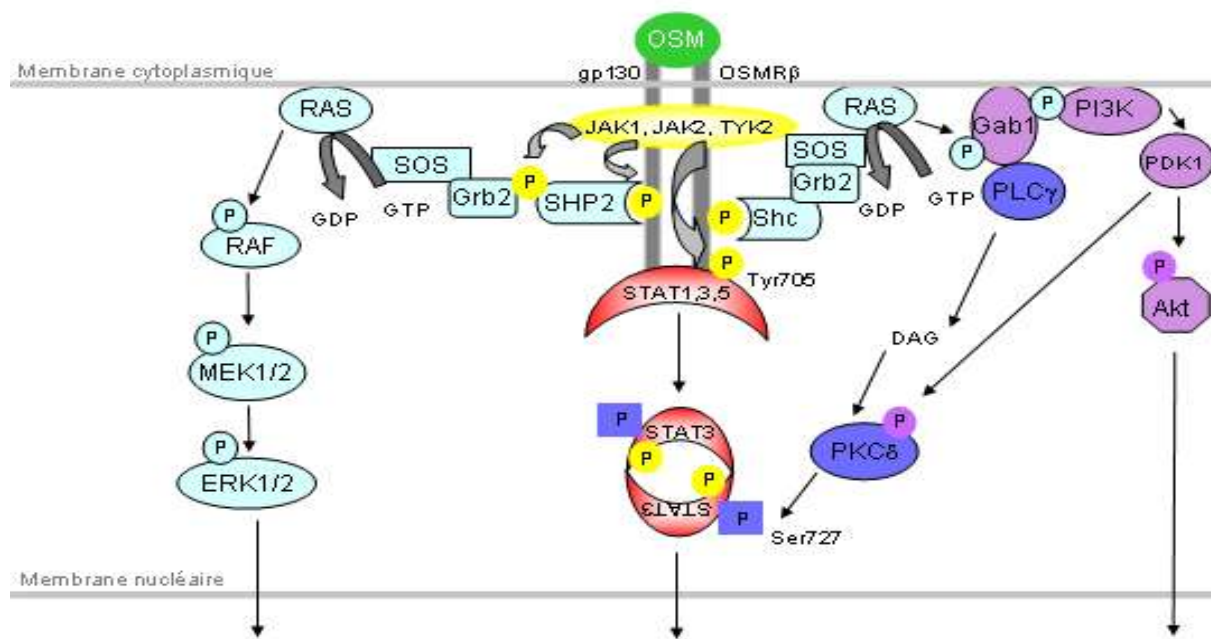


Figure 5: Signalisation de l’OSM et/ou des cytokines de type IL-6

Parmi elles, les “Signal Transducer and Activator of Transcription” (STAT) jouent un rôle central dans la signalisation des cytokines de type IL-6 et cette famille de facteurs de transcription comprend 7 membres: STAT1, 2, 3, 4, 5a, 5b et 6. Dans le cas des cytokines de type IL-6, c’est STAT3 qui est principalement impliqué, suivi de STAT1 et STAT5, qui est spécifiquement associé à la signalisation de l’OSM. Les domaines structuraux des STAT comprennent du N- au C-terminal un domaine d’oligomérisation (“coiled coil domain”), un domaine de liaison à l’ADN, un domaine de liaison (“linker”), un domaine SH2 et un domaine de transactivation (Figure 6).

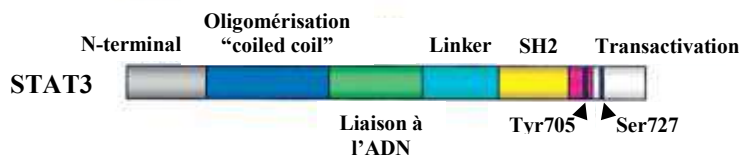


Figure 6: Structure de STAT3, d'après (Heinrich et al. 2003)

Une fois recrutés sur les résidus Tyr des récepteurs, les monomères de STAT3 sont phosphorylés sur la Tyr705 par les JAK et peuvent alors former des homodimères ou hétérodimères de STAT, par reconnaissance mutuelle via leur domaine SH2 des résidus Tyr phosphorylés (Figure 5 et 6). Ces dimères de STAT transitent ensuite dans le noyau par des mécanismes de transport actifs et se lient à leurs séquences d'ADN consensus, les éléments de liaison aux STAT (SBE). Cependant, il semblerait que des complexes préformés de STAT existent avant la stimulation cytokinique (Ndubuisi et al. 1999; Haan et al. 2000), ainsi qu'un échange constant de STAT non phosphorylés entre le cytoplasme et le noyau (Meyer et al. 2002; Zeng et al. 2002). Les cytokines viendraient ainsi renforcer l'interaction entre les monomères de STAT et leur transfert dans le noyau. Dans la lignée de mélanome humain A375 et murin B16, l'utilisation de récepteurs tronqués et de dominants-négatifs de STAT3 a permis de montrer que la phosphorylation de STAT3 sur la Tyr705 est nécessaire pour l'activité anti-proliférative de l'OSM et de l'IL-6 (Kortylewski et al. 1999; Kamaraju et al. 2002). Cette inhibition de la prolifération passe par l'induction de l'inhibiteur de CDK2, la p21^{WAF1/CIP1} ainsi que la stabilisation de l'expression de la p27^{Kip1}, également inhibiteur de CDK2, permettant ainsi un blocage du cycle cellulaire des cellules de mélanome en phase G1 (Florenes et al. 1999; Kortylewski et al. 1999). Il est cependant important de noter que les STAT sont activés constitutivement dans un grand nombre de cancers (Darnell 2002), et en particulier STAT3 dans les mélanomes. En effet, une surexpression ou une activation constitutive des kinases Src, mais aussi une diminution de l'expression des inhibiteurs de la signalisation des cytokines (cf. Paragraphe II, C, 5), sont à l'origine de l'activation constitutive de STAT3 dans les mélanomes (Kortylewski et al. 2005; Homsy et al. 2007; Tokita et al. 2007). Contrairement à l'activité normale anti-proliférative de STAT3, les STAT3 activés constitutivement augmentent la prolifération par une réduction de p21^{WAF1/CIP1}, favorisent la survie par la réduction de p53 et l'induction des molécules anti-apoptotiques

(Bcl-X_L et MCL-1), stimulent l'angiogénèse et la formation de métastases par une induction du VEGF et des MMP-2, et enfin engendrent l'échappement au système immunitaire par une induction de la production de facteurs immunosuppresseurs et une réduction de la production de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires (Kortylewski et al. 2005).

Une autre phosphorylation de STAT3 sur la Sérine (Ser) 727, située dans le domaine de transactivation de STAT3 (Figure 6), est requise pour son activité transcriptionnelle maximale et permet le recrutement sur les gènes cibles de STAT3 de coactivateurs à activité HAT tels que p300 (Heinrich et al. 2003; Schuringa et al. 2001; Lufei et al. 2007; Sun et al. 2006). Un variant transcriptionnel plus court de STAT3 (STAT3 β), codant pour une protéine déletée des 55 acides aminés en C-terminal ne contenant pas la Ser727 mais uniquement la Tyr705, existe également et a une activité transcriptionnelle restreinte voir dominante-négative *in vivo* par rapport à la forme longue de STAT3 (STAT3 α) (Heinrich et al. 1998; Maritano et al. 2004). Ce rôle de la phosphorylation de STAT3 sur la Ser727 a également été observé pour d'autres STAT, notamment pour STAT1 en réponse à l'IFN γ (Zhang et al. 1996; Horvai et al. 1997).

La Protéine Kinase C (PKC) δ , qui est une Sérine/Thréonine (Ser/Thr) kinase, a été montrée comme étant capable de phosphoryler STAT3 sur la Ser727 en réponse aux cytokines de type IL-6 (Jain et al. 1999). Les voies d'activation de cette PKC δ restent peu connues mais certaines études suggèrent que la maturation de la PKC δ est assurée par sa phosphorylation sur la Thr505, présente dans la boucle d'activation de PKC δ , par la "Phosphoinositide-Dependent protein Kinase 1" (PDK1) de la voie des PI3K/Akt (cf. paragraphe II, C, 4) (Figure 5) (Le Good et al. 1998). Cette maturation s'achève par l'autophosphorylation de la PKC δ sur la Ser643 et la Ser662, suivie d'une activation par le Di-acyl-glycérol, qui est produit par la dégradation du Phosphatidyl-inositol-diphosphate (PIP2) par la Phospholipase C γ (PLC γ), elle-même associée à la "Growth-factor-receptor-bound protein Associated Binder 1" (Gab1) (cf. paragraphe II, C, 4) (Figure 5) (Heinrich et al. 2003). De plus, la PKC δ est capable d'augmenter les signaux pro-apoptotiques dans différents types de cancers (Koivunen et al. 2006).

Néanmoins, l'implication de la PKC δ dans la phosphorylation de STAT3 sur la Ser727 et son importance pour l'activité de STAT3 sont inconnues dans le mélanome, bien que PKC δ soit capable d'inhiber la prolifération des mélanomes (La Porta et al. 2002).

3. Signalisation par la voie des MAPK

D'autres protéines contenant un domaine SH2 viennent s'ancrer sur des résidus de Tyr phosphorylés des récepteurs aux cytokines de type IL-6, comme la "SH2-domain-containing tyrosine Phosphatase" (SHP2). L'OSMR β a la capacité unique de fixer une autre protéine à domaine SH2, la "SH2 and Collagen homology domain containing protein" (Shc), qui ne possède pas d'activité Tyr phosphatase (cf. paragraphe II, C, 5) (Hermanns et al. 2000). Une fois phosphorylées par les JAK, SHP2 et Shc servent de molécules adaptatrices pour le complexe "growth-factor-receptor-bound protein/Son of Sevenless" (Grb2/SOS), responsable de l'activation de RAS et de la cascade des MAPK, impliquée dans la croissance cellulaire (Figure 5) (Heinrich et al. 2003). Ainsi, il n'est pas surprenant de trouver souvent des activations constitutives d'ERK1/2, liées à des mutations dans les protooncogènes *B-RAF* et *N-RAS* dans les cellules de mélanome (cf. paragraphe I, A).

4. Signalisation par la voie des PI3K/Akt

L'ancrage de SHP2 et Shc sur les récepteurs aux cytokines de type IL-6 permet le recrutement du complexe Grb2/SOS mais aussi de Grb2 associé à Gab1. L'activation de RAS par SOS entraîne la phosphorylation de Gab1 par RAS sur des résidus Tyr (Hsu et al. 2004; Holgado-Madruga et al. 1996). Ceux-ci sont alors reconnus par la PI3K qui génère du PIP3 à partir de PIP2 et attire ainsi la Ser/Thr kinase Akt (ou Protéine Kinase B (PKB)) à la membrane cytoplasmique, où elle est phosphorylée sur la Thr308 de sa boucle d'activation par PDK1 (Figure 5). Une autre phosphorylation d'Akt sur la Ser473 est également nécessaire à son activation (Heinrich et al. 2003). Les cibles d'Akt sont multiples et leur phosphorylation par Akt résulte d'une manière générale en une stimulation du cycle cellulaire par blocage de l'import nucléaire des inhibiteurs des CDK, p21^{WAF1/CIP1} et p27^{Kip1} (Zhou et al. 2001; Liang et al. 2002; Viglietto et al. 2002); en une inhibition de l'apoptose par induction de la dégradation de p53 (Zhou et al. 2001), par inhibition du facteur de transcription FKHR et du facteur pro-apoptotique Bad (Brunet et al. 1999; Downward 1999); en une stimulation de la synthèse protéique par activation de mTor (Manning et al. 2002). L'activation constitutive d'Akt, liée à des mutations ou délétions de *PTEN*, phosphatase responsable du blocage de la voie PI3K/Akt par réduction du PIP3, ou à une surexpression d'*Akt3*, caractérise 50% des mélanomes (cf. paragraphe I, A) (Robertson 2005).

Néanmoins, l'activation de cette voie des PI3K/Akt par l'OSM et/ou l'IL-6 n'a jamais été étudiée dans les mélanomes.

5. Régulation négative de la signalisation

La signalisation des cytokines de type IL-6 est contrôlée par de multiples mécanismes de blocage des 3 voies de transduction précédemment citées.

Ainsi, des Tyr phosphatases telles que SHP2 sont responsables de l'inactivation des JAK et des STAT mais également de la voie des MAPK et PI3K/Akt par réduction des résidus Tyr phosphorylés sur les récepteurs aux cytokines de type IL-6.

Des suppresseurs de signalisation des cytokines (SOCS) sont induits par les cytokines de type IL-6 et notamment CIS, SOCS 1 et SOCS 3 par l'OSM. Ils agissent négativement sur la signalisation en bloquant l'activité des JAK et en entrant en compétition avec les STAT, SHP2 et Shc, pour la fixation sur les Tyr phosphorylées des récepteurs.

Enfin, des inhibiteurs des STAT activés (PIAS) sont capables de bloquer la liaison à l'ADN des STAT ou d'agir en corépresseurs transcriptionnels des STAT (Heinrich et al. 2003).

D. La résistance à l'Interleukine-6 des cellules de mélanome métastatique *in vitro*

Comme évoqué précédemment (cf. paragraphe II, A), la prolifération des mélanocytes et des lignées cellulaires issues de mélanomes de stades précoces (croissance radiale) est inhibée par l'IL-6 et l'OSM *in vitro*. Cependant, les lignées cellulaires issues des lésions plus avancées ou métastatiques perdent souvent la sensibilité à ces cytokines anti-prolifératives.

Ainsi, dans des cellules de mélanome métastatique, la résistance à l'IL-6 a été montrée comme étant associée à un défaut d'induction par STAT3 de l'inhibiteur des CDK, la p21^{WAF1/CIP1}, vraisemblablement par une répression épigénétique (Florenes et al. 1999). La résistance à l'IL-6 peut être également liée à un défaut de phosphorylation de STAT3 sur la Tyr705, dû soit à l'activation constitutive de JAK1 (Bohm et al. 2001), soit à la surexpression des suppresseurs de signalisation SOCS 1 et SOCS 3 (Li et al. 2004; Komyod et al. 2007).

III. Objectifs de la thèse

L'OSM est la cytokine de type IL-6 la plus efficace pour inhiber la prolifération de lignées cellulaires issues de mélanomes précoces mais les mélanomes métastatiques sont souvent résistants à l'OSM, ce qui suggère un rôle important de cette cytokine dans le contrôle de la progression des mélanomes et de leur échappement au système immunitaire.

Cependant, les mécanismes moléculaires à l'origine de la résistance des cellules de mélanome à l'OSM ont été très peu étudiés.

- Une surexpression des suppresseurs de signalisation (Phosphatases, SOCS ou PIAS) pourrait être responsable de la résistance à l'OSM, ainsi qu'aux autres cytokines, comme ceci a été observé pour la résistance à l'IL-6.
- Une répression épigénétique des cibles de STAT3 pourrait bloquer l'activité anti-proliférative de l'OSM, comme cela a été supposé pour l'IL-6.
- Une perte d'expression des récepteurs à l'OSM (gp130, LIFR α , OSMR β) pourrait empêcher l'OSM d'agir sur les cellules de mélanome.
- L'activation constitutive de STAT3, qui possède alors un fonctionnement pro-tumoral, pourrait gêner l'activité de l'OSM.
- Un défaut d'activation de STAT3, par exemple un défaut de phosphorylation de STAT3 sur la Ser727 par la PKC δ , pourrait bloquer l'activité transcriptionnelle maximale de STAT3.
- Les activations constitutives des voies des MAPK et PI3K/Akt (via les mutations de *B-RAF*, *N-RAS*, *PTEN* et *Akt*) pourraient être responsables de la résistance à l'OSM.
- Enfin, quelles sont les pressions de sélection ou les agents/événements causaux qui agissent sur les cellules de mélanome pour les rendre résistantes à l'OSM?

Ainsi, dans la première partie de ce travail, nous nous sommes proposés de répondre à ces multiples questions, par l'étude des mécanismes moléculaires de la résistance à l'OSM d'un grand nombre de lignées cellulaires issues de ganglions envahis de patients atteints de mélanome de grade III.

Afin de déterminer l'impact de la sensibilité/résistance à l'OSM des cellules de mélanome sur la progression tumorale et l'échappement au système immunitaire, il était important d'évaluer

les effets anti-tumoraux de l'OSM *in vivo* et de voir si cette cytokine pouvait influencer l'issue clinique des patients atteints de mélanome métastatique, comme cela a été observé pour l'IFN γ , le TNF α et l'IL-6.

Nous nous sommes ainsi intéressés dans la deuxième partie de ce travail, à ces aspects de l'activité *in vivo* de l'OSM, en étudiant la corrélation potentielle entre la résistance à l'OSM *in vitro* des lignées de mélanome et la réponse clinique des patients traités par des TIL + IL-2. Parallèlement, afin de renforcer cette hypothèse, nous avons évalué la production d'OSM par les TIL de ces patients et analysé l'effet de l'OSM sur la croissance de lignées sensibles et résistantes injectées à des souris nude.

Cette étude préclinique et clinique rétrospective pourrait mettre en évidence de nouveaux facteurs pronostiques pour les patients atteints de mélanome de grade III traités par des TIL.

Partie 1

Etude des mécanismes de résistance à l'Oncostatine M de lignées cellulaires issues de mélanome métastatique de grade III

I. La résistance à l'Oncostatine M par perte d'expression de son récepteur, l'OSMR β

A. Introduction

Le phénomène de résistance des cellules de mélanome métastatique à l'activité anti-proliférative de multiples cytokines (Bani et al. 1996) n'est pas retrouvé dans toutes les lignées de mélanome. Ainsi, la résistance à l'OSM de lignées de mélanome métastatique ne corrèle pas toujours avec la résistance à l'IL-6 (Lu et al. 1993), ce qui suggère que la résistance à l'OSM peut provenir d'un défaut spécifique au niveau du récepteur ou des voies de signalisation utilisés par l'OSM.

De plus, dans d'autres types de lignées cellulaires issues de tumeurs telles que les cancers du sein, l'expression des récepteurs aux cytokines de type IL-6 (gp130 et LIFR α) peut être augmentée par un traitement de ces cellules avec un inhibiteur des HDAC, le FR901228. Dans ces cellules, le promoteur des gènes de la gp130 et du LIFR α est en effet réprimé par déacétylation des histones alors que leurs îlots CpG ne sont pas méthylés. L'inhibition des HDAC permet ainsi de sensibiliser les cellules de cancer du sein aux cytokines de type IL-6, et notamment à l'OSM qui bloque leur prolifération (Blanchard et al. 2002).

De la même manière, des lignées cellulaires issues d'hépatocarcinomes ont une expression du LIFR α contrôlée par la méthylation du promoteur de son gène, et qui est induite par un traitement avec un inhibiteur des DNMT, la 5-aza-2'-déoxycytidine (Blanchard et al. 2003).

Nous avons donc voulu savoir si les cellules issues de mélanome métastatique présentaient effectivement une résistance spécifique à l'OSM ou au contraire une résistance à de multiples cytokines.

Pour cela, nous avons analysé la réponse aux cytokines de type IL-6 ainsi qu'à l'IFN γ et au TNF α , de 22 lignées cellulaires fraîchement isolées de ganglions envahis de patients atteints de mélanome de grade III. Les mécanismes impliqués dans cette résistance à l'OSM ont ensuite été analysés, notamment pour savoir si ces lignées de mélanome présentaient une expression restreinte ou une perte totale d'expression des chaînes réceptrices utilisées par l'OSM (gp130, OSMR β et LIFR α).

La résistance à l'OSM des cellules de mélanome ne corrèle pas toujours avec la résistance à l'IL-6 et encore moins avec la résistance à l'IFN γ ou au TNF α . Cette résistance à l'OSM est

principalement associée à la répression épigénétique par déacétylation des histones du promoteur de l'*OSMR β* .

B. Article I

“La perte de l’OSMR β dans les lignées de mélanome métastatique”, publié dans le journal *Oncogene*, Août 2006.

L’OSM est une cytokine de type IL-6 qui a été mise en évidence par sa capacité à inhiber la prolifération des cellules de mélanome *in vitro*. Dans cette étude, les mécanismes impliqués dans la résistance à l’inhibition de croissance par l’OSM ont été analysés, pour la première fois sur un grand nombre de lignées cellulaires issues de mélanome métastatique. La résistance à l’OSM ne corrèle pas toujours avec la résistance à l’IL-6, à l’IFN γ ou au TNF α . Cette résistance à l’OSM corrèle avec la perte d’expression de la chaîne réceptrice spécifique de l’OSM, l’OSMR β , en lien avec une faible acétylation des histones au niveau du promoteur de l’OSMR β . Le traitement des cellules de mélanome résistantes à l’OSM avec l’inhibiteur des HDAC, la Trichostatine A, augmente l’acétylation des histones et l’activité du promoteur de l’OSMR β , ainsi que l’expression de son ARN messager et de l’OSMR β à la membrane cellulaire, ce qui permet à l’OSM d’activer STAT3 et d’inhiber la prolifération. D’autres défauts associés à la résistance à l’OSM ont pu être identifiés au niveau de la transcription de l’OSMR β ou de l’expression de sa forme protéique, aussi bien qu’en aval de STAT3 ou sur des voies de transduction complémentaires de STAT3. L’ensemble de ces résultats suggère un rôle de l’OSM dans la prévention de la progression du mélanome et que les cellules de mélanome métastatique pourraient échapper à ce contrôle de la croissance par la répression épigénétique de l’OSMR β .

Loss of Oncostatin M receptor β in metastatic melanoma cells

Aline Lacreusette^{1,2}, Jean-michel Nguyen³, Marie Christine Pandolfino^{1,2}, Amir Khammari⁴,
Brigitte Dreno⁴, Yannick Jacques^{1,2}, Anne Godard^{*1,2,5} and Frédéric Blanchard^{*1,2,6}

¹INSERM, U601, Groupe de Recherche Cytokines et Récepteurs, Institut de Biologie,

²Université de Nantes, UFR Médecine, IFR26, Institut de Biologie, ³PIMESP, ⁴Unit of Skin Cancer, CHU de Nantes, ⁵CHU de Nantes, Nantes, France

Running title: OSM receptor expression in melanoma.

Key Words: Oncostatin M, Interleukin-6, STAT3, histone acetylation, melanoma.

***Correspondence:** Anne Godard or Frédéric Blanchard, INSERM U601, 9 Quai Moncousu, 44035 Nantes cedex 1, France. Phone: 33-2-40-08-47-24, E-mail: agodard@nantes.inserm.fr ; frederic.blanchard@univ-nantes.fr

⁶Present address : INSERM, ERI7, 1 rue Gaston Veil, 44035 Nantes cedex 1, France.

Abstract

Oncostatin M (OSM) is an interleukin-6 (IL-6) type cytokine originally described by its capacity to inhibit melanoma proliferation in vitro. Here, the mechanisms involved in resistance to growth inhibition by OSM were analyzed for the first time on a large panel of metastatic melanoma cell lines. OSM resistance did not strictly correlate with IL-6, Interferon γ or Tumor Necrosis Factor α resistance. Rather, it correlated with a specific loss of the OSM receptor β (OSMR β) subunit, in conjunction with a lower level of histone acetylation in the OSMR β promoter region. Treatment of various OSM-resistant melanoma cells with the histone deacetylase inhibitor Trichostatin A increased activity and histone acetylation of the OSMR β promoter as well as expression of OSMR β mRNA and protein, allowing OSM to activate the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and to inhibit proliferation. Other defects associated with OSM resistance were identified at the level of OSMR β transcription or protein expression, as well as downstream of or parallel to STAT3 activation. Altogether, our results suggest a role for OSM in the prevention of melanoma progression and that metastatic melanoma cells could escape this growth control by the epigenetic silencing of OSMR β .

Introduction

Melanoma is an aggressive malignancy with poor prognosis due to resistance to chemotherapy. While the treatment of primary melanoma essentially relies on surgery, at the stage of lymph node invasion (stage III) an adjuvant treatment with interferon alpha (IFN α) is usually given but has only a modest success rate (Chudnovsky et al. 2005). Therefore, clinical trials have evaluated immunotherapeutic approaches based on (i) vaccination where melanoma or dendritic cells are modified to express HLA or tumor antigens, costimulatory molecules or cytokines, and (ii) adoptive therapy using tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) (Nawrocki et al. 2000; Yannelli et al. 2004). These clinical trials gave encouraging results but numerous patients did not respond because of potent tumor escape from immune recognition (Yannelli et al. 2004).

A large number of cytokines have proven to be effective in restricting melanoma progression *in vivo*, such as IL-2, IL-12, IFN α and γ , TNF α family members, and IL-6 family members (Nawrocki et al. 2000; Yannelli et al. 2004; Mule et al. 1990; Ozbek et al. 2001). Tumor rejection and prevention of metastasis were also demonstrated in mice sarcoma models with systemic IL-6 administration (Mule et al. 1990). Similarly, transfer of the IL-6 and IL-6 receptor α gene into melanoma cells led to a lower rate of tumor growth in mice and enhanced survival (Ozbek et al. 2001; Nawrocki et al. 2000). *In vitro*, melanocytes and early stage (radial growth phase) melanoma cell lines are inhibited in their growth by IFN α and γ , TNF α and IL-6-type cytokines, whereas cell lines from advanced stage lesions are often resistant to these cytokines, suggesting an acquired “multicytokine resistance” during melanoma progression (Bani et al. 1996; Lu et al. 1993).

Oncostatin M (OSM) is an IL-6-type cytokine, produced mainly by activated monocytes and lymphocytes, and first identified by its capacity to inhibit melanoma cell growth *in vitro* (Zarling et al. 1986). OSM is now considered as a multi-functional cytokine

implicated in the activation, proliferation and/or differentiation of several cell types, such as hepatocytes, osteoblasts or lung epithelial cells (Tanaka et al. 2003; Grant et al. 1999). OSM is more active than IL-6 in inhibiting the proliferation of numerous solid tumor cell lines derived from breast or lung cancer, hepatoma, osteosarcoma or melanoma (Grant et al. 1999). However, relatively few studies have focused on the anti-tumor effects of OSM, and the mechanisms regulating such activities are only poorly understood.

All IL-6-type cytokines share the signal transducing receptor subunit gp130 and receptor specificity is provided by additional receptor chains: IL-6R α for IL-6 and OSMR β for OSM (Tanaka et al. 2003; Heinrich et al. 2003). OSM is most closely related to another IL-6-type cytokine, Leukemia Inhibitory Factor (LIF), and both cytokines can transduce a signal via the LIF receptor composed of gp130 and LIFR α . Once recruited, these receptor complexes allow activation of Janus protein tyrosine kinases (Jak), and subsequently STAT transcription factors (mainly STAT3) and MAPK (mainly ERK 1/2) (Tanaka et al. 2003; Heinrich et al. 2003; Klausen et al. 2000). In melanoma or other solid tumors, the key role of STAT3 in mediating the growth inhibitory effect of IL-6 or OSM has been demonstrated (Kortylewski et al. 1999), whereas activation of ERK 1/2 could counterbalance that of STAT3 by inducing mitogenic signals (Kim et al. 1999).

In metastatic melanoma, IL-6 resistance seems to be largely a consequence of an altered STAT signaling or STAT-induced gene transcription. Thus in various IL-6 resistant melanoma cell lines, IL-6 is still able to activate its receptor as well as STAT3, but it fails to induce the cyclin-dependent kinase inhibitor p21^{WAF1}, a STAT3 gene target implicated in growth inhibition by IL-6 (Florenes et al. 1999). One study showed that melanoma cells derived from advanced-stage lesions are often resistant to growth inhibition by OSM and that OSM resistance does not always correlate with IL-6-resistance (Lu et al. 1993), suggesting a defect in an OSM-specific pathway. We previously showed that responsiveness to IL-6-type

cytokines can be increased by histone deacetylase (HDAC) or DNA methyltransferase inhibitors (Blanchard et al. 2002; Blanchard et al. 2003). Indeed, these inhibitors can induce expression of several epigenetically silenced tumor suppressor genes, resulting in cell cycle arrest and differentiation (Jaenisch et al. 2003; Blanchard et al. 2005). Our data indicated that the promoters for gp130 or LIFR α can be epigenetically silenced in normal or transformed cells, concomitant with a defect in receptor expression and STAT signaling (Blanchard et al. 2002; Blanchard et al. 2003).

Here we analyzed 22 metastatic melanoma cell lines for growth inhibition by IFN γ , TNF α and IL-6 family members. Resistance to OSM was not always associated with resistance to IL-6, IFN γ or TNF α . Rather, it correlated with a loss of OSMR β expression, associated with histone deacetylation in the OSMR β gene promoter region.

Results

OSM resistance does not strictly correlate with resistance to other cytokines

In a first attempt to describe the responsiveness of melanomas to growth-inhibitory cytokines, we analyzed the proliferation of metastatic melanoma cell lines obtained from the lymph nodes of 22 patients (stage III) who were enrolled in a previously described phase II/III randomized clinical trial (Labarriere et al. 2002; Dreno et al. 2002). The WM-266-4 metastatic cell line was used as a positive control. Preliminary experiments indicated that a maximum growth inhibition was obtained with 50 ng/ml OSM for 3 days on WM-266-4 and M140 cells (IC50 values of 1 ng/ml; data not shown). Therefore, these conditions were selected for further analyses. As shown in figure 1A and table 1, OSM appeared to be a potent growth inhibitor, with 15 cell lines (65%) being inhibited by more than 15 % (range 18 to 92%) and 8 cell lines (35%) being resistant to OSM (less than 15% inhibition, not statistically

significant). In contrast, our analysis on primary melanoma cells (7 cell lines) indicated that they were all sensitive to growth inhibition by OSM (Heymann et al. 1995).

OSM was about two fold more active than IL-6 in reducing thymidine incorporation by metastatic melanoma cells (table 1), and growth inhibition by OSM was significantly correlated with growth inhibition by IL-6 ($p < 0.001$). However, 2/8 cell lines (M134 and M170) were resistant to OSM but not to IL-6 (fig 1A) and conversely, some cell lines were resistant to IL-6 (less than 15% inhibition) but not to OSM (see the M197 or M203 cell lines in table 1). LIF never showed any effect on the growth of these cells (data not shown). Growth inhibition by IFN γ or TNF α did not correlate with that observed after OSM treatment (fig1A and table 1). In fact, all OSM-resistant cell lines were growth-inhibited by either IFN γ or TNF α or both. Therefore, the mechanisms involved in OSM resistance appeared specific, suggesting defects in its receptor or signaling pathways.

OSM resistance is associated with the loss of OSMR β and STAT3 signaling

Melanoma cell lines were then analyzed for the early phosphorylation / activation of STAT3 and ERK 1/2 induced by short term treatment with IL-6-type cytokines (fig 1B, C, D and table 1). STAT3 and ERK 1/2 were expressed in all cell lines tested (fig1B and data not shown). Activation of STAT3 and ERK 1/2 by OSM was always stronger than by IL-6 or LIF (see the M140 cell line in Fig1B as a representative example). Growth inhibition by OSM or IL-6 was always associated with a corresponding activation of STAT3 (table 1). In sharp contrast, OSM resistance was almost always associated with a loss of STAT3 activation by OSM (in 7 out of 8 cell lines; see the M128 and M170 cell lines in Fig1B as representative examples), whereas IL-6 resistance was associated with a loss of STAT3 activation by IL-6 in half of the cell lines (6 on 12). Therefore, these results suggested that in 7 out of 8 cases, OSM resistance was associated with a defect occurring upstream of STAT3. For the M183

cell line, resistance to OSM was presumably associated with defects occurring downstream of or parallel to STAT3.

A high basal level of ERK 1/2 activation could be detected in 54 % of the cell lines (see the M170, M128 and M200 cell lines in fig1B and D as representative examples). In agreement with previous reports (Chudnovsky et al. 2005), this modification correlated well with an activating mutation in B-Raf (table 1 and data not shown, $p=0.02$), an upstream activator of the MEK/ERK pathway. This constitutively high level of phosphorylated ERK 1/2 did not allow for further activation by IL-6-type cytokines and was observed in either OSM-resistant (M170 and M128 cells in Fig1B) or sensitive cell lines (see the M200 cell line which is B-Raf-mutated but OSM-sensitive; fig1D and table 1).

Because defects in OSM-resistant cell lines could be present at the receptor level, we next analyzed the relative mRNA expression levels for various IL-6-type receptor subunits by quantitative RT-PCR. Individual expression levels are shown in additional figure1A, B and the mean expression levels by cytokine-sensitive or resistant cell lines are shown in figure2A and B. A major observation was the strongly reduced expression of OSMR β mRNA in OSM-resistant cell lines (39 folds, $p<10^{-4}$). The correlation between OSMR β mRNA expression and growth inhibition by OSM was categorical (cut-off 15% of growth inhibition) and not linear (additional table 1A). This defect appeared specific since gp130 transcripts were expressed at similar levels, regardless of whether the cell lines were resistant or sensitive to OSM or IL-6. Only one OSM-resistant cell line (M120) expressed OSMR β mRNA at a level close to the M140 reference cell line (relative expression 0.9). OSM-resistant cell lines also expressed a lower amount of LIFR α mRNA (9.4 fold reduction) but this was not significant ($p=0.07$). In fact, 5 out of 14 OSM-sensitive cell lines did not express detectable LIFR α mRNA (additional fig1A), indicating that the LIFR α subunit was not necessarily used by OSM to

mediate growth inhibitory signals. In IL-6-resistant cell lines, the mean IL-6R α mRNA expression was slightly decreased (1.9 folds) albeit not significantly ($p=0.17$).

In order to assess whether OSMR β mRNA expression by cultured cell lines reflected the *in vivo* situation, immunohistochemical analyzes of OSMR β were performed in biopsies from primary melanomas and corresponding invaded lymph nodes from which the cell lines were established. We observed that the expression of OSMR β by tumor cells in lymph nodes was lost in a 5 out of 14 cases (additional table 2 and see also fig2C: M117 corresponding to an OSMR β^{high} and M170 corresponding to an OSMR β^{low} cell line). These cases all corresponded to OSMR β -defective cell lines (additional table 2). In contrast, the 4 primary melanoma biopsies tested expressed OSMR β similarly (additional table 2), suggesting that OSMR β mRNA expression in melanoma cell lines correlated well with OSMR β protein expression in lymph node biopsies, but not in primary tumors.

The OSMR β promoter is silenced by histone deacetylation in OSM resistant cells

Thus far our results suggested that a defect in OSMR β expression was the major molecular event leading to OSM resistance in stage III melanoma cell lines. Because we previously showed that gp130 and LIFR α expression can be regulated by epigenetic mechanisms in various cells (Blanchard et al. 2002; Blanchard et al. 2003), we asked whether the OSMR β gene could be similarly controlled in melanoma.

To address this issue, we first cloned and characterized the human OSMR β promoter (Fig3). This promoter was found to be immediately 5' of the human OSMR β cDNA (Mosley et al. 1996), and to contain a CpG island and a potential transcription start site (fig3A and B). Indeed, the -693 to +229 segment (hOSMR β Pro2), designed to contain the majority of the CpG island (fig3A), was active in transfection experiments when inserted upstream of the

luciferase gene (fig3A and C). In comparison to OSM-sensitive cell lines with a high level of OSMR β mRNA (M140, M200 and M117), activity of this promoter was lower in 3 out of 4 OSMR β^{low} cell lines that could be efficiently transfected (M128, M102 and M170, fig3C). Moreover, trichostatin A (TSA), a broad HDAC inhibitor, induced promoter activity in these OSM-resistant cells, although this activity remained low in M170 cells. In M210 OSM-resistant cells, activity of the OSMR β promoter was as high as in OSM-sensitive cells and TSA did not induce this activity (fig3C). We also tested a longer promoter construct (-1229 to +229; hOSMR β Pro1) containing 536 additional bases preceding the CpG island (fig3A). This segment was inactive in all cell lines tested (fig3A and data not shown), suggesting the presence of inhibitory elements upstream of the CpG island, the precise location and function of which are currently unknown.

In the 6 OSM-resistant cell lines that expressed a low level of OSMR β mRNA, chromatin immunoprecipitations demonstrated a low level of acetylated histone H3 and H4 associated with the promoter region of OSMR β (fig4A top panel). In comparison to 3 OSM-sensitive cell lines with high levels of OSMR β mRNA, the levels of acetylated histone H3 and H4 were reduced 2.4 and 3.5 fold respectively. Importantly, TSA induced OSMR β -associated acetylation of histones in 5 out of 6 OSMR β^{low} cell lines to a level comparable to or even higher than in the OSMR β^{high} cells (fig4A). In correlation with the increased histone acetylation and promoter activity, TSA also induced OSMR β mRNA expression in 4 out of 6 OSMR β^{low} cell lines, although this level remained low in the case of the M196 cell line (fig4A bottom panel). In the OSMR β^{high} cell lines, TSA did not significantly modify the level of histone acetylation, in correlation with a stable expression of OSMR β mRNA (fig4A). In the M128 cell line treated with TSA, the appearance of the OSMR β protein at the cell surface was observed at a level comparable to that observed in the WM266.4 cell line used as a

positive control (fig4B). TSA also increased gp130 cell surface expression in M128 cells 2 fold (fig4B). Altogether, these results indicated that HDACs were implicated in the repression of the OSMR β gene in various OSM-resistant cells.

The functionality of OSM receptors induced by TSA treatment was next evaluated by STAT3 activation and by growth inhibition. In 4 OSM resistant cell lines (M102, M128, M196 and M134), TSA treatment restored a prominent phosphorylation of STAT3 (fig5A). In 3 of them, TSA also restored growth inhibition by OSM, though this was observed at a high TSA concentration in the case of M196 cells (fig5B). This growth inhibition by OSM was observed despite or in addition to the growth inhibition observed after TSA treatment (data not shown). In TSA-treated M196 cells, we also observed activation of STAT3 by LIF (fig5A), in correlation with an increased expression of LIFR α mRNA (data not shown). In contrast to its effect on OSM or LIF responses, TSA reduced STAT3 activation by IL-6 in the M128 and M170 cell lines (fig5A). This differential effect of TSA on cytokine responses was further supported by the observation that among the 13 melanoma cell lines treated with TSA, 7 showed an increased OSMR β mRNA expression, 6 an increased LIFR α , 3 an increased gp130 and 4 a decreased IL-6R α mRNA expression (data not shown). By western blot, no modification in STAT3 protein expression were ever observed after TSA treatment (data not shown), suggesting that modification of cytokine responsiveness by TSA was largely due to increased or decreased receptor expression.

OSM responsiveness can be regulated by additional mechanisms

The results obtained with some OSM-resistant cell lines revealed additional regulatory mechanisms that did not necessarily depend on histone deacetylation of the OSMR β gene.

Indeed, the M210 OSMR β^{low} cell line was not sensitive to TSA treatment in terms of increased OSMR β promoter activity (fig 3C), histone acetylation, OSMR β expression (fig 4A)

or STAT3 activation (data not shown). The whole OSMR β gene was not deleted in these cells because PCR amplification of the OSMR β promoter region gave positive results (fig 4A). Therefore, silencing of the OSMR β gene was more likely the result of other genetic and/or epigenetic mechanisms resistant to TSA treatment.

A second case is the M170 cell line that responded well to the TSA treatment by an increase of histone acetylation (fig 4A). However, OSMR β promoter activity remained low (fig 3C), expression of OSMR β mRNA remained unchanged (fig 4A), and there was neither activation of STAT3 (fig 5A) nor growth suppression by OSM (data not shown). Therefore, in addition to a TSA-sensitive OSMR β gene silencing, a specific defect in OSMR β gene transcription was detected in these cells.

The behavior of the M134 cell line was surprising because TSA treatment increased histone acetylation, OSMR β mRNA expression (fig 4A) and OSM-mediated STAT3 activation (fig 5A) but did not allow any growth inhibition by OSM (fig 5B). These results indicated that in addition to the OSMR β defect, there was a defect downstream of or parallel to STAT3 in the M134 cell line.

M120 cells expressed OSMR β mRNA at a relatively high level (0.9 relative to the M140 cells) but no corresponding OSMR β protein at the cell surface (fig4B) or by immunochemistry (additional table 2) and were therefore resistant in terms of STAT3 activation or growth inhibition by OSM (fig 5C and table 1). After TSA treatment, we observed an induced activation of STAT3 by OSM and LIF (fig 5Ca) but without growth inhibition (data not shown), and neutralizing antibodies against the LIFR α totally prevented STAT3 activation by OSM or LIF (fig 5Ca). These results strongly suggested that TSA allowed the recruitment of the gp130-LIFR α complex by OSM, despite the fact that we could not detect the LIFR α by RT-PCR in these cells, even after TSA treatment. In an attempt to

force the cell surface expression of OSMR β , we stably transfected the OSMR β cDNA in these cells. OSMR β mRNA and cell surface protein were increased in OSMR β -transfected M120 cells (data not shown), allowing STAT3 activation by OSM but not by LIF (fig 5Cb). However OSM was again unable to inhibit the growth of the OSMR β over-expressing cells (fig 5Cc). Together, these results suggested the presence of two defects in M120 cells: one at the post-transcriptional level for OSMR β expression and another downstream of or parallel to STAT3 activation.

Discussion

In this study we provide evidence that OSM is an important regulator of melanoma growth. This cytokine is very active in inhibiting melanoma cell proliferation, by a mechanism which presumably depends on the successful recruitment and activation of the OSMR β /gp130 complex and subsequently of STAT3. OSM appears more active than IL-6 in reducing melanoma growth *in vitro*, while LIF is totally inactive.

The key role of OSM in melanoma growth was confirmed by the high percentage (35%) of metastatic cell lines that were resistant to OSM-mediated growth inhibition with a concomitant decrease in OSMR β mRNA expression (29%) and STAT3 activation (30%). Similarly, melanoma-invaded lymph node biopsies corresponding to the OSMR β^{low} cell lines revealed a lower expression of OSMR β . In contrast, all the primary melanoma cell lines tested so far were sensitive to OSM and high expression of OSMR β was found in primary melanoma biopsies, suggesting that melanoma progression toward a metastatic state is accompanied by silencing of the OSMR β gene. These results indicate that specific mechanisms target the OSMR β receptor and not the pathways used by other growth inhibitory cytokines such as IL-6, IFN γ or TNF α . They also help to explain why the phenotype of “multicytokine resistance” was not observed in our studies.

In previous studies conducted in numerous normal or transformed cells, such as hepatoma cells, gp130 or OSMR β down-regulations were rarely observed, in contrast to the LIFR α gene which was frequently epigenetically silenced (Blanchard et al. 2002; Blanchard et al. 2003). In stage III melanoma, both LIFR α and OSMR β were found frequently down-regulated but only the OSMR β recruitment correlated with OSM-mediated growth inhibition. TSA treatment re-induced OSMR β promoter acetylation (in 5/8 resistant cell lines) and mRNA levels (in 4/8 resistant cell lines), resulting in the recovery of OSM sensitivity. Thus, we identified epigenetic modifications in the OSMR β promoter, e.g. histone deacetylation, as a major regulatory mechanism responsible for OSMR β silencing and OSM-resistance. The OSMR β promoter structure thus appears similar to the one already described for the gp130 and LIFR α genes (Blanchard *et al.*, 2002). The LIFR α and OSMR β genes are located within 500 kbp on chromosome 5 (in 5p13), suggesting a common ancestral gene, whereas the gp130 gene is located near them in 5q11. Their TATA-less promoter regions are all composed of a CpG island associated with differential histone acetylation sensitive to HDAC inhibition (Blanchard et al. 2002; Blanchard et al. 2003). However the OSMR β promoter is the only one to be negatively regulated by a region immediately upstream of the CpG island. It remains to be determined which molecular events induce the epigenetic loss of LIFR α and / or OSMR β in some tumors like melanoma or hepatoma. This loss could be related to enhanced expression of tissue-specific HDACs and/or associated regulatory factors (Blanchard et al. 2005).

Analysis of IFN or IL-6 resistance in melanoma revealed major defects at the level of STAT activation or downstream at the level of induction of gene transcription (Pansky et al. 2000; Wong et al. 1997; Florenes et al. 1999; Bohm et al. 2001). Our results confirm that IL-6 resistance is often independent of IL-6R α loss, and 50% of these resistant cell lines can still activate STAT3 in response to IL-6. Interestingly IL-6R α expression and STAT3 activation

by IL-6 were usually decreased by TSA (fig5A). In fact, among the genes that can be regulated by HDAC inhibitors (2-9% of the genome), equal fractions are activated or repressed (Blanchard et al. 2005; Chambers et al. 2003). Inhibition of gene expression by TSA is prominent for pro-inflammatory mediators such as $\text{TNF}\alpha$, IL-6, IL-12 or nitric oxide, and implies inhibition of the transcription factor NF- κ B (Blanchard et al. 2005). It is therefore tempting to speculate that both IL-6 and IL-6R α are mainly controlled by NF- κ B and thus inhibited by TSA, whereas LIFR α , OSMR β and possibly gp130 are mostly sensitive to inhibition by HDACs and are thus activated by TSA.

In addition to the major HDAC-dependent loss of OSMR β , additional mechanisms are also implicated in OSM resistance. Indeed, we detected abnormalities in several stages of OSMR β production and activation, such as TSA-resistant gene silencing (M210 cell line), transcriptional inactivation (M170 cell line), inefficient protein expression (M120 cell line) and defects downstream of or parallel to STAT3 (M183 cell line). The inefficient OSMR β protein expression in M120 cells could rely on Jaks deficiency or low availability as described previously (Radtke et al. 2002). Other defects such as point mutations in the OSMR β gene could also alter its expression in certain melanomas. To our knowledge, there is no report describing mutation in this gene and only one study described mutations in the LIFR α gene that alter mRNA stability, resulting in the absence of the LIFR α protein and in the impairment of STAT3 activation by LIF (Dagoneau et al. 2004). Additional experiments are needed to discriminate between these possibilities.

Defects downstream of STAT3 are presumably at the level of key cell cycle regulatory proteins. We observed that OSM treatment of sensitive melanomas effectively blocks the cells in the G1 phase of the cell cycle, but there was no induction of either p21^{WAF1} or p27^{KIP1} (data not shown) as described elsewhere (Klausen et al. 2000; Kortylewski et al. 1999; Florenes et al. 1999; Chipoy et al. 2004). Therefore, a more global analysis of gene expression is

necessary to identify the genes implicated in OSM-mediated growth inhibition and potentially deregulated in certain resistant melanoma cells. Additionally, STAT3 has been described to be acetylated and its transcriptional activity is inhibited by HDACs (Yuan et al. 2005). Therefore, it is possible that HDACs inhibit OSM signaling not only by reducing OSMR β transcription but also by preventing expression of STAT3 target genes. Defects parallel to STAT3 could rely on other OSM-activated signal transduction pathways such as STAT1, STAT5, ERK 1/2, AKT, p38MAPK, JNK or PKC δ (Tanaka et al. 2003; Grant et al. 1999; Heinrich et al. 2003; Boing et al. 2006; Chipoy et al. 2004). Despite the large incidence and the key role of activating mutations in B-Raf upstream of ERK 1/2 in the etiology of melanoma (Chudnovsky et al. 2005), these modifications do not prevent growth inhibition by OSM.

Accumulating evidences have shown that constitutively active STAT3 contributes to the development of various cancers, including melanoma, by inducing tumor cell survival, proliferation, angiogenesis, metastasis and immune evasion (Bromberg et al. 2000; Niu et al. 2002; Kortylewski et al. 2005). Because STAT3 was not found constitutively active in our panel of melanoma cell lines, it can be anticipated that the mode of STAT3 activation, e.g. transient activation following OSM treatment or prolonged stimulation resulting in constitutively active STAT3, will dictate the outcome on tumor progression. Alternatively, the contradictory effects of STAT3 on tumor growth could depend on other co-stimulated cellular factors that determine the target genes of STAT3. Understanding of this important phenomenon is certainly crucial in the course of cancer treatment and prognosis.

In conclusion, our results suggest that OSM is an important factor in the control of melanoma growth. Silencing and loss of OSMR β are major events associated with OSM resistance in metastatic melanoma and they could lead to a growth advantage during particular inflammatory stages or anti-cancer immune reactions. HDAC inhibitors have been used in

phase I-II clinical trials for the treatment of various hematological or solid malignancies such as melanoma (Marks et al. 2004; Sandor et al. 2002). They have shown anti-tumor activities against melanoma *in vitro* and *in vivo* and represent a promising therapeutic approach for patients with malignant melanoma (Boyle et al. 2005; Yoshida et al. 2001). Their capacity to restore OSMR β expression and growth inhibition by OSM could help to restrain the progression of this aggressive malignancy.

Materials and methods

Cell lines and reagents

Metastatic melanoma cell lines were established from tumor-invaded lymph node fragments as previously described (Gervois et al. 1990; Labarriere et al. 2002; Dreno et al. 2002). Melanoma cell lines were established before injection of autologous TILs plus IL-2 or IL-2 only. The metastatic melanoma WM-266-4 cell line was purchased from the American Type Culture Collection (LGC Promochem, Molsheim, France). All cells were maintained in RPMI 1640 or DMEM (Sigma, Lyon, France) supplemented with 10% FCS and 2mM L-glutamine. All recombinant human cytokines were from R&D Systems (Lille, France). TSA was from Calbiochem (La Jolla, CA, USA).

Cell proliferation assay

The anti-proliferative activity of OSM (50ng/ml), IL-6 (50ng/ml), LIF (100ng/ml), IFN γ (50ng/ml) and TNF α (50ng/ml) was measured by [3 H]-thymidine incorporation after 3 days of treatment as described previously (Blanchard et al. 2002; Heymann et al. 1995). For sensitization of resistant cells to OSM, increasing doses of TSA were incubated with OSM (50ng/ml) and [3 H]-thymidine incorporation was measured after 48 h of treatment.

Western blotting

After 4 h of serum deprivation and 15 minutes of cytokine stimulation, control or 24 h TSA-pretreated cell monolayers were lysed in RIPA buffer. For the blockade of LIFR α , cells were pre-incubated with neutralizing anti-LIFR α antibodies (Blanchard et al. 1997) for 90 min before cytokine stimulation. Equal amounts of protein lysates were separated on 10% SDS-

polyacrylamide gels and transferred to PVDF membranes (Immobilon-P, Millipore, Bedford, MA). Western blotting was done using antibodies against phospho-STAT3 (Tyr705), phospho-ERK 1/2 (Thr202/Tyr204) (Cell signaling, Beverly, MA), STAT3 (BD Bioscience, Le Pont de Claix, France) or ERK 1/2 (Cell signaling). Digital densitometry of the patterns was analyzed with the NIH Image software. To enable the quantitative comparison of cytokine responsiveness among cell lines, an OSM-treated WM266.4 cell lysate was used as an internal reference (100% level).

Real-time quantitative reverse transcription-PCR

Total RNA was extracted from control or 24 h TSA-treated cells by Trizol reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Retrotranscription was performed using 2 µg of RNA, random hexamers and SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen). Relative quantification of *OSMRβ*, *gp130*, *LIFRα* and *IL-6Rα* expression was carried out using Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix (Stratagene Europe, Amsterdam, The Netherlands) with exon-exon junction-spanning primers (additional table 1) and an Mx4000 multiplex quantitative PCR instrument (Stratagene). Average threshold cycle (C_T) values from duplicate PCR reactions were normalized to average C_T values for 3 housekeeping genes (*β-actin*, *β-2-microglobulin* and *RPLPO*) from the same cDNA preparations. The stability of these housekeeping genes was approved by the BestKeeper software (Pfaffl et al. 2004). Thus, the relative expression ratio of a target gene was calculated based on the PCR efficiency (E) and the C_T deviation between a given cell line (x) and a reference cell line (calibrator), expressed in comparison to the geometric mean of the housekeeping genes (Pfaffl 2001):

$$\text{ratio} = (E_{\text{target}})^{\Delta C_{T \text{ target (calibrator-x)}}} / \text{geo mean} ((E_{\text{housekeeping}})^{\Delta C_{T \text{ housekeeping (calibrator-x)}}}).$$

Several RNA extracts were independently analyzed and reproducibility was confirmed with a correlation coefficient $r = 0.99$.

The V600E mutation in B-Raf was detected as described previously (Jarry et al. 2004).

Cloning of the human OSMR β cDNA and promoter

The hOSMR β cDNA, cloned into the pDC409 vector (a kind gift from Dr. H. Baumann, RPCI, Buffalo, USA), was subcloned into the *EcoRV* and *NotI* sites of the pcDNA3.1/Hygro (+) vector (Invitrogen).

The 5' flanking sequence of the hOSMR β cDNA ([NM_003999](#)) was obtained using the BLAT alignment tool from UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>). Putative transcription start site was predicted using the Human Core-promoter Finder (<http://rulai.cshl.org/>), whereas transcription factor binding sites were predicted using the MatInspector of Genomatix (<http://www.genomatix.de/>). Two overlapping segments were amplified by PCR using genomic DNA from the M88 melanoma cell line. These segments contained the nucleotides from position -1229 to +229 (hOSMR β Pro1) and -693 to +229 (hOSMR β Pro2), relative to the transcription start site. They were then cloned into the pCR-Blunt II-TOPO vector (Invitrogen) and subcloned into the *KpnI* and *XhoI* sites of the luciferase reporter plasmid pGL3-Basic (Promega, Charbonnieres, France). All constructs were confirmed by sequence analysis.

Luciferase reporter assay

Melanoma cell lines were transiently transfected using FuGENE6 (Roche Diagnostics, Meylan France) or LipofectAMINE (Invitrogen) with empty or hOSMR β promoter-driven pGL3-Basic which encodes Firefly luciferase as a reporter, together with a 50:1 ratio of Renilla luciferase vector (pRL-CMV; Promega) as an internal control. Luciferase activity was measured 48 hours following transfection and 24 h after TSA treatment of OSMR β^{low} cells, with the Dual-Luciferase kit (Promega) and a single-sample luminometer (Berthold

Technologies, Bad Wildbad, Germany). Whenever possible, each transfection was reproduced 3 times and human OSMR β promoter activity was calculated as a ratio to Renilla luciferase activity.

Quantitative chromatin immunoprecipitation assay

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) analysis was performed according to a modified protocol of Upstate Biotechnology (Dundee, UK) and essentially as described previously (Blanchard et al. 2002). Control or 24 h TSA-treated melanoma cell lines were fixed, lysed and sonicated to shear DNA. After 1h of preclearing with 50 μ L of protein G-sepharose (Invitrogen), samples were incubated overnight at 4°C with 5 μ g of anti-acetylated histone H3, anti-acetylated histone H4 (Upstate Biotechnology) or irrelevant rabbit IgG (Sigma) and 2 μ g of salmon sperm DNA (Sigma). Immune complexes were recovered with 100 μ L of salmon sperm DNA-saturated protein G-sepharose. After elution and purification, the ChIP-captured DNA was then screened for hOSMR β promoter fragments by real-time PCR analysis using specific primers (Sense 5'-TTGAAGATTGGATGGCATT-3' and antisense 5'-AAAACGTGTTTGAACCGAA-3') located in the hOSMR β Pro2 segment described above. Serial dilutions of input DNA generated a standard curve used to determine the relative amount of precipitated DNA. Duplicates for both standards and the samples were simultaneously amplified and at least two independent immunoprecipitations were analyzed.

Flow cytometric analysis

Expression of receptor subunits at the cell surface was monitored using an anti-human gp130 antibody (B-R3, mouse IgG2a, Diaclone Research, Besançon, France) or an anti-human OSMR β antibody (P1, rabbit serum, Amgen Inc., Thousand Oaks, USA) with mouse IgG (BD

Biosciences) or rabbit pre-immune serum as isotype controls respectively. These primary antibodies were revealed by anti-mouse-phycoerythrin (PE) and anti-rabbit-Alexa488 respectively. Cell-associated fluorescence was acquired by a FACScalibur fluorocytometer (BD Biosciences) and analyzed using CellQuest software.

Immunohistochemistry

Five μm sections of formalin-fixed, paraffin-embedded primary melanoma biopsies or frozen melanoma-invaded lymph nodes were incubated for 30 minutes with a goat anti-human OSMR β antibody (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) diluted 1/25 in PBS-BSA 0.1% or with diluent alone as a negative control. The rinsed sections were then incubated for a further 30 minutes with a 1/200 dilution of biotinylated rabbit anti-goat antibody (DakoCytomation, Trappes, France). Immunostaining for OSMR β was revealed using streptavidine-HRP and diaminobenzidine (DakoCytomation), and nuclei were counterstained with hematoxylin. All sections were examined by 3 investigators, one of whom (B.D.) was blinded to the molecular and clinical data.

Statistical analyses

Data are expressed as means $\pm$ SD and frequencies. Continuous data were compared using the Wilcoxon test. Categorical data were compared using the Fisher exact test. Correlations between continuous data were accessed using the Spearman rank test. A value of $p < 0.05$ was considered as significant.

Acknowledgements

We thank Dr. M. Denis (Inserm U539, Nantes, France) for performing the B-Raf mutation analysis. This work was supported by Association pour la Recherche sur le Cancer (F. Blanchard), the Ligue contre le Cancer and the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale.

Supplementary information is available at Oncogene website

(<http://www.nature.com/onc>).

References

- Bani MR, Rak J, Adachi D, Wiltshire R, Trent JM, Kerbel RS *et al.* (1996). Multiple features of advanced melanoma recapitulated in tumorigenic variants of early stage (radial growth phase) human melanoma cell lines: evidence for a dominant phenotype. *Cancer Res* **56**: 3075-3086.
- Blanchard F, Chipoy C. (2005). Histone deacetylase inhibitors: new drugs for the treatment of inflammatory diseases? *Drug Discov Today* **10**: 197-204.
- Blanchard F, Kinzie E, Wang Y, Duplomb L, Godard A, Held WA *et al.* (2002). FR901228, an inhibitor of histone deacetylases, increases the cellular responsiveness to IL-6 type cytokines by enhancing the expression of receptor proteins. *Oncogene* **21**: 6264-6277.
- Blanchard F, Pitard V, Taupin JL, Raher S, Hallet MM, Moreau JF *et al.* (1997). Epitope-function relationships of human leukemia inhibitory factor receptors using a novel set of anti-gp190 mAB. *Int Immunol* **9**: 1775-1784.
- Blanchard F, Tracy E, Smith J, Chattopadhyay S, Wang Y, Held WA *et al.* (2003). DNA methylation controls the responsiveness of hepatoma cells to leukemia inhibitory factor. *Hepatology* **38**: 1516-1528.
- Bohm M, Schulte U, Funk JO, Raghunath M, Behrmann I, Kortylewski M *et al.* (2001). Interleukin-6-resistant melanoma cells exhibit reduced activation of STAT3 and lack of inhibition of cyclin E-associated kinase activity. *J Invest Dermatol* **117**: 132-140.
- Boing I, Stross C, Radtke S, Lippok BE, Heinrich PC, Hermanns HM. (2006). Oncostatin M-induced activation of stress-activated MAP kinases depends on tyrosine 861 in the OSM receptor and requires Jak1 but not Src kinases. *Cell Signal* **18**: 50-61.
- Boyle GM, Martyn AC, Parsons PG. (2005). Histone deacetylase inhibitors and malignant melanoma. *Pigment Cell Res* **18**: 160-166.

- Bromberg J, Darnell JE, Jr. (2000). The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* **19**: 2468-2473.
- Chambers AE, Banerjee S, Chaplin T, Dunne J, Debernardi S, Joel SP *et al.* (2003). Histone acetylation-mediated regulation of genes in leukaemic cells. *Eur J Cancer* **39**: 1165-1175.
- Chipoy C, Berreur M, Couillaud S, Pradal G, Vallette F, Colombeix C *et al.* (2004). Downregulation of osteoblast markers and induction of the glial fibrillary acidic protein by oncostatin M in osteosarcoma cells require PKCdelta and STAT3. *J Bone Miner Res* **19**: 1850-1861.
- Chudnovsky Y, Khavari PA, Adams AE. (2005). Melanoma genetics and the development of rational therapeutics. *J Clin Invest* **115**: 813-824.
- Dagoneau N, Scheffer D, Huber C, Al-Gazali LI, Di Rocco M, Godard A *et al.* (2004). Null leukemia inhibitory factor receptor (LIFR) mutations in Stuve-Wiedemann/Schwartz-Jampel type 2 syndrome. *Am J Hum Genet* **74**: 298-305.
- Dreno B, Nguyen JM, Khammari A, Pandolfino MC, Tessier MH, Bercegeay S *et al.* (2002). Randomized trial of adoptive transfer of melanoma tumor-infiltrating lymphocytes as adjuvant therapy for stage III melanoma. *Cancer Immunol Immunother* **51**: 539-546.
- Florenes VA, Lu C, Bhattacharya N, Rak J, Sheehan C, Slingerland JM *et al.* (1999). Interleukin-6 dependent induction of the cyclin dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 is lost during progression of human malignant melanoma. *Oncogene* **18**: 1023-1032.
- Gervois N, Heuze F, Diez E, Jotereau F. (1990). Selective expansion of a specific anti-tumor CD8+ cytotoxic T lymphocyte clone in the bulk culture of tumor-infiltrating lymphocytes from a melanoma patient: cytotoxic activity and T cell receptor gene rearrangements. *Eur J Immunol* **20**: 825-831.

- Grant SL, Begley CG. (1999). The oncostatin M signalling pathway: reversing the neoplastic phenotype? *Mol Med Today* **5**: 406-412.
- Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* **374**: 1-20.
- Heymann D, Blanchard F, Raher S, De Groote D, Godard A. (1995). Modulation of LIF expression in human melanoma cells by oncostatin M. *Immunol Lett* **46**: 245-251.
- Jaenisch R, Bird A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* **33 Suppl**: 245-254.
- Jarry A, Masson D, Cassagnau E, Parois S, Laboisie C, Denis MG. (2004). Real-time allele-specific amplification for sensitive detection of the BRAF mutation V600E. *Mol Cell Probes* **18**: 349-352.
- Kim H, Baumann H. (1999). Dual signaling role of the protein tyrosine phosphatase SHP-2 in regulating expression of acute-phase plasma proteins by interleukin-6 cytokine receptors in hepatic cells. *Mol Cell Biol* **19**: 5326-5338.
- Klausen P, Pedersen L, Jurlander J, Baumann H. (2000). Oncostatin M and interleukin 6 inhibit cell cycle progression by prevention of p27kip1 degradation in HepG2 cells. *Oncogene* **19**: 3675-3683.
- Kortylewski M, Heinrich PC, Mackiewicz A, Schniertshauer U, Klingmuller U, Nakajima K *et al.* (1999). Interleukin-6 and oncostatin M-induced growth inhibition of human A375 melanoma cells is STAT-dependent and involves upregulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27/Kip1. *Oncogene* **18**: 3742-3753.
- Kortylewski M, Jove R, Yu H. (2005). Targeting STAT3 affects melanoma on multiple fronts. *Cancer Metastasis Rev* **24**: 315-327.

- Labarriere N, Pandolfino MC, Gervois N, Khammari A, Tessier MH, Dreno B *et al.* (2002). Therapeutic efficacy of melanoma-reactive TIL injected in stage III melanoma patients. *Cancer Immunol Immunother* **51**: 532-538.
- Lu C, Rak JW, Kobayashi H, Kerbel RS. (1993). Increased resistance to oncostatin M-induced growth inhibition of human melanoma cell lines derived from advanced-stage lesions. *Cancer Res* **53**: 2708-2711.
- Marks PA, Richon VM, Miller T, Kelly WK. (2004). Histone deacetylase inhibitors. *Adv Cancer Res* **91**: 137-168.
- Mosley B, De Imus C, Friend D, Boiani N, Thoma B, Park LS *et al.* (1996). Dual oncostatin M (OSM) receptors. Cloning and characterization of an alternative signaling subunit conferring OSM-specific receptor activation. *J Biol Chem* **271**: 32635-32643.
- Mule JJ, McIntosh JK, Jablons DM, Rosenberg SA. (1990). Antitumor activity of recombinant interleukin 6 in mice. *J Exp Med* **171**: 629-636.
- Nawrocki S, Murawa P, Malicki J, Kapcinska M, Gryska K, Izycki D *et al.* (2000). Genetically modified tumour vaccines (GMTV) in melanoma clinical trials. *Immunol Lett* **74**: 81-86.
- Niu G, Bowman T, Huang M, Shivers S, Reintgen D, Daud A *et al.* (2002). Roles of activated Src and Stat3 signaling in melanoma tumor cell growth. *Oncogene* **21**: 7001-7010.
- Ozbek S, Peters M, Breuhahn K, Mann A, Blessing M, Fischer M *et al.* (2001). The designer cytokine hyper-IL-6 mediates growth inhibition and GM-CSF-dependent rejection of B16 melanoma cells. *Oncogene* **20**: 972-979.
- Pansky A, Hildebrand P, Fasler-Kan E, Baselgia L, Ketterer S, Beglinger C *et al.* (2000). Defective Jak-STAT signal transduction pathway in melanoma cells resistant to growth inhibition by interferon-alpha. *Int J Cancer* **85**: 720-725.

- Pfaffl MW. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**: e45.
- Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* **26**: 509-515.
- Radtke S, Hermanns HM, Haan C, Schmitz-Van De Leur H, Gascan H, Heinrich PC *et al.* (2002). Novel role of Janus kinase 1 in the regulation of oncostatin M receptor surface expression. *J Biol Chem* **277**: 11297-11305.
- Sandor V, Bakke S, Robey RW, Kang MH, Blagosklonny MV, Bender J *et al.* (2002). Phase I trial of the histone deacetylase inhibitor, depsipeptide (FR901228, NSC 630176), in patients with refractory neoplasms. *Clin Cancer Res* **8**: 718-728.
- Tanaka M, Miyajima A. (2003). Oncostatin M, a multifunctional cytokine. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **149**: 39-52.
- Wong LH, Krauer KG, Hatzinisiriou I, Estcourt MJ, Hersey P, Tam ND *et al.* (1997). Interferon-resistant human melanoma cells are deficient in ISGF3 components, STAT1, STAT2, and p48-ISGF3gamma. *J Biol Chem* **272**: 28779-28785.
- Yannelli JR, Wroblewski JM. (2004). On the road to a tumor cell vaccine: 20 years of cellular immunotherapy. *Vaccine* **23**: 97-113.
- Yoshida M, Furumai R, Nishiyama M, Komatsu Y, Nishino N, Horinouchi S. (2001). Histone deacetylase as a new target for cancer chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol* **48 Suppl 1**: S20-26.
- Yuan ZL, Guan YJ, Chatterjee D, Chin YE. (2005). Stat3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue. *Science* **307**: 269-273.

Zarling JM, Shoyab M, Marquardt H, Hanson MB, Lioubin MN, Todaro GJ. (1986).

Oncostatin M: a growth regulator produced by differentiated histiocytic lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 9739-9743.

Figure legends

Figure1: Cytokine-resistance of metastatic melanoma cell lines.

(A) The anti-proliferative activity of OSM and IL-6 (top panel) or IFN γ and TNF α (bottom panel) at 50ng/ml each, was measured by [3 H]-thymidine incorporation. Four OSM-resistant cell lines are presented in comparison to the M140 sensitive cell line. Data are the means $\pm$ SD of triplicate cultures and are representative of three independent experiments.

(B) and (D) The phosphorylation of STAT3 and ERK1/2 in response to OSM, IL-6 (50ng/ml each) and LIF (100ng/ml) was analyzed by western blotting in the M140 and M200 sensitive cell line versus two OSM-resistant cell lines (M170, M128). Equal protein loading was monitored by total STAT3 and ERK evaluation in the samples. Cytokine responsiveness among cell lines was quantitatively compared by the use of the internal reference OSM-treated WM266.4 cell line (WM).

(C) Digital densitometry of the patterns in (B) was expressed as a percentage of OSM-treated WM266.4.

Figure 2: OSM-resistance correlates with the loss of OSMR β expression.

The relative mRNA expression levels were evaluated by quantitative RT-PCR for gp130, OSMR β and LIFR α in OSM-sensitive versus -resistant cell lines (A) and for gp130 and IL-6R α in IL-6-sensitive versus -resistant cell lines (B). See material and methods for the detailed description of quantification. Data for each receptor subunit are the means $\pm$ SD.

* $p < 10^{-4}$.

(C) Primary melanoma biopsies (a,b) or melanoma-invaded lymph nodes (c,d) were subjected to immunohistochemical staining for OSMR β . Nuclei were counterstained with hematoxylin. Original magnification, $\times 20$.

Figure 3: Identification and activity of the human OSMR β promoter.

(A) Schematic map of the 5' flanking region of hOSMR β cDNA (square Exon 1), showing the CpG island localization and putative transcription start site (arrow). The hOSMR β promoter segments (Pro1 and 2) were cloned upstream of the luciferase gene and their activity was measured in the OSM-sensitive M140 cell line. Data are the means $\pm$ SD of three transfection experiments and are expressed as fold increase over pGL3-Basic activity.

(B) The partial nucleotide sequence of the CpG island is presented with potential transcription factor binding sites and the putative transcription start site (arrow). The known cDNA is underlined.

(C) Activity of the hOSMR β Pro2 promoter was measured by Luciferase assay in the indicated OSM-sensitive (OSMR β^{high}) and OSM-resistant (OSMR β^{low}) cell lines pretreated or not with 500nM TSA.

Figure 4: The OSMR β promoter is silenced by histone deacetylation in OSM-resistant cell lines.

(A, top panel) The specific association of acetylated histone H3 and H4 on the hOSMR β promoter was evaluated by quantitative chromatin immunoprecipitation. Various OSM-sensitive (OSMR β^{high}) and OSM-resistant (OSMR β^{low}) cell lines, pretreated or not with 500nM TSA, were compared with the input DNA as an internal reference. Data are the means $\pm$ SD of at least two experiments.

(A, bottom panel) The relative OSMR β mRNA expression levels were evaluated by quantitative RT-PCR in the same cell lines. Data are expressed relative to the OSMR β mRNA expression level in the M140 cell line. ND: not determined.

(B) Gp130 and OSMR β cell surface expression was determined on melanoma cells by flow cytometry. The OSM-sensitive WM266.4 cell line served as a positive control, the M120 and M128 cell lines are resistant to OSM and the M128 cell line is an example of re-induction of OSM receptor subunits by 500nM TSA treatment (24 h). Values shown as insets correspond to the mean of fluorescence intensity ratios between the anti-gp130 or OSMR β and the control antibodies.

Figure 5: TSA treatment of OSM-resistant melanoma cell lines increases their response to OSM.

(A) The phosphorylation of STAT3 in response to OSM, IL-6 (50ng/ml each) and LIF (100ng/ml) was analyzed by western blotting in OSM-sensitive (M140) or -resistant cell lines pretreated or not with 500nM TSA. Cytokine responsiveness among cell lines was compared by the use of the internal reference OSM-treated WM-266-4 cell line (WM).

(B) The anti-proliferative activity of OSM at 50ng/ml with increasing doses of TSA was measured by [3 H]-thymidine incorporation in the same resistant cell lines. Data are the means $\pm$ SD of triplicate cultures, are representative of three independent experiments and are expressed as percentage of OSM-untreated cells (TSA alone). *p<0.05.

(Ca) The TSA-induced phosphorylation of STAT3 in response to OSM or LIF was analyzed by western blotting in the M120 cell line in the presence or absence of blocking anti-LIFR α antibodies. (Cb) The phosphorylation of STAT3 in response to OSM, IL-6 and LIF was analyzed by western blotting in M120 cells stably transfected with empty or hOSMR β expression vector. (Cc) The effect of OSM, IL-6 and LIF on proliferation of OSMR β over-

expressing M120 cells was measured by [^3H]-thymidine incorporation. Data are the means $\pm$ SD of triplicate cultures and are expressed as percentage of untreated cells.

Table 1. Sensitivity of melanoma cell lines to anti-proliferative cytokines

<i>Melanoma cell lines</i>	<i>Growth inhibition (%)¹</i>				<i>STAT3 phosphorylation²</i>		<i>V600E mutated B-Raf³</i>
<i>OSM-sensitive cell lines</i>							
WM266.4	92 ±1	37 ±1	43 ±6	62 ±3	++	++	+
M200	89 ±1	42 ±5	78 ±1	78 ±2	++	++	+
M140	86 ±1	40 ±2	-2 ±2	32 ±4	++	++	-
M197	67 ±2	12 ±2	66 ±3	-56 ±2	++	-	+
M88	62 ±2	47 ±1	9 ±4	7 ±6	++	++	+
M182	62 ±2	60 ±4	64 ±3	96 ±1	+	+	-
M147	60 ±3	37 ±3	58 ±4	-6 ±1	++	+	+
M136	56 ±6	20 ±13	56 ±7	29 ±4	++	++	+
M110	54 ±1	45 ±2	38 ±6	2 ±1	++	++	ND
M203	39 ±5	15 ±7	47 ±2	74 ±1	+	-	+
M187	36 ±2	6 ±9	49 ±2	71 ±4	++	+	+
M117	32 ±2	19 ±2	3 ±4	-13 ±6	++	+	-
M153	19 ±2	8 ±4	59 ±3	13 ±6	+	+	-
M119	18 ±5	10 ±8	74 ±2	32 ±4	++	+	+
M138	18 ±5	0 ±4	6 ±3	-40 ±2	++	+	+
<i>OSM-resistant cell lines</i>							
M134	8 ±7	37 ±5	53 ±5	19 ±7	-	++	-
M102	8 ±5	10 ±8	56 ±2	89 ±1	-	-	+
M210	5 ±5	0 ±5	25 ±1	5 ±3	-	-	+
M196	3 ±8	8 ±7	31 ±13	47 ±7	-	-	+
M170	2 ±3	30 ±1	-3 ±7	13 ±1	-	+	+
M120	1 ±6	-6 ±8	52 ±5	12 ±2	-	++	-
M128	0 ±3	9 ±1	26 ±5	78 ±2	-	++	-
M183	-22 ±6	-18 ±18	58 ±2	7 ±14	++	-	ND

¹ Cells were treated for 3 days with the indicated cytokine and cell growth was determined by [³H] thymidine incorporation. Growth inhibition values (to control untreated cultures, means ± SD) are representative of three independent experiments. A threshold of 15% was used to discriminate between OSM-sensitive and resistant cell lines.

² Cells were treated for 15 min with cytokines. STAT3 Tyr705 phosphorylation was determined by western blotting and quantified by densitometry using the OSM-treated WM266.4 cell line as the 100% internal reference: - (≤5%), + (5 to 50%) and ++ (≥50%).

³ V600E mutation within *B-Raf* was detected by RT-PCR, ND: not determined.

Figure 1.
A

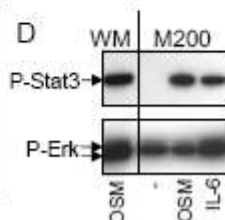
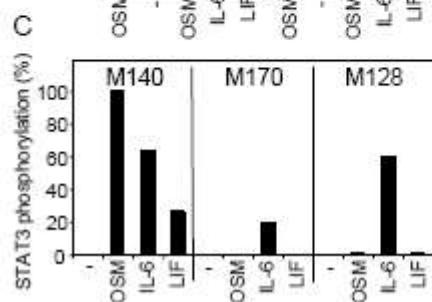
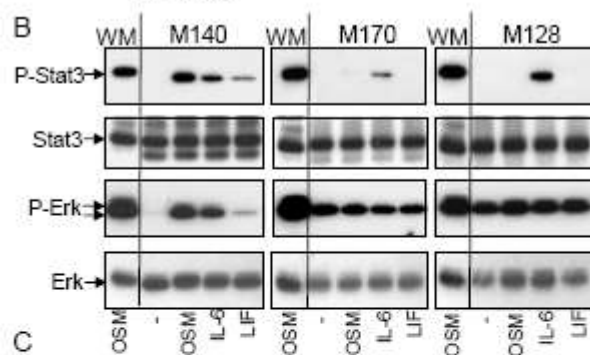
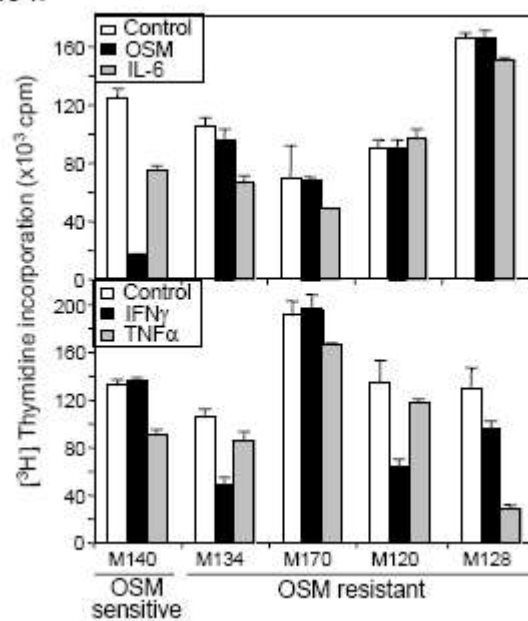


Figure 2.

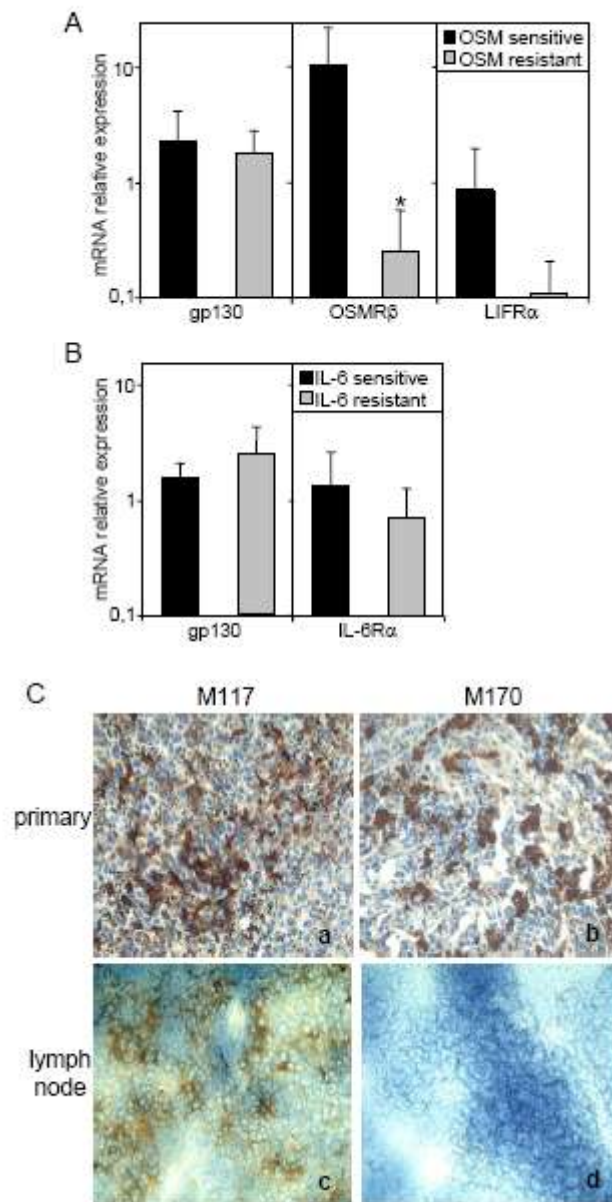
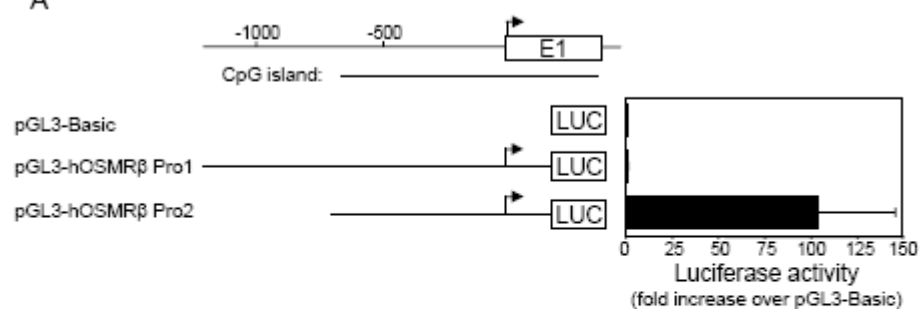


Figure 3.
A



B

-453 GAAGATTTTCGGACGGGGAT CTCACGGGTTTGGCCTCTGG GTTGGGATGACAAGTGCCCC TGTGGGATACACAGCCCCAG
 -373 GCGTCATCGGTCACCTCGGCT TACCTCTGGTTCCGCCGGCT GGCCCGTGCCTCTTGGCCG GGGCAGGAGCAGCGCTGCGC
 -293 GCGGGGCACGGAGCCTCGGC CGCCGAGTTTTCGGTTTCCA AGTTTCTTCCAGGCTCTT CCGACTTCTCTTCTCACC
 -213 GTGCCCCGCCCGCCGCAAG TCCGGGTTGTGAGGCTGCGC CTCGCCAGGATCGCGGCCG CCTCCCCCGGGACTGAAGG
 -133 GAGGGGATTCCTGTGGGTCC CAGGAGTGCCAAGAGTGCGC AGCAAGACGGGAAATTGCAA AAGACCTCACCCTCTGCCC
 -53 TCCCCCGGGGTTTCCAGTA ACTCCCGCCCTCCGGGCTT GCGCCGACGCTGATTCATAG CCGCGGCCCGGGCCGCTCT
 SBE SP1 SP1 C/EBF β cDNA

C

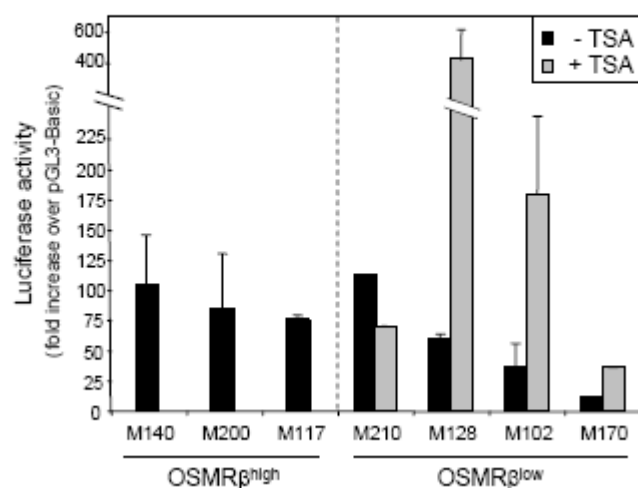


Figure 4.
A

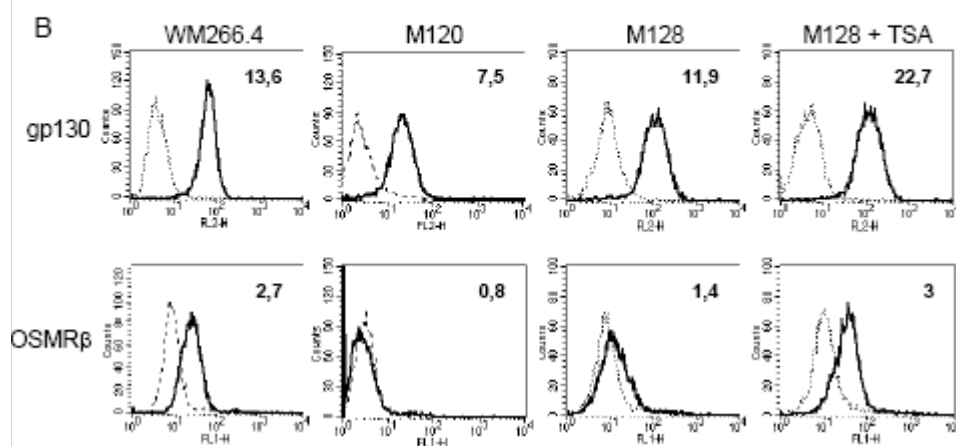
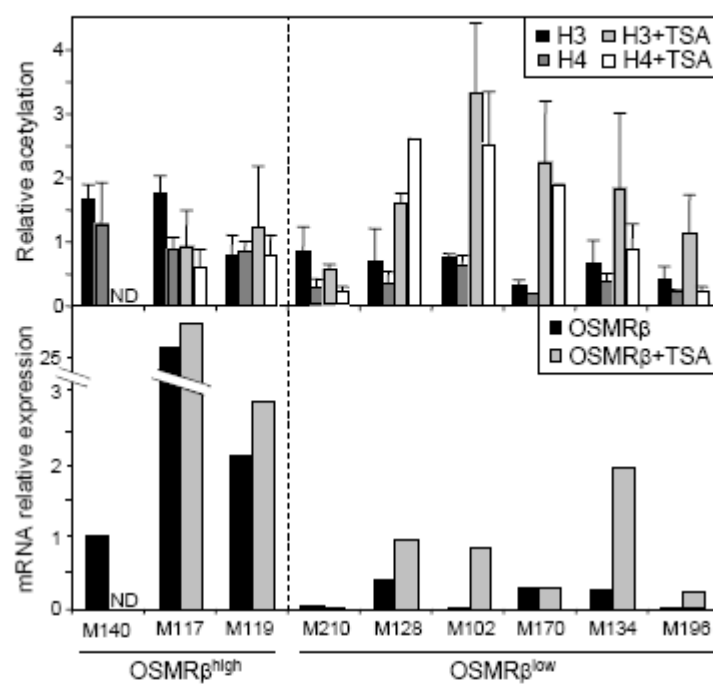
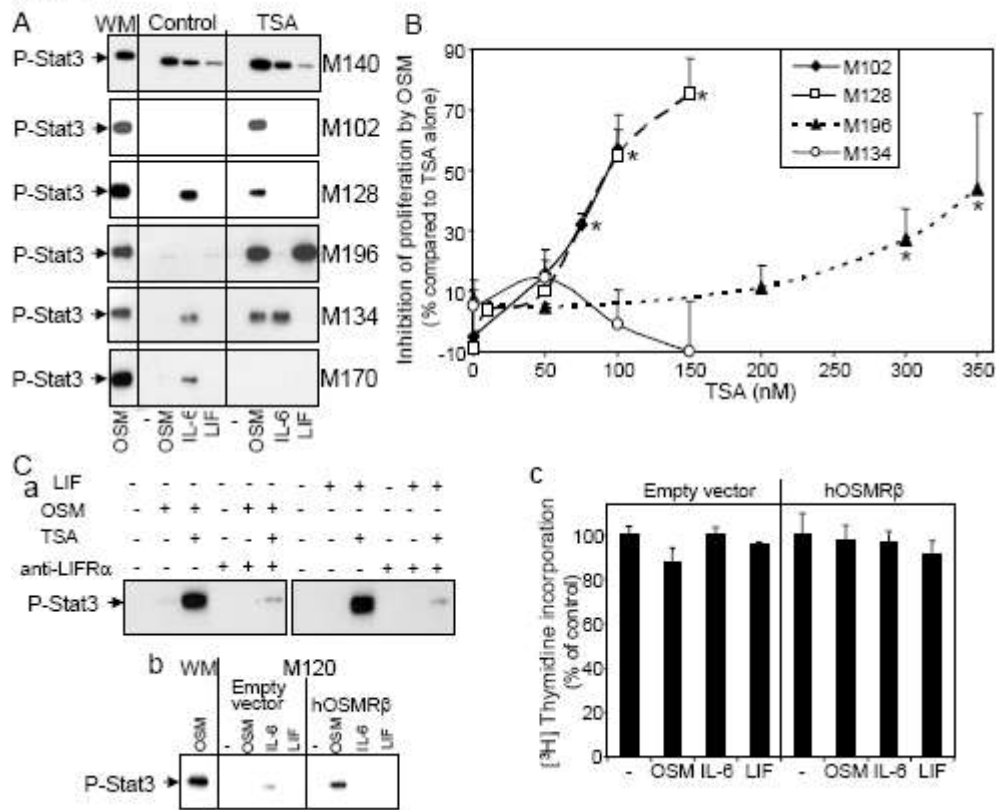
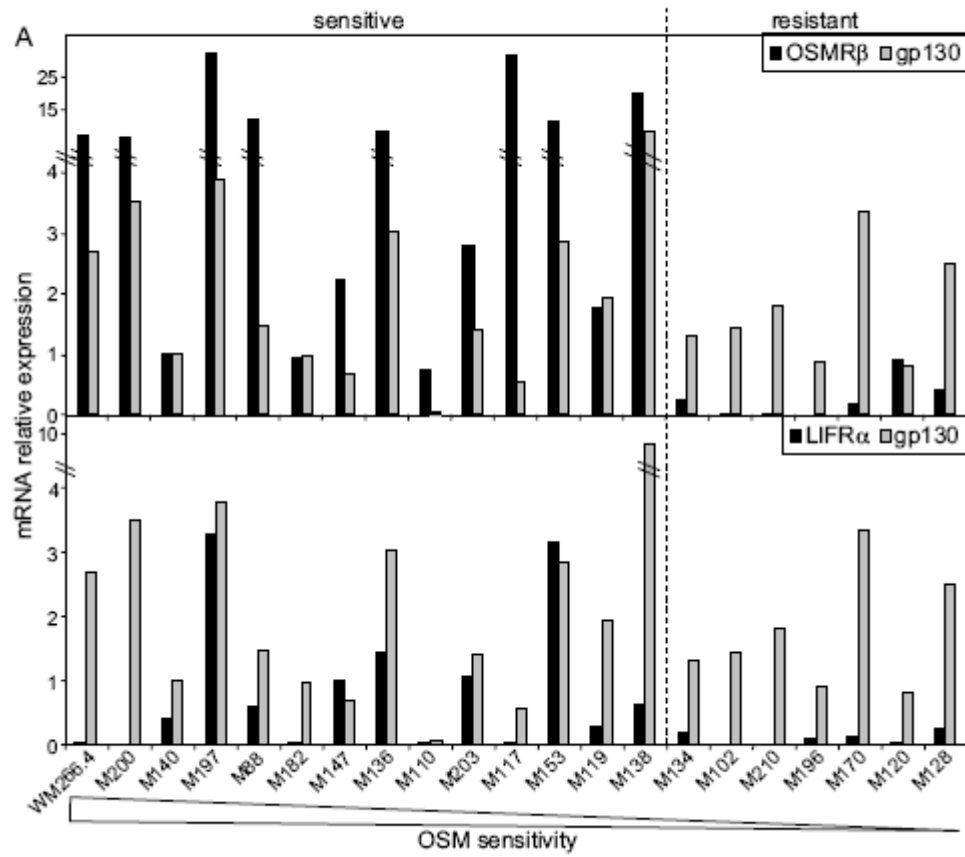


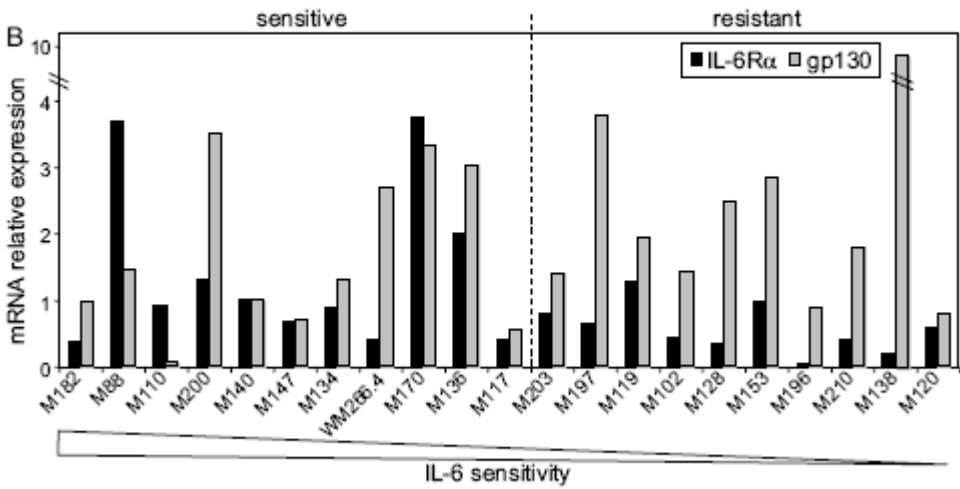
Figure 5.



Additionalnal fig.1A



Additionalnal fig.1B



Additional Table 1. Primers used for quantitative RT-PCR

Gene		Primer sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)
<i>β-actin</i>	Forward	CGGGACCTGACTGACTACCTC	282
	Reverse	TTCGTGGATGCCACAGGA	
<i>β-2-microglobulin</i>	Forward	TTCACCCCCACTGAAAAAGATGA	120
	Reverse	GGCATCTTCAAACCTCCATGATG	
<i>RPLP0</i>	Forward	GTGATGTGCAGCTGATCAAGACT	101
	Reverse	GATGACCAGCCCCAAAGGAGA	
<i>gp130</i>	Forward	AACTCGTGTGGAAGACATTGC	524
	Reverse	TCCTTTGGAAGGTGGAGCTTG	
<i>OSMRβ</i>	Forward	ACTGCCTTGGGGTGGTCTAA	270
	Reverse	GGTCATGATGGCATTGTGG	
<i>LIFRα</i>	Forward	GCCTCAGATATGCCCTTGGA	279
	Reverse	TGCAACATTTTCCCCATCAA	
<i>IL-6Rα</i>	Forward	CACTGCCACATTCCTGGTT	254
	Reverse	TCGGTTGTGGCTCGAGGTAT	

Additional Table 2. Immunohistochemical staining for OSMR β in primary and invaded lymph node melanoma biopsies

Melanoma cell lines	OSMR β mRNA expression ¹	Immunohistochemical staining for OSMR β ²	
		Primary melanoma	Melanoma-invaded lymph node
OSM-sensitive cell lines			
M197	33.2		+
M88	11.9	+	+
M182	0.9		+
M147	2.2		+
M110	0.7		+
M203	2.8		+
M117	30.7	+	+
OSM-resistant cell lines			
M134	0.2	+	-
M210	0		-
M196	0		-
M170	0.2	+	-
M120	0.9		-
M128	0.4		+
M183			+

¹ The relative OSMR β mRNA expression was evaluated by quantitative RT-PCR. See materials and methods for the detailed description of quantification. Empty case: not determined.

² Expression of OSMR β protein in indicated biopsies was evaluated by immunohistochemistry. -: no signal. Empty cases: not determined.

C. Complément de discussion à l'article I

Dans cette étude, nous avons pu mettre en évidence (i) que l'OSM est effectivement la cytokine de type IL-6 la plus efficace pour inhiber la prolifération des lignées de mélanome et (ii) que les mécanismes moléculaires à l'origine de la résistance des cellules de mélanome à l'OSM impliquent souvent la perte de l'OSMR β . L'analyse de 22 lignées cellulaires fraîchement isolées et issues de ganglions envahis de patients atteints de mélanome de grade III, nous a permis de montrer que 32% des lignées ont perdu l'expression de l'OSMR β et sont ainsi résistantes à l'activité anti-proliférative de l'OSM. Ce mécanisme de résistance est donc bien spécifique à l'OSM et va dans le même sens que l'étude portant sur des lignées issues de stades avancés de mélanomes, qui montre que la résistance à l'OSM ne corrèle pas toujours avec la résistance à l'IL-6 (Lu et al. 1993). Cependant pour un certain nombre de lignées étudiées ici, la résistance à l'OSM corrèle significativement avec celle à l'IL-6, ce qui suggère que des défauts communs aux deux cytokines peuvent être également à l'origine de la résistance des cellules de mélanome et s'ajoutent à la perte de l'OSMR β . Par contre, nous n'avons pas observé de co-résistance avec l'IFN γ ou le TNF α , ce qui va à l'encontre d'une autre étude qui souligne le phénomène de résistance à de multiples cytokines dans la lignée de mélanome précoce WM35 ayant subi une mutagenèse par insertion rétrovirale afin de sélectionner des mutants aux caractéristiques de mélanome métastatique (Bani et al. 1996).

La résistance à l'IL-6 que nous observons dans nos lignées de mélanome est associée pour la moitié d'entre elles à un défaut de phosphorylation de STAT3 mais n'est pas liée significativement à une perte de l'expression de l'IL-6R α . Cette résistance peut donc être causée par une activation constitutive des JAK ou une surexpression des SOCS qui bloqueraient la phosphorylation de STAT3, comme cela a déjà été montré (Bohm et al. 2001; Li et al. 2004; Komyod et al. 2007). Pour l'autre moitié des lignées résistantes à l'IL-6, qui ne présentent pas de défaut d'activation de STAT3, cette résistance peut s'expliquer par d'autres défauts de transduction du signal sur des voies complémentaires à STAT3 ou par une répression épigénétique des cibles de STAT3, comme ceci a pu être supposé (Florenes et al. 1999). La résistance à l'IFN γ que nous observons dans nos lignées de mélanome pourrait être associée à des défauts d'expression de STAT1 ou STAT2, comme cela a été observé précédemment (Wong et al. 1997; Pansky et al. 2000). Cette résistance peut également être générée par une surexpression du suppresseur de signalisation CIS (Wellbrock et al. 2005) ou une répression épigénétique de la cible de l'IFN γ , le "Interferon-Regulatory Factor-1" (IRF-1)

(Rodriguez et al. 2007). La résistance au TNF α de nos lignées de mélanome pourrait être corrélée aux défauts des voies intrinsèques (mitochondriale) et extrinsèques (récepteurs de mort cellulaire dont le TNF-R) qui caractérisent les cellules de mélanome (cf. paragraphe I, C) (Gray-Schopfer et al. 2007; Soengas et al. 2003; Ivanov et al. 2003). Ainsi, les mécanismes de résistance des cellules de mélanome peuvent être spécifiques à chaque cytokine.

Pour la résistance à l'OSM, la perte d'expression de l'*OSMR β* qui s'est produite dans 7 lignées de mélanome a été également observée sur les biopsies ganglionnaires d'où proviennent ces lignées, et ce défaut d'expression de l'*OSMR β* a plusieurs causes.

En effet, pour 6 lignées, l'ARN messager de l'*OSMR β* est exprimé à un niveau beaucoup plus faible par rapport aux lignées sensibles à l'OSM. Cette diminution de l'ARN messager de l'*OSMR β* correspond à une répression épigénétique du promoteur de l'*OSMR β* , dépendante des HDAC pour 5 lignées (M128, M102, M170, M134 et M196) et vraisemblablement dépendante d'une méthylation de l'ADN ou d'une mutation génétique pour la lignée M210. L'activité du promoteur de l'*OSMR β* est en effet aussi importante dans cette lignée M210 que dans les lignées sensibles à l'OSM. Le traitement de cette lignée M210 à la Trichostatine A (TSA), un inhibiteur des HDAC de classe I et II à activité large, n'induit d'ailleurs ni l'acétylation des histones H3 et H4, ni la réexpression de l'ARN messager de l'*OSMR β* . Ainsi, la répression épigénétique par les HDAC du promoteur de l'*OSMR β* est le mécanisme de résistance à l'OSM majeur développé par les cellules de mélanome métastatique. Il est important de noter que ces régulations épigénétiques des récepteurs aux cytokines de type IL-6 ont déjà été observées dans des lignées de cancer du sein ou de cancer colique, où l'expression de la gp130 et LIFR α peut être augmentée par un traitement avec un inhibiteur des HDAC (Blanchard et al. 2002). De la même manière, des lignées cellulaires issues d'hépatocarcinomes ont une expression du LIFR α contrôlée par la méthylation du promoteur (Blanchard et al. 2003). Il reste donc à comprendre quelles sont les pressions de sélection ou les événements qui ont agi spécifiquement sur les cellules de mélanome pour entraîner une perte d'expression de l'*OSMR β* par répression épigénétique de son promoteur via les HDAC, et qui engendrent une résistance à la cytokine anti-proliférative la plus efficace dans la famille de l'IL-6, l'OSM. Quelques éléments peuvent être apportés pour répondre à cette question, à savoir la surexpression dans certaines cellules de mélanome des HDAC1, 2 et 3 de classe I et de la Sirtuin1 de classe III (Rothhammer et al. 2007). Le traitement à la TSA des 5 lignées de mélanome, dont le promoteur de l'*OSMR β* est régulé par des HDAC, a permis de réinduire l'expression du récepteur, la signalisation sur STAT3 ainsi que l'inhibition de prolifération

par l'OSM pour 3 de ces lignées (M102, M128 et M196). Pour la M170, un autre défaut au niveau de la transcription de l'*OSMRβ* s'ajoute au contrôle du promoteur par les HDAC et la TSA n'est donc pas suffisante pour faire réexprimer l'ARN messager de l'*OSMRβ*. Pour la M134, des défauts sur des voies de signalisation complémentaires à STAT3 ou une répression épigénétique des cibles de STAT3 s'ajoutent au contrôle du promoteur de l'*OSMRβ* par les HDAC.

Pour la lignée M120, c'est un blocage de l'expression de l'*OSMRβ* au niveau post-transcriptionnel auquel s'ajoute des défauts de transduction du signal ou d'induction des cibles de STAT3, qui sont à l'origine de la résistance de cette lignée à l'OSM.

Pour la lignée M183, l'OSM active STAT3 mais cette lignée est résistante à l'OSM. Il s'agit là aussi certainement de défauts de transduction du signal sur des voies complémentaires à STAT3 ou d'induction des cibles de STAT3 qui expliquent la résistance.

Cette étude a ainsi permis de montrer que la résistance à l'OSM n'est pas causée par l'activation constitutive de STAT3 (Kortylewski et al. 2005), ou des MAPK (Miller et al. 2006), qui ont un fonctionnement pro-tumoral et qui pourraient gêner l'activité anti-proliférative de l'OSM. De la même façon, une surexpression des suppresseurs de signalisation (Phosphatases ou SOCS) ou des récepteurs antagonistes solubles à l'OSM (*OSMRβ* ou gp130 solubles) (Diveu et al. 2006; Montero-Julian et al. 1997) ne semblent pas impliquées de façon majeure dans la résistance à l'OSM. L'analyse de l'expression de ces inhibiteurs est cependant nécessaire afin d'exclure leur éventuelle implication dans certaines lignées de mélanome.

En perspective, et afin de déterminer l'impact de la sensibilité/résistance à l'OSM des cellules de mélanome sur la progression tumorale et l'échappement au système immunitaire, il serait important d'évaluer l'influence de cette cytokine sur l'issue clinique des patients atteints de mélanome de grade III. Cette évaluation pourrait être réalisée dans le contexte de patients traités par immunothérapies, de manière similaire aux études sur la sensibilité à l'IFN γ , au TNF α et à l'IL-6 qui ont montré une corrélation avec la survie des patients (Boudny et al. 2005; van Horssen et al. 2006; Mouawad et al. 1999). Si la résistance à l'OSM s'avère corrélée avec la réponse clinique des patients atteints de mélanome de grade III, ce nouveau mécanisme d'échappement pourra être considéré comme un facteur de mauvais pronostic pour ces patients. La connaissance de la répression épigénétique de l'*OSMRβ* dans les lignées résistantes à l'OSM pourrait alors être utilisée pour mettre en place des protocoles de recherche clinique combinant les immunothérapies aux inhibiteurs des HDAC. Ces

inhibiteurs des HDAC sont déjà en études cliniques de phase II pour les patients atteints de mélanome et sont capables de bloquer le cycle cellulaire tout comme d'induire l'apoptose (Boyle et al. 2005). Leur activité sur le promoteur de l'*OSMRβ* qui résulte en la réexpression d'un récepteur à l'OSM fonctionnel et la sensibilisation de certaines cellules de mélanome à l'OSM, pourrait contribuer à améliorer l'efficacité des immunothérapies.

II. La résistance à l'Oncostatine M et le rôle respectif de STAT3 et des isoformes de PKC et d'Akt

A. Introduction

Nous avons montré précédemment que la résistance à l'OSM des cellules de mélanome est associée à la perte d'expression de l'OSMR β pour 32% des lignées, et cette perte est principalement due à une répression épigénétique du promoteur de l'*OSMR β* par déacétylation des histones (Lacrouette et al. 2007). Malgré ce mécanisme de résistance spécifique à l'OSM, la résistance à l'OSM corrèle significativement avec celle à l'IL-6 (Lacrouette et al. 2007), ce qui suggère que des défauts communs aux deux cytokines peuvent également être à l'origine de la résistance des cellules de mélanome. De plus, pour certaines lignées résistantes à l'OSM (M183) et semi-résistantes à l'OSM (M153, M119 et M138), de même que certaines lignées résistantes "OSMR β " mais où l'expression du récepteur a pu être réinduite (M134 et M120) (Lacrouette et al. 2007), l'OSM induit la phosphorylation de STAT3 sur la Tyr705 mais n'a pas d'activité anti-proliférative, ce qui indique que cette phosphorylation est nécessaire mais pas suffisante pour l'activité anti-proliférative de l'OSM. Ainsi des défauts sur des voies complémentaires ou additionnelles à la phosphorylation de STAT3 sur la Tyr705, ou la répression épigénétique des cibles de STAT3, comme ceci a été suggéré pour la résistance à l'IL-6 (Florenes et al. 1999), peuvent être également responsables de la résistance à l'OSM.

Mais quelles sont les pressions de sélection ou les événements subis par ces mélanomes qui les ont rendu les résistants à l'OSM? Est-ce l'environnement inflammatoire des ganglions lymphatiques ou l'exposition des cellules de mélanome aux UV qui ont donné lieu à des altérations génétiques ou épigénétiques ciblées sur les voies de signalisation de l'OSM? Il est important de noter que plusieurs cytokines pro-inflammatoires, notamment les cytokines de type IL-6 sont produites par les cellules de mélanome (Wachulska et al. 2005; Paglia et al. 1995). On peut ainsi se demander si ce n'est pas cette production de cytokines de type IL-6 par les cellules de mélanome elles-mêmes et/ou par les cellules du système immunitaire présentes dans les ganglions lymphatiques qui peuvent être impliquées dans l'établissement de la résistance à l'OSM.

Dans cette étude, nous avons complété l'analyse des mécanismes de résistance à l'OSM de 33 lignées de mélanome fraîchement isolées de ganglions envahis de patients atteints de

mélanome de grade III. Nous montrons qu'en plus de la perte de l'OSMR β , des défauts dans les voies de signalisation PKC/STAT3 Ser727 ou Akt peuvent également être responsables de la résistance à l'OSM. De plus, nous identifions l'OSM et l'IL-6, produites dans les ganglions lymphatiques ou par les cellules de mélanome elles-mêmes, comme étant à l'origine de cette résistance stable à l'OSM.

B. Article II

“La résistance à l’Oncostatine M des lignées de mélanome métastatique et le rôle respectif de STAT3 et des isoformes de PKC et d’Akt”, en révision pour le journal Cancer Research.

Les mélanomes de grade III sont réfractaires aux thérapies classiques et montrent une résistance à l’activité anti-proliférative des cytokines *in vitro*. Nous avons démontré précédemment que pour 30% des lignées de mélanome métastatique, la résistance à l’OSM est liée à la répression épigénétique de son récepteur, l’OSMR β . Dans cette étude, nous analysons les autres mécanismes potentiellement impliqués dans la résistance à l’OSM d’un nombre encore plus important de lignées cellulaires fraîchement isolées à partir de ganglions lymphatiques envahis de patients atteints de mélanome de grade III. Pour 18% des lignées, la résistance à l’OSM est associée à un défaut de phosphorylation de STAT3 sur la Ser727, simultanément à des défauts d’activation de plusieurs isoformes de PKC, et particulièrement la PKC δ . Pour 21% des lignées, la résistance à l’OSM est associée à un défaut d’activation d’Akt sur la Ser473. L’utilisation d’inhibiteurs, de dominants-négatifs et d’ARN interférence nous a permis de montrer que la voie de signalisation PKC/STAT3 Ser727, mais pas celle d’Akt, apparaît nécessaire à l’activité anti-proliférative de l’OSM. De plus, nous amenons l’évidence que l’OSM ou l’IL-6, produites dans les ganglions lymphatiques et/ou les cellules de mélanome, pourraient être impliquées dans l’établissement de la résistance à l’OSM durant la progression du mélanome. Ces nouveaux mécanismes de résistance à l’OSM pourraient être importants pour le pronostic et le traitement des patients atteints de mélanomes de grade III.

Oncostatin M resistance in metastatic melanoma cells and the respective role of STAT3, PKC and Akt isoforms

Aline Lacreusette,^{1,2} Isabelle Barbieux,^{1,2} Jean-Michel Nguyen,³ Marie-Christine Pandolfino,^{1,2} Brigitte Dréno,⁴ Yannick Jacques,^{1,2} Anne Godard,^{1,2,5} and Frédéric Blanchard^{2,6}

¹INSERM, U601, Centre de Recherche en Cancérologie de Nantes, Institut de Biologie, Nantes, France ; ²Université de Nantes, UFR Médecine, IFR26, Institut de Biologie, Nantes, France ; ³PIMESP, Nantes, France ; ⁴Unit of Skin Cancer, CHU de Nantes, Nantes, France ; ⁵Laboratoire de biochimie, CHU de Nantes, Nantes, France ; ⁶INSERM, ERI7, Nantes, France

Running title: OSM resistance, PKC/STAT3 and Akt pathways

Keywords: Oncostatin M; stage III melanoma; STAT3; PKC; Akt

Requests for reprints: Dr A Lacreusette, INSERM U601, Centre de Recherche en Cancérologie de Nantes, Institut de Biologie, 9 Quai Moncousu, F-44035 Nantes Cedex 01, France. Phone : 33-240-084-798 ; Fax : 33-240-084-082 ; E-mail : Aline.Lacreusette@univ-nantes.fr.

Abstract

Stage III melanoma is refractory to common therapies and shows resistance to the anti-proliferative activity of cytokines *in vitro*. We previously demonstrated that, for 30% of the metastatic melanoma cell lines, Oncostatin M (OSM) resistance is due to the epigenetic silencing of its receptor *OSMR β* . Here we analyze, on a larger panel of short-term cultures derived from melanoma-invaded lymph nodes, other mechanisms potentially implicated in OSM resistance. For 18% of the cell lines, OSM resistance is associated with a phosphorylation defect of signal transducer and activator of transcription (STAT)3 on Serine (Ser)727, in concordance with defects in the activation of various protein kinase C (PKC) isoforms, especially PKC δ . For 21% of the cell lines, OSM resistance is associated with a defect in the activation of Akt on Ser473. By the use of inhibitors, dominant-negatives and small-interfering (si)RNA, we show that the PKC/STAT3 Ser727 but not the Akt pathway appears necessary for OSM anti-proliferative activity. Moreover, we bring evidence that OSM or interleukin (IL)-6, produced in lymph nodes and/or melanoma cells, could be involved in the establishment of OSM resistance during melanoma progression. These findings could be relevant for the prognosis and the treatment of stage III melanoma patients.

Introduction

Melanoma is a highly malignant, increasingly common tumor for which treatment failure is a well-known problem. The best manner to reduce mortality is early detection and complete surgical excision of early stage melanoma (stage I-II) (Balch et al. 2001). In case of lymph nodes metastases (stage III), there is until today only limited therapeutic options owing to the inherent resistance of melanoma to chemotherapy, immunotherapy and targeted therapy, although evolving knowledge on melanoma genetics and immune regulation has recently led to promising clinical results (Chin et al. 2006; Flaherty 2006; Wrzesinski et al. 2005).

Interferon (IFN) α and interleukin (IL)-2 have been approved by the Food and Drug Administration (FDA) for systemic adjuvant therapy in stage II/III and distant metastases (stage IV) melanoma patients respectively. IFN α and IL-2 are also currently under phase II/III investigations, like granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and IL-18, in systemic treatments alone or in combination with chemotherapy and immunotherapy (Atkins 2006; Kirkwood et al. 2006). Moreover, tumor-targeted cytokine-based therapies such as the immunocytokine IL-2 linked to anti-GD2 and the melanoma differentiation-associated gene (MDA)-7/IL-24 showed good phase I results (King et al. 2004; Fisher et al. 2006). MDA-7/IL-24 not only increased anti-tumor immune responses but induced cancer-selective apoptosis (Fisher et al. 2006).

In addition to their immunostimulating properties, several cytokines have proven to be effective in directly restricting melanoma progression *in vivo*. IFN α , IFN γ and IL-12 had anti-proliferative and pro-apoptotic activities on melanoma cell lines injected in mice (Krepler et al. 2004; Yu et al. 2001; Airolidi et al. 2007). Disease outcome of metastatic melanoma patients treated with tumor necrosis factor (TNF) α -based isolated limb perfusion significantly correlated with increased expression of a TNF receptor-1 upregulating factor (van Horssen et

al. 2006). Moreover, soluble IL-6 receptor/IL-6 fusion protein mediated growth inhibition and rejection of mouse B16 melanoma cells (Ozbek et al. 2001). Finally, Oncostatin M (OSM), which belongs to the IL-6-type cytokine family, has recently been shown to partially inhibit pulmonary B16 melanoma metastases (Ouyang et al. 2006).

In vitro, proliferation of melanocytes and early-stage melanoma cell lines is inhibited by IFN α , β , γ and IFN λ , TNF α , IL-6 and OSM, whereas cell lines from metastatic lesions often loose responsiveness to these cytokines, suggesting an important role for these cytokines in the control of melanoma progression (Sato et al. 2006; Bani et al. 1996; Lu et al. 1993).

OSM is a multifunctional cytokine implicated in fetal and adult hematopoiesis and in extrathymic lymph nodes lymphopoiesis. OSM has also been shown to induce leucocyte adhesion and the production of proinflammatory cytokines and proteins in endothelial cells, hepatocytes, fibroblasts, keratinocytes, astrocytes and lung epithelial cells (Tanaka et al. 2003; Boniface et al. 2007; Chen et al. 2004; Sugaya et al. 2006). Furthermore, OSM is able to regulate the proliferation and/or differentiation of these cells as well as of osteoblasts and breast epithelial cells (Grant et al. 1999; Grant et al. 2001). More interestingly, OSM is the most active IL-6-type cytokine in inhibiting the proliferation of numerous solid tumor cell lines derived from hepatoma, glioma, osteosarcoma, ovarian, breast and lung cancers, and melanoma (Grant et al. 1999; Tanaka et al. 2003; Lu et al. 1993). However, relatively few studies have focused on the anti-tumor effects of OSM, and the mechanisms regulating such activities remain only poorly understood.

All IL-6-type cytokines share the signal transducing receptor subunit gp130. OSM receptor specificity is provided by an additional receptor chain, the OSM receptor (OSMR) β , which is necessary for the anti-proliferative activity of OSM in melanoma (Heinrich et al. 2003; Lacreusette et al. 2007). OSM signal transduction, like IL-6, involves firstly the activation of the Janus kinase (JAK)/signal transducer and activator of transcription (STAT)

pathway with STAT3 being the most responsive followed by STAT1 and STAT5, this latter being specific for OSM (Heinrich et al. 2003). STAT3 dimerization, nuclear translocation and DNA binding depend on its tyrosine (Tyr) 705 phosphorylation by JAKs and condition the growth inhibition of melanoma cell lines (Kortylewski et al. 1999; Kamaraju et al. 2002), via induction of the cyclin-dependent kinase (cdk) inhibitors p21^{WAF1/CIP1} and stabilization of p27^{Kip1} expression (Florenes et al. 1999; Kortylewski et al. 1999). In contrast, constitutive activation of STAT3, and its role in tumor cell survival, proliferation, angiogenesis, metastasis and immune evasion, has been observed in numerous cancers (Darnell 2002). Another phosphorylation event of STAT3 on serine (Ser) 727 is required for its maximal transcriptional activity and allows the recruitment of co-activators like p300 on STAT3 target genes promoters (Heinrich et al. 2003; Schuringa et al. 2001; Lufei et al. 2007). The Ser/threonine (Thr) kinase protein kinase C (PKC) δ can phosphorylate STAT3 on Ser727 in response to IL-6 type cytokines (Jain et al. 1999), and PKC δ is thought to increase apoptosis in different types of cancers (Koivunen et al. 2006). Nevertheless, the involvement of PKC δ in STAT3 Ser727 phosphorylation and its importance in STAT3 activity are unknown in melanoma cells, although PKC δ has been shown to inhibit the proliferation of a melanoma cell line (La Porta et al. 2002).

Secondly, OSM and IL-6 activate the RAS/RAF, MAPK/ERK kinase (MEK)/extracellular regulated kinase (ERK) 1/2 pathway, primarily involved in growth-promoting activities (Heinrich et al. 2003). Hence, it is not surprising that the constitutive activation of ERK1/2 often found in melanoma cells is mostly due to mutations in *B-RAF* (70% of the cases) and *N-RAS* (15%) (Chin et al. 2006). Thirdly, OSM and IL-6 activate the RAS/growth-factor-receptor-bound protein associated binder (Gab)/phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/3-phosphoinositide-dependent protein kinase (PDK) 1/Akt pathway, that generally promotes cell proliferation and survival (Heinrich et al. 2003; Holgado-Madruga et al. 1996). Akt

constitutive activation occurs in about 50% of melanoma cells (Robertson 2005) but activation of this pathway by OSM/IL-6 has never been explored in melanoma cells.

In metastatic melanoma, IL-6 resistance seems to be a consequence of a defect of p21^{WAF1/CIP1} induction by STAT3 (Florenes et al. 1999), or a defect in STAT3 Tyr705 phosphorylation either due to constitutive activation of JAK1 (Bohm et al. 2001) or to overexpression of the suppressors of cytokine signaling (SOCS) 1 and 3, acting as negative regulators of JAKs and STAT3 activities (Li et al. 2004; Komyod et al. 2007). Moreover, we previously showed that OSM resistance can rely on epigenetic silencing of *OSMRβ*, a phenomenon observed in 30% of the cell lines derived from tumor-invaded lymph nodes of melanoma patients (Lacreusette et al. 2007). However in these studies, some OSM-resistant cell lines had kept the expression of *OSMRβ* and the phosphorylation of STAT3 on Tyr705 in response to OSM, suggesting that this phosphorylation is necessary but not sufficient for the anti-proliferative activity of OSM. Thus, we suggested that defects downstream of STAT3 or on other pathways additional or complementary to STAT3 Tyr705 phosphorylation can also be implicated in OSM resistance of metastatic melanoma cells. Whether these resistance mechanisms observed in metastatic melanoma have been induced by a particular inflammatory reaction and/or by genetic/epigenetic modifications of the tumor cells is not known. However, various inflammatory cytokines, especially IL-6-type cytokines themselves, are known to alter OSM signaling (Heinrich et al. 2003). Thus, production of IL-6-type cytokines by melanoma cells (Wachulska et al. 2005; Paglia et al. 1995) and/or other cells in the inflammatory tumor microenvironment could have been involved in the establishment of OSM resistance.

Here we complete, on short-term melanoma cultures derived from lymph nodes of 33 stage III patients, the analysis of OSM resistance mechanisms. We show that in addition to the loss of *OSMRβ*, defects in the PKC/STAT3 Ser727 or Akt pathways can also be responsible

for OSM resistance. Moreover, we identify OSM and IL-6, produced in lymph nodes or by the melanoma cells themselves, as being primarily at the origin of this stable OSM resistance.

Materials and Methods

Melanoma cell lines, reagents, cell proliferation assay, ELISA and RT-PCR

A total of 33 metastatic melanoma short-term (under 10 subcultures) cell cultures were used in this study and were obtained from tumor-invaded lymph nodes of melanoma patients, as described previously (Gervois et al. 1990). These cells were maintained in RPMI 1640 and the metastatic melanoma cell line WM-266-4, purchased from the American Type Culture Collection (LGC Promochem, Molsheim, France), was maintained in Dubelcco's modified Eagle's medium, supplemented with 10% fetal calf serum and 2mM L-glutamine (Sigma, Lyon, France).

For cell proliferation assays, recombinant human OSM or IL-6 (R&D Systems, Lille, France) were incubated with cells for 72h, except for siRNA, dominant-negatives and inhibitors experiments for which cells were treated for only 24h to reduce toxicity. Then [³H] Thymidine incorporation was measured, as described previously (Blanchard et al. 2002).

For long-term treatment with cytokines, OSM, IL-6, and TNF α (R&D Systems) were incubated with cells at 10 ng/ml during 6 weeks, with 2 subcultures per week, then released from cytokines during 6 additional weeks.

For long-term treatment with blocking antibodies, anti-IL-6 and/or anti-IL-11 (R&D Systems) were incubated with cells at 5 μ g/ml and 1 μ g/ml respectively, during 6 weeks, with 2 subcultures per week.

For ELISA, cell supernatants were collected after 48h of culture in complete medium, then subjected for the expression of cytokines using ELISA kits specific for human OSM, human

IL-11 (detection limit: 30 pg/ml, R&D Systems), human IL-6 (detection limit: 15 pg/ml, Biosource, Nivelles, Belgium) and human LIF (detection limit: 8 pg/ml, Bender MedSystems GmbH, Vienna, Austria).

For semi-quantitative RT-PCR, total RNA was extracted from fragments of the lymph nodes of melanoma patients or melanoma cells in culture, using Trizol reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) as described previously (Lacrouette et al. 2007). Exon-exon junction-spanning primers were the following: OSM, left 5'-AGCTGCTCGAAAGAGTACCG-3', right 5'-CTGCTCTAAGTCGGCCAGTC-3'; IL-6, left 5'-TACCCCCAGGAGAAGATTCC-3', right 5'-TTTTCTGCCAGTGCCTCTTT-3'; LIF, left 5'-GTGCAGCCCATAATGAAGGT-3', right 5'-CCCCTGGGCTGTGTAATAGA-3'.

Western blotting

After 4h of serum deprivation and 15min of cytokine stimulation at 50 ng/ml, cells were lysed in RIPA buffer. Equal amounts, bicinchoninic acid quantified, of protein lysates were separated on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels and transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Immobilon-P, Millipore, Molsheim, France). Antibodies used in this study were from Cell Signaling (Beverly, MA): phospho-STAT3 (Tyr705), phospho-STAT3 (Ser727), phospho-PKC δ (Thr505), phospho-PKC (pan) (β II Ser660), phospho-Akt (Ser473), phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204), phospho-STAT1 (Tyr701), phospho-PKD/PKC μ (Ser744/748), Akt, ERK1/2. Phospho-STAT5 (Tyr694) antibody was from Zymed Laboratories (San Francisco, CA), STAT3 antibody was from BD Bioscience (Le pont de Claix, France) and PKC δ was from Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany). Digital densitometry of the patterns was analyzed with the NIH Image software and OSM-treated WM-266-4 cells served as the 100% internal reference for each phospho-specific antibody.

RNA interference, dominant-negatives and pharmacological inhibitors

For RNA interference, the cells were split then transfected with INTERFERin (PolyPlus-transfection, Illkirch, France) and 100 nM of annealed siRNA against STAT3, PKC α , PKC β , PKC δ , Akt1, Akt2 and Akt3 or 50 nM each when combined, all coming from Ambion (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Only 10 nM each of combined Akt1, 2 and 3 siRNA could be transfected in the M254 cells. Negative control siRNA, constituted of non-targeting sequences, was also from Ambion. After 48h and 72h of siRNA transfection, western blots against the total and phosphorylated form of targeted proteins were used to control their residual level. These conditions of siRNA transfection were applied for cell proliferation assay, that started after 48h of transfection and ended at 72h.

Dominant-negative (DN) constructs of STAT3, lacking 55 C-terminal amino-acids: STAT3 Δ 55C, or bearing a mutation generating a transfer from Ser727 to Ala: STAT3 SA (Kim et al. 1997), were transfected in cells according to the FuGENE6 manufacturer's protocol (Roche Diagnostics, Meylan, France). Cells were incubated with a 3:2 ratio of FuGENE6: plasmid DNA, constituted by a 20:1 ratio of STAT3: pEGFP(N3) (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, France). An empty expression vector pCMV beta-galactosidase, originating from Clontech, was deleted from beta-galactosidase sequence and was used as negative control. After 24h of transfection, GFP+ cells were selected by sterile fluorescence-activated cell sorting (FACS Aria, BD Bioscience), to enrich for cells expressing STAT3. The cells were then replated and submitted to cell proliferation assay for 24h, while western blot against STAT3 was used to control the expression of STAT3 constructs.

Pharmacological inhibitor of PKC α , β and μ : Gö 6976 was from Calbiochem (Merck Chemicals Ltd, Nottingham, UK). It was preincubated for 30min with cells before either the 24h cell proliferation assay with OSM, or for the control western blots.

Statistical analyses

Data are represented as mean $\pm$ standard deviation (SD) or $\pm$ standard error of the mean (SEM). Categorical data were compared using the Mann-Whitney test. A value of $P < 0,05$ was considered as significant.

Results

Resistance to growth inhibition by OSM is associated with phosphorylation defects of STAT3 on Ser727 or Akt on Ser473

We previously described that 7 on 22 (32%) metastatic melanoma cell lines, obtained from tumor-invaded lymph nodes (stage III), are resistant to growth inhibition by OSM because they lost expression of OSMR β (Lacrouette et al. 2007). To better describe the other resistance mechanisms which presumably implicate the signal transduction pathways activated by OSM, we analyzed an expanded number (33) of stage III melanoma cells. The WM-266-4 melanoma cell line was used as a positive control. As shown in table 1, growth inhibition by OSM (50ng/ml for 3 days) was variable, with 18 cell lines (54%) being inhibited by less than 20% (not statistically significant) and herein termed resistant cell lines. Moreover, 4 cell lines (12%) were inhibited by only 20 to 40% (herein termed intermediate cell lines), the remaining 11 cell lines (33%) being inhibited by more than 40% (herein termed sensitive cell lines) (table 1). Similar growth inhibitions were obtained when higher doses (up to 250ng/ml) or longer contact times (up to 6 days) of OSM were applied (data not shown).

When looking at the transduction pathways activated by a short term treatment of OSM in comparison to IL-6 (figure 1A and table 1), we obtained four types of response to OSM. A first group of melanoma cells, including WM-266-4 cells (n=11, table 1),

represented by the M140 cell line (figure 1A), was characterized by phosphorylation of the three major IL-6-type cytokines signal transduction pathways. Indeed, phosphorylation of STAT3 on Tyr705 and Ser727 was observed after OSM and IL-6 treatment in these cells, together with phosphorylation of PKC δ (except for the M245 cell line) and other PKC isoforms (PKC α , β , ϵ or η , recognized by the anti-phospho-PKC (pan) antibody). Phosphorylation of ERK1/2 was also obtained after treatment with these cytokines. In contrast, induced phosphorylation of Akt on Ser473 was observed in response to OSM but not to IL-6 (figure 1A), and this was also true for other cell lines in this group (data not shown). No activation of STAT1 or STAT5 was observed in response to OSM or IL-6 in any cells.

A second group of melanoma cells (n=6, table 1), represented by the M153 cell line (figure 1A), was characterized by an induced phosphorylation of STAT3 on Tyr705 but not on Ser727 in response to OSM. In a majority of these cell lines (5 on 6), we also observed a defect in the phosphorylation of PKC δ and/or other isoforms of PKC, whereas Akt and ERK1/2 could still be activated by OSM. OSM doses up to 250ng/ml and kinetics from 5 minutes to 1 hour were tested for the M147 and M117 cells, but again no signals were detected for phospho-STAT3 Ser727 or phospho-PKC (data not shown). Importantly, STAT3, PKC δ , ERK1/2 and Akt were expressed in all cell lines at similar levels (Figure 1A, bottom panels, and data not shown). A third group of melanoma cells (n=7, table 1), represented by the M8 cell line (figure 1A), was characterized by OSM-induced activation of all the pathways except Akt. Again, higher OSM doses or contact times tested on M203 and M119 cells gave similar results (data not shown). In groups 2 and 3, we also noticed that IL-6 was always less active than OSM in activating the transduction pathways (figure 1A). A fourth group of melanoma cells (n=10, table 1), represented by the M170 cell line (figure 1A), showed defect of activation of STAT3 on Tyr705 in response to OSM but not always to IL-6.

This is due to loss of OSMR β expression ((Lacrouette et al. 2007) for 7 of them and data not shown).

It is important to note that in absence of cytokine treatment, there was no constitutive activation of STAT3 on Tyr705 in any group of melanoma cells, although phosphorylation of STAT3 on Ser727 was observed in 7 cell lines (21%) (data not shown). Constitutive activations of PKC δ , pan PKC and ERK1/2 were also observed in 5 (15%), 6 (18%) and 18 (55%) cell lines respectively (see figure 1A and data not shown), but that of Akt was not found in any but one (M140, figure 1A) of our melanoma cells.

The mean inhibition of proliferation by OSM in group 1 (no signaling defect) was 65% whereas it was only 21% and 18% for group 2 (defect on P-STAT3 Ser727) and group 3 (defect on P-Akt Ser473) respectively, and 2% for group 4 (OSMR β ⁻) (figure 1B). The constitutive phosphorylations of STAT3, PKC isoforms, Akt or ERK1/2 did not correlate with resistance to OSM, as for example they could be detected in group 1 of sensitive cell lines (figure 1A and data not shown). Altogether, these results suggest that in addition to the loss of OSMR β , phosphorylation defect of STAT3 or Akt could also be responsible for the significantly lower sensitivity to OSM that is observed in 13 (39%) melanoma cell lines (groups 2 and 3). Moreover, since phosphorylation of PKC δ and/or other isoforms of PKC correlated with phosphorylation of STAT3 on Ser727, PKC isoforms could be involved in STAT3 Ser727 phosphorylation and hence induction of STAT3 activity. However, there are some noticeable exceptions. The M182 and M88 cell lines showed defect in STAT3 and Akt activation respectively but were sensitive to growth inhibition by OSM (table 1). Inversely, the M253 cell line was resistant to growth inhibition by OSM but there was no transduction defect in these cells (table 1).

STAT3 and its phosphorylation on Ser727 are necessary for the anti-proliferative activity of OSM

In order to evaluate the importance of STAT3 and its phosphorylation on Ser727 in growth inhibition by OSM, we first transfected small-interfering RNA (siRNA) against STAT3 in the OSM-sensitive melanoma cell lines WM-266-4 and M254. As shown in figure 2A, STAT3 siRNA almost completely blocked the anti-proliferative activity of OSM, even at the highest doses of the cytokine (50ng/ml; a), while STAT3 expression was specifically reduced (b) in both cell lines. Moreover, basal proliferation of the two cell lines was not affected by STAT3 siRNA (data not shown). We then used a dominant-negative construct of STAT3, lacking the 55 C-terminal amino-acids transactivation domain and containing Tyr705 but not Ser727: STAT3 Δ 55C; as well as a STAT3 point mutation construct with Ser727 being changed into Ala: STAT3 SA (figure 2B). Over-expression of these constructs in WM-266-4 transfected cells is shown in (d). WM-266-4 cells transfected with STAT3 Δ 55C (b) or STAT3 SA (c) were significantly less sensitive to growth inhibition by OSM in comparison to cells transfected with a pCMV control vector (a). Unfortunately, these results could not be confirmed with M254 and M140 cells because of cellular toxicity observed in the same conditions of transfection and cell sorting. Nevertheless, our results indicate that STAT3 is necessary for the anti-proliferative activity of OSM in melanoma cells, and that its phosphorylation on Ser727 is required for full growth inhibition.

PKC δ and/or another isoform of PKC are involved in the phosphorylation of STAT3 on Ser727 and Akt on Ser473

Looking for the probable involvement of PKC isoforms in the activation of STAT3 and in growth inhibition, we first observed that Gö6976, an inhibitor of various PKC isoforms such as PKC α , β and μ , was able to prevent the growth inhibition by OSM in WM-266-4 cells

(figure 3A, a), M140 cells (data not shown) but not in the M254 cells (figure 3A, b). Then, we transfected siRNA against various PKC isoforms and observed that PKC δ siRNA totally prevented growth inhibition by OSM in M254 cells but slightly in WM-266-4 cells (figure 3A, c and d). As shown in figure 3B, Gö6976 reduced the phosphorylation of pan PKC, but not of PKC δ , in association with a reduction of P-STAT3 on Ser727 in WM-266-4 cells. Similarly, PKC δ siRNA reduced P-PKC δ (figure 3B) and total PKC δ (data not shown), concomitantly with a reduced P-STAT3 Ser727 in both WM-266-4 and M254 cells.

Together, these results indicated that in WM-266-4 cells, PKC δ and more importantly another isoform of PKC inhibited by Gö6976, were implicated in the phosphorylation of STAT3 on Ser727 and growth inhibition by OSM. In M254 cells, PKC δ (insensitive to Gö6976) was the major PKC isoform involved in the phosphorylation of STAT3 on Ser727 and in growth inhibition. In addition, as shown in figure 3B, the PKC δ siRNA and Gö6976 not only reduced P-STAT3 Ser727 but also P-STAT3 Tyr705 and P-Akt Ser473 in WM-266-4 and M254 cells, suggesting that PKC isoforms were also implicated in these phosphorylations events. However, such a functional relationship did not occur in group 2 of OSM-resistant melanoma cell lines that are defective in phosphorylation of PKC isoforms but not in P-STAT3 Tyr705 or P-Akt (table 1). Moreover, the significance of the PKC/Akt pathway in growth inhibition by OSM remains to be determined since siRNA against the isoforms Akt1, 2 and 3 strongly reduced the basal proliferation but had no effect or even enhanced growth inhibition by OSM in WM-266-4 and M254 cells (data not shown).

We then tried to identify the PKC isoform inhibited by Gö6976 and responsible for growth inhibition in WM-266-4 cells. PKC α and β siRNA strongly reduced the basal proliferation of WM-266-4 cells, and had either no effect or even sensitized the cells to growth inhibition by OSM (data not shown), suggesting that PKC α and β might be rather

involved in sustaining melanoma cell proliferation. Moreover, we did not observe an activation of PKC μ in response to OSM in WM-266-4 cells (data not shown).

Stable OSM resistance is induced by long-term pretreatment of melanoma cells by OSM and IL-6

To study the potent implication of IL-6-type cytokines in the generation of OSM resistance in metastatic melanoma cells, the WM-266-4 and M140 cell lines were treated for six weeks with OSM, IL-6 or TNF α , and then cultured without cytokines during six additional weeks (herein termed cytokine pretreatment). As shown in figure 4A and B, OSM pretreatment induced a stable resistance to OSM in both cell lines. This resistance appeared total in M140 cells but only intermediate in WM-266-4 cells. IL-6 pretreatment also induced a stable intermediate resistance to OSM in WM-266-4 cells (figure 4A), but not in M140 cells (figure 4B), whereas TNF α pretreatment did not induce any resistance to OSM (data not shown).

Interestingly, OSM or IL-6 pretreatment of WM-266-4 cells altered their OSM response in term of induction of PKC δ and STAT3 Ser727 phosphorylation, whereas phosphorylation of STAT3 on Tyr705 and Akt remained largely unaffected (figure 4C). OSM pretreatment, and not IL-6 pretreatment, of M140 cells altered their global OSM response as far as inductions of P-STAT3 Tyr705 and P-ERK1/2 were totally prevented (figure 4D). Together, these results indicated that in WM-266-4 cells, OSM or IL-6 pretreatments were able to induce an intermediate resistance to OSM resembling the group 2 of resistant melanoma cell lines, characterized by phosphorylation defects in both PKC isoforms and STAT3 on Ser727. In M140 cells, only OSM pretreatment was able to induce a total resistance to OSM, resembling the group 4 of resistant melanoma cell lines, characterized by a specific loss of OSMR β (Lacreusette et al. 2007).

IL-6-type cytokines are detected in lymph nodes of melanoma patients and melanoma cell supernatants

From the cytokine pretreatment experiments, our results suggested that resistance to OSM could be attributable to a stimulation by IL-6-type cytokines, anterior to the establishment of the cell lines from melanoma patients' lymph nodes. In the attempt to know the potent sources of IL-6-type cytokines, we first evaluated the expression of IL-6-type cytokines mRNA in the lymph nodes of melanoma patients and in the corresponding melanoma cell lines. As shown in figure 5A, OSM mRNA was detected in only 5% of the melanoma cell lines, whereas it was present in all the non-invaded lymph nodes, and in 55% of the melanoma-invaded ones. Other members of the IL-6 family, IL-6 and leukemia inhibitory factor (LIF), had detectable mRNAs in 70% and 95% of the melanoma cell lines and in more than 70% of the lymph nodes.

Then, we analyzed the expression of IL-6-type cytokines in the supernatants of the 33 melanoma cell lines that we used for signaling studies. OSM was not detected in all but one (only 42 pg/million of cells) melanoma cell supernatant. In contrast, IL-6 was produced by 44% of the melanoma cell lines (ranging from 21 to 2720 pg/million of cells), IL-11 was produced by 72% of the melanoma cell lines (from 32 to 3000 pg/million of cells) and LIF was produced by all the cell lines (from 91 pg to 115 ng/million of cells). As shown in figure 5B and C, IL-6 and IL-11 production were higher in groups 2 and 3 of resistant melanoma cell lines, than in group 1 (sensitive cells without signaling defect) or group 4 (resistant cells with loss of OSMR β). However, these tendencies did not reach statistical significance except for IL-11 in group 2 versus group 1 (figure 5C). When combining the results for group 2 and 3 versus group 1 and 4, the higher expression of IL-6 and IL-11 in group 2+3 reached statistical significance ($p < 0.05$). In contrast, LIF production was not significantly different in the 4 groups of melanoma cell lines (figure 5D). Altogether, these results indicated that the

main source of OSM was in lymph nodes whereas other IL-6-type cytokines were also produced directly by the melanoma cells. More importantly, IL-6 and IL-11 productions were associated with signal transduction defects (STAT3 Ser727 and Akt) leading to OSM resistance in groups 2 and 3 of melanoma cell lines.

Finally, we tried to render the resistant melanoma cell lines M117 (P-STAT3 Ser727⁻) and M119 (P-Akt⁻), sensitive to OSM, by long-term (six weeks) treatment with anti-IL-6 and/or anti-IL-11 blocking antibodies. Although these cells produced IL-6 and IL-11, potentially responsible for their resistance to OSM, we could not observe any resensitization to growth inhibition by OSM (data not shown).

Discussion

In this study, we describe signal transduction pathways that lead to sensitivity or resistance to OSM in metastatic melanoma cells. A group 1 of OSM-sensitive melanoma cells responds to OSM by the phosphorylation of key proteins involved in the three major IL-6-type cytokines signal transduction pathways: PKC/STAT3, ERK and Akt (figure 1A and table 1). OSM is a more effective activator of these pathways than IL-6, especially for Akt, in agreement with its higher capacity to inhibit the proliferation of melanoma cells (figure 1 and (Lacrouette et al. 2007)).

OSM resistance in group 2 of melanoma cells (18% of the cell lines) is associated with phosphorylation defects on STAT3 Ser727, PKC δ and/or other isoforms of PKC (figure 1 and table 1). By transfection experiments using siRNA against STAT3 and DNA constructs encoding dominant negative or mutated STAT3, we first confirmed the importance of this transcription factor, its transactivation domain and Ser727 in OSM anti-proliferative activity. Then, by using pharmacologic inhibitors and siRNA against various isoforms of PKC, we

demonstrated that PKC δ and/or other isoforms of PKC, are indeed implicated in STAT3 Ser727 phosphorylation and in growth inhibition by OSM. It should be noted however that the relative implication of PKC isoforms in OSM activity appears to be cell line specific, with PKC δ being the main PKC isoform in M254 cells. The main PKC isoform in WM-266-4 cells remains to be identified but is inhibited by Gö6976 and different from PKC α , β , δ and μ . One possible candidate is the PKC η isoform, that is expressed in melanoma (Oka et al. 2005) and recognized by the anti-phospho-PKC (pan) antibody but it remains to be determined if it is inhibited by Gö6976. Altogether, these results are in line with previous studies demonstrating the involvement of PKC δ in the inhibition of melanoma cell proliferation (La Porta et al. 2002) and in induction of apoptosis in different types of cancers (Koivunen et al. 2006). On the contrary, we confirm here that PKC α and β isoforms have protumoral effects in melanoma and other cancers (Oka et al. 2005; Koivunen et al. 2006). In addition, inhibition of PKC isoforms in melanoma cells indicates that they are also implicated in STAT3 Tyr705 and Akt Ser473 phosphorylation (see below for Akt). Since phosphorylation of STAT3 on Tyr705 depends on JAKs (Heinrich et al. 2003), it can be anticipated that PKC isoforms, especially PKC δ , could be involved in activation of the JAK/STAT3 pathway as described previously (Park et al. 2002), but additional experiments are needed to confirm this hypothesis.

OSM resistance in group 3 of melanoma cells (21% of the cell lines) is associated with phosphorylation defect of Akt on Ser473. Even though Akt is well known to promote cell survival, Akt has also been shown to be involved in apoptosis of multiple myeloma cells and in the blockade of proliferation of the A375 metastatic melanoma cell line (Thyrell et al. 2004; Merighi et al. 2005). However, the involvement of Akt in the anti-proliferative activity of OSM remains to be firmly established since WM-266-4 and M254 cells were not sensitive to Akt knockdown by siRNA or inhibition of PI3K, the kinase upstream of Akt (data not shown). In addition, implication of PKC isoforms, especially PKC δ , in Akt Ser473 phosphorylation

has been observed in M254 and WM-266-4 cells (figure 3B). Indeed, Akt activation depends on its phosphorylation on Thr308 by PDK1, a kinase downstream of PI3K (Stephens et al. 1998) and phosphorylation of Ser473 is thought to depend on PKC α , β and δ (Partovian et al. 2004; Kawakami et al. 2004; Xia et al. 2007) or on rictor-mammalian target of rapamycin (TORC2) (Jacinto et al. 2006). Since there is no defect of PKC activation in group 3 of melanoma cells (table 1), this suggests that other Ser/Thr kinases such as TORC2 are also particularly important for Akt Ser473 phosphorylation in melanoma cells.

The group 4 of resistant melanoma cells (30% of the cell lines) that we previously described (Lacrouette et al. 2007), is characterized by the loss of OSMR β and a global defect of OSM signaling. Therefore, resistance to growth inhibition by OSM is even more pronounced for these cells than for the groups 2 and 3 of melanoma cells and is specific for OSM as far as IL-6 can still transduce a signal and inhibit proliferation (figure 1A and (Lacrouette et al. 2007)).

In our studies, there was no constitutive activation of STAT3 on Tyr705 in any of the melanoma cells (figure 1A), demonstrating that OSM resistance can not be explained by a protumoral constitutively activated STAT3. This result somehow contrasts with other reports on the constitutive activation of STAT3 in melanoma conducted in long-term cell lines (Niu et al. 2002), whereas we used here cultures of melanoma cells with a limited numbers of subcultures (less than 10). Other studies used melanoma biopsies (Wang et al. 2007; Niu et al. 2002), suggesting an implication of the proinflammatory tumor microenvironment in the constitutive STAT3 activation. In our melanoma cells, we describe for the first time a constitutive phosphorylation of STAT3 on Ser727 that did not always correlate with constitutive activation of PKC. Therefore, other Ser/Thr kinase like the mitogen-activated protein kinase (MAPK) p38, cJun N-terminal kinase (JNK), ERK1/2 or Nemo-like kinase (NLK), could be responsible for constitutive STAT3 Ser727 phosphorylation (Heinrich et al.

2003; Kojima et al. 2005). As already shown (Lacrouette et al. 2007), constitutively activated ERK1/2 was found in various cell lines (figure 1A), correlated with mutated *B-RAF* but was not associated with OSM resistance. Constitutive activation of Akt, normally observed in about 50% of melanoma samples (Robertson 2005), was not observed in our serum-deprived culture condition. Absence of serum could explain this discrepancy, since both loss or mutation of PTEN (phosphatase and TENsin homolog) or Akt3 overexpression need serum to induce constitutive activation of Akt (Robertson 2005). In any case, we did not find a correlation between the constitutive activation of a given pathway analyzed in this study, and the sensitivity/resistance to growth inhibition by OSM.

In comparison to previous studies on the resistance of melanoma cells to IL-6 (Florenes et al. 1999; Li et al. 2004; Komyod et al. 2007; Bohm et al. 2001), IFN or TNF cytokines (Wong et al. 1997; Wellbrock et al. 2005), we describe for the first time specific defects in the PKC/STAT3 Ser727 pathway as well as on Akt Ser473 phosphorylation. Thus, to mediate its anti-proliferative activity on melanoma cells, OSM requires not only its receptor and STAT3 Tyr705 phosphorylation but also the complementary Ser727 phosphorylation that allows maximal transcriptional activity of STAT3. The question then is, what is the event during tumor progression that leads to defect in PKC/STAT3, Akt or OSMR β ? We observed that long-term pretreatment of sensitive melanoma cells by OSM or IL-6 could induce a stable OSM resistance either due to specific signaling defects on PKC/STAT3 Ser727 (like in group 2) or to a global absence of signaling (like in group 4). Moreover, we identified the sources of IL-6-type cytokines potentially at the origin of the resistance. OSM was detected only in lymph nodes of melanoma patients whereas other IL-6-type cytokines such as IL-6, LIF or IL-11 were detected in lymph nodes and/or melanoma cells supernatants. IL-6 and IL-11 expression were correlated with signaling defects on PKC/STAT3 Ser727 and Akt pathways (group 2 and 3 of melanoma cells). In contrast,

resistance to OSM in group 4 of melanoma cell lines (OSMR β^-), was independent on IL-6 or IL-11 production and only OSM was able to induce global signaling defects. Together these results suggest that during melanoma progression, the cancer cells can be submitted to OSM and IL-6 treatment, especially in the lymph nodes, where they become resistant to OSM. However, we could not re-establish a response to OSM after treatment of resistant melanoma cells with blocking antibodies against IL-6 and/or IL-11 (data not shown). These results suggest that acquisition of resistance to OSM is not reversible and does not depend on a constant pressure by IL-6-type cytokines, or that intracellular intracrine activating loops not sensitive to exogenously added antibodies are involved. In line with these observations, (i) several metastatic melanoma cell lines have been described to produce IL-6 and to use it as an intracrine growth factor (Lu et al. 1996) and (ii) elevated doses of serum IL-6 in melanoma patients have been correlated with poor prognosis (Mouawad et al. 1999).

In conclusion, these studies have shown that multiple resistance mechanisms, from signaling defects to loss of OSM receptor, affect growth inhibition by OSM in metastatic melanoma cells. It remains to be determined whether OSM resistance correlates with the clinical outcome of stage III melanoma patients, but a refined comprehension of these resistance mechanisms could lead to better anti-cancer treatments.

Acknowledgments

Grant support: the Ligue contre le Cancer, the Fondation pour la Recherche Médicale (A. Lacreusette), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and the Ministère de la Recherche.

We thank Michaël Lecourt and Gaëtan Lamorinière for their contribution on OSM signaling pathways and cytokine long-term treatment of melanoma cell lines, Michelle Heslan (Inserm U643, Nantes, France) for her help with cell sorting on the FACSaria and Heinz Baumann for providing the STAT3 constructs.

References

1. Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, *et al.* Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 2001;19(16):3635-48.
2. Chin L, Garraway LA, Fisher DE. Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era. *Genes Dev* 2006;20(16):2149-82.
3. Flaherty KT. Chemotherapy and targeted therapy combinations in advanced melanoma. *Clin Cancer Res* 2006;12(7 Pt 2):2366s-70s.
4. Wrzesinski C, Restifo NP. Less is more: lymphodepletion followed by hematopoietic stem cell transplant augments adoptive T-cell-based anti-tumor immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 2005;17(2):195-201.
5. Atkins MB. Cytokine-based therapy and biochemotherapy for advanced melanoma. *Clin Cancer Res* 2006;12(7 Pt 2):2353s-8s.
6. Kirkwood JM, Moschos S, Wang W. Strategies for the development of more effective adjuvant therapy of melanoma: current and future explorations of antibodies, cytokines, vaccines, and combinations. *Clin Cancer Res* 2006;12(7 Pt 2):2331s-6s.
7. King DM, Albertini MR, Schalch H, *et al.* Phase I clinical trial of the immunocytokine EMD 273063 in melanoma patients. *J Clin Oncol* 2004;22(22):4463-73.

8. Fisher PB, Sarkar D, Lebedeva IV, *et al.* Melanoma differentiation associated gene-7/interleukin-24 (mda-7/IL-24): Novel gene therapeutic for metastatic melanoma. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006.
9. Krepler C, Certa U, Wacheck V, Jansen B, Wolff K, Pehamberger H. Pegylated and conventional interferon-alpha induce comparable transcriptional responses and inhibition of tumor growth in a human melanoma SCID mouse xenotransplantation model. *J Invest Dermatol* 2004;123(4):664-9.
10. Yu D, Thomas-Tikhonenko A. Intratumoral delivery of an interferon gamma retrovirus-producing cells inhibits growth of a murine melanoma by a non-immune mechanism. *Cancer Lett* 2001;173(2):145-54.
11. Airolidi I, Di Carlo E, Cocco C, *et al.* Endogenous IL-12 triggers an antiangiogenic program in melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(10):3996-4001.
12. van Horssen R, Rens JA, Brunstein F, *et al.* Intratumoural expression of TNF-R1 and EMAP-II in relation to response of patients treated with TNF-based isolated limb perfusion. *Int J Cancer* 2006;119(6):1481-90.
13. Ozbek S, Peters M, Breuhahn K, *et al.* The designer cytokine hyper-IL-6 mediates growth inhibition and GM-CSF-dependent rejection of B16 melanoma cells. *Oncogene* 2001;20(8):972-9.
14. Ouyang L, Shen LY, Li T, Liu J. Inhibition effect of Oncostatin M on metastatic human lung cancer cells 95-D in vitro and on murine melanoma cells B16BL6 in vivo. *Biomed Res* 2006;27(4):197-202.
15. Sato A, Ohtsuki M, Hata M, Kobayashi E, Murakami T. Antitumor activity of IFN-lambda in murine tumor models. *J Immunol* 2006;176(12):7686-94.

16. Bani MR, Rak J, Adachi D, *et al.* Multiple features of advanced melanoma recapitulated in tumorigenic variants of early stage (radial growth phase) human melanoma cell lines: evidence for a dominant phenotype. *Cancer Res* 1996;56(13):3075-86.
17. Lu C, Rak JW, Kobayashi H, Kerbel RS. Increased resistance to oncostatin M-induced growth inhibition of human melanoma cell lines derived from advanced-stage lesions. *Cancer Res* 1993;53(12):2708-11.
18. Tanaka M, Miyajima A. Oncostatin M, a multifunctional cytokine. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2003;149:39-52.
19. Boniface K, Diveu C, Morel F, *et al.* Oncostatin M secreted by skin infiltrating T lymphocytes is a potent keratinocyte activator involved in skin inflammation. *J Immunol* 2007;178(7):4615-22.
20. Chen SH, Benveniste EN. Oncostatin M: a pleiotropic cytokine in the central nervous system. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;15(5):379-91.
21. Sugaya M, Fang L, Cardones AR, *et al.* Oncostatin M enhances CCL21 expression by microvascular endothelial cells and increases the efficiency of dendritic cell trafficking to lymph nodes. *J Immunol* 2006;177(11):7665-72.
22. Grant SL, Begley CG. The oncostatin M signalling pathway: reversing the neoplastic phenotype? *Mol Med Today* 1999;5(9):406-12.
23. Grant SL, Douglas AM, Goss GA, Begley CG. Oncostatin M and leukemia inhibitory factor regulate the growth of normal human breast epithelial cells. *Growth Factors* 2001;19(3):153-62.
24. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 2003;374(Pt 1):1-20.

25. Lacreusette A, Nguyen JM, Pandolfino MC, *et al.* Loss of oncostatin M receptor beta in metastatic melanoma cells. *Oncogene* 2007;26(6):881-92.
26. Kortylewski M, Heinrich PC, Mackiewicz A, *et al.* Interleukin-6 and oncostatin M-induced growth inhibition of human A375 melanoma cells is STAT-dependent and involves upregulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27/Kip1. *Oncogene* 1999;18(25):3742-53.
27. Kamaraju AK, Bertolotto C, Chebath J, Revel M. Pax3 down-regulation and shut-off of melanogenesis in melanoma B16/F10.9 by interleukin-6 receptor signaling. *J Biol Chem* 2002;277(17):15132-41.
28. Florenes VA, Lu C, Bhattacharya N, *et al.* Interleukin-6 dependent induction of the cyclin dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 is lost during progression of human malignant melanoma. *Oncogene* 1999;18(4):1023-32.
29. Darnell JE, Jr. Transcription factors as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2002;2(10):740-9.
30. Schuringa JJ, Schepers H, Vellenga E, Kruijer W. Ser727-dependent transcriptional activation by association of p300 with STAT3 upon IL-6 stimulation. *FEBS Lett* 2001;495(1-2):71-6.
31. Lufei C, Koh TH, Uchida T, Cao X. Pin1 is required for the Ser727 phosphorylation-dependent Stat3 activity. *Oncogene* 2007.
32. Jain N, Zhang T, Kee WH, Li W, Cao X. Protein kinase C delta associates with and phosphorylates Stat3 in an interleukin-6-dependent manner. *J Biol Chem* 1999;274(34):24392-400.
33. Koivunen J, Aaltonen V, Peltonen J. Protein kinase C (PKC) family in cancer progression. *Cancer Lett* 2006;235(1):1-10.

34. La Porta CA, Porro D, Comolli R. Higher levels of melanin and inhibition of cdk2 activity in primary human melanoma cells WM115 overexpressing nPKCdelta. *Melanoma Res* 2002;12(4):297-307.
35. Holgado-Madruga M, Emlet DR, Moscatello DK, Godwin AK, Wong AJ. A Grb2-associated docking protein in EGF- and insulin-receptor signalling. *Nature* 1996;379(6565):560-4.
36. Robertson GP. Functional and therapeutic significance of Akt deregulation in malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 2005;24(2):273-85.
37. Bohm M, Schulte U, Funk JO, *et al.* Interleukin-6-resistant melanoma cells exhibit reduced activation of STAT3 and lack of inhibition of cyclin E-associated kinase activity. *J Invest Dermatol* 2001;117(1):132-40.
38. Li Z, Metze D, Nashan D, *et al.* Expression of SOCS-1, suppressor of cytokine signalling-1, in human melanoma. *J Invest Dermatol* 2004;123(4):737-45.
39. Komyod W, Bohm M, Metze D, Heinrich PC, Behrmann I. Constitutive suppressor of cytokine signaling 3 expression confers a growth advantage to a human melanoma cell line. *Mol Cancer Res* 2007;5(3):271-81.
40. Wachulska M, Kozłowska K, Cichorek M. The DNA ploidy and proliferative activity of transplantable melanoma cells in regard to their secretory function. *Neoplasma* 2005;52(4):280-6.
41. Paglia D, Oran A, Lu C, Kerbel RS, Sauder DN, McKenzie RC. Expression of leukemia inhibitory factor and interleukin-11 by human melanoma cell lines: LIF, IL-6, and IL-11 are not coregulated. *J Interferon Cytokine Res* 1995;15(5):455-60.
42. Gervois N, Heuze F, Diez E, Jotereau F. Selective expansion of a specific anti-tumor CD8⁺ cytotoxic T lymphocyte clone in the bulk culture of tumor-infiltrating lymphocytes

from a melanoma patient: cytotoxic activity and T cell receptor gene rearrangements. *Eur J Immunol* 1990;20(4):825-31.

43. Blanchard F, Kinzie E, Wang Y, *et al.* FR901228, an inhibitor of histone deacetylases, increases the cellular responsiveness to IL-6 type cytokines by enhancing the expression of receptor proteins. *Oncogene* 2002;21(41):6264-77.

44. Kim H, Baumann H. The carboxyl-terminal region of STAT3 controls gene induction by the mouse haptoglobin promoter. *J Biol Chem* 1997;272(23):14571-9.

45. Oka M, Kikkawa U. Protein kinase C in melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 2005;24(2):287-300.

46. Park YJ, Park ES, Kim MS, *et al.* Involvement of the protein kinase C pathway in thyrotropin-induced STAT3 activation in FRTL-5 thyroid cells. *Mol Cell Endocrinol* 2002;194(1-2):77-84.

47. Thyrell L, Hjortsberg L, Arulampalam V, *et al.* Interferon alpha-induced apoptosis in tumor cells is mediated through the phosphoinositide 3-kinase/mammalian target of rapamycin signaling pathway. *J Biol Chem* 2004;279(23):24152-62.

48. Merighi S, Benini A, Mirandola P, *et al.* A3 adenosine receptor activation inhibits cell proliferation via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent inhibition of the extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation in A375 human melanoma cells. *J Biol Chem* 2005;280(20):19516-26.

49. Stephens L, Anderson K, Stokoe D, *et al.* Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science* 1998;279(5351):710-4.

50. Partovian C, Simons M. Regulation of protein kinase B/Akt activity and Ser473 phosphorylation by protein kinase Calpha in endothelial cells. *Cell Signal* 2004;16(8):951-7.

51. Kawakami Y, Nishimoto H, Kitaura J, *et al.* Protein kinase C betaII regulates Akt phosphorylation on Ser-473 in a cell type- and stimulus-specific fashion. *J Biol Chem* 2004;279(46):47720-5.
52. Xia S, Forman LW, Faller DV. Protein kinase C delta is required for survival of cells expressing activated p21RAS. *J Biol Chem* 2007;282(18):13199-210.
53. Jacinto E, Facchinetti V, Liu D, *et al.* SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell* 2006;127(1):125-37.
54. Niu G, Bowman T, Huang M, *et al.* Roles of activated Src and Stat3 signaling in melanoma tumor cell growth. *Oncogene* 2002;21(46):7001-10.
55. Wang W, Edington HD, Rao UN, *et al.* Modulation of signal transducers and activators of transcription 1 and 3 signaling in melanoma by high-dose IFNalpha2b. *Clin Cancer Res* 2007;13(5):1523-31.
56. Kojima H, Sasaki T, Ishitani T, *et al.* STAT3 regulates Nemo-like kinase by mediating its interaction with IL-6-stimulated TGFbeta-activated kinase 1 for STAT3 Ser-727 phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(12):4524-9.
57. Wong LH, Krauer KG, Hatzinisiriou I, *et al.* Interferon-resistant human melanoma cells are deficient in ISGF3 components, STAT1, STAT2, and p48-ISGF3gamma. *J Biol Chem* 1997;272(45):28779-85.
58. Wellbrock C, Weisser C, Hassel JC, *et al.* STAT5 contributes to interferon resistance of melanoma cells. *Curr Biol* 2005;15(18):1629-39.
59. Lu C, Sheehan C, Rak JW, Chambers CA, Hozumi N, Kerbel RS. Endogenous interleukin 6 can function as an in vivo growth- stimulatory factor for advanced-stage human melanoma cells. *Clin Cancer Res* 1996;2(8):1417-25.

60. Mouawad R, Khayat D, Merle S, Antoine EC, Gil-Delgado M, Soubrane C. Is there any relationship between interleukin-6/interleukin-6 receptor modulation and endogenous interleukin-6 release in metastatic malignant melanoma patients treated by biochemotherapy? *Melanoma Res* 1999;9(2):181-8.

Table1. Phosphorylation of STAT3, PKC, Akt and ERK in OSM-treated melanoma cells

Melanoma cells (n=34)	Prolif.*	Y-S3 ^{†,‡}	S-S3 ^{†,§}	PKC δ ^{†,}	panPKC ^{†,**}	Akt ^{†,††}	ERK ^{†,‡‡}
Group 1 : no defect							
WM-266-4							
M17							
M200							
M140							
M197							
M254							
M252							
M136							
M110							
M245							
M253							
Group 2 : P-STAT3 Ser727 ⁻							
M182							
M147							
M117							
M153							
M187							
M234							
Group 3 : P-Akt Ser473 ⁻							
M88							
M203							
M138							
M119							
M18							
M8							
M183							
Group 4 : OSMR β ⁻							
M134							
M102							
M47							
M210							
M196							
M170							
M120							
M241							
M128							
M218							

*

<20%	<40%	<80%	≥80%

†

<33%	<75%	<125%	≥125%

*72h cell proliferation assay with OSM at 50 ng/ml. Data are grey-scale-encoded and correspond to the means of growth inhibition by OSM of triplicates cultures, expressed in percentage to OSM-untreated cells, and are representative of 3 independent experiments. [†]Melanoma cells were treated with OSM for 15min at 50 ng/ml. Digital densitometry of the western blots patterns was analyzed with the NIH Image software and OSM-treated WM-266-4 cells served as the 100% internal reference for each phospho-specific antibody. Data are grey-scale-encoded. [‡]P-STAT3 Tyr705. [§]P-STAT3 Ser727. ^{||}P-PKC δ Thr505. ^{**}P-PKC (pan) (BII Ser660). ^{††}P-Akt Ser473. ^{‡‡}P-ERK 1/2 Thr202/Tyr204.

Figure Legends

Figure 1: OSM resistance is associated with phosphorylation defects of STAT3 on Ser727 or Akt on Ser473

(A) Western blots showing OSM and IL-6 (15min, 50 ng/ml each) signaling in 4 cell lines representatives of 4 groups of melanoma cell lines and characterized by their different response on 3 main pathways: STAT3/PKC, Akt and ERK. Equal protein loading was monitored by total STAT3 evaluation in the samples. (B) Mean $\pm$ SEM of inhibition of proliferation by OSM (72h at 50 ng/ml), measured by [3 H] Thymidine incorporation, in the 4 groups of melanoma cells cited in (A). * $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$.

Figure 2: STAT3 and its phosphorylation on Ser727 are necessary for the anti-proliferative activity of OSM

(A, a) Cell proliferation assay (measured by [3 H] Thymidine incorporation) of WM-266-4 (WM) and M254 cells with OSM doses until 50 ng/ml for 24h, after their transfection with negative control (Ct) or STAT3 siRNA. (A, b) Western blots against total STAT3 and ERK1/2 were used to control the efficacy and specificity of STAT3 siRNA after 48h and 72h of transfection. (B) Cell proliferation assay (measured by [3 H] Thymidine incorporation) of WM-266-4 (WM) cells with OSM doses until 50 ng/ml for 24h, after transfection with GFP and either empty (pCMV) (a), STAT3 Δ 55C (b) or STAT3 SA (c) expression vectors, followed by cell sorting for GFP $^{+}$ cells. (B, d) Western blots against total STAT3 were used to control the expression of STAT3 constructs. All Thymidine incorporation data are the means $\pm$ SD of quadruplicate cultures, are expressed as percentage of OSM-untreated cells and are representative of 3 independent experiments. Statistical analyses are shown only for figure 2 (B, c), * $p<0,05$.

Figure 3: PKC δ and/or another isoform of PKC are involved in the phosphorylation of STAT3 on Ser727 and Akt on Ser473

(A, a and b) Cell proliferation assay (measured by [3 H] Thymidine incorporation) of WM-266-4 and M254 cells with OSM doses until 50 ng/ml for 24h, after a 30min preincubation with 0,5 μ M of the inhibitor of PKC α , β and μ : Gö 6976. (A, c and d) Cell proliferation assay (measured by [3 H] Thymidine incorporation) of WM-266-4 and M254 cells with OSM doses until 50 ng/ml for 24h, after their transfection with negative control (Ct) or PKC δ siRNA. All Thymidine incorporation data are the means $\pm$ SD of quadruplicate cultures, are expressed as percentage of OSM-untreated cells and are representative of 3 independent experiments. Statistical analyses are shown only for figure 3 A, c, * $p < 0,05$. (B) Western blots against indicated proteins were used to control the efficacy and specificity of PKC δ siRNA and Gö 6976 (2 μ M).

Figure 4: Stable OSM resistance is induced by long-term treatment of melanoma cells by OSM and IL-6

(A, B) WM-266-4 and M140 cells were pretreated with OSM or IL-6 (10 ng/ml) for 6 weeks, then released from cytokines for 6 additional weeks. Here are presented cell proliferation assays (measured by [3 H] Thymidine incorporation) with 50 ng/ml of OSM for 72h, realized after the 6 weeks of release. Data are the means $\pm$ SD of triplicates cultures and are expressed in counts per minute (cpm) of [3 H] Thymidine incorporation. (C, D) Western blots against the indicated proteins were used to identify the signaling defects in long-term cytokine-pretreated WM-266-4 (C) and M140 cells (D).

Figure 5: OSM is detected only in lymph nodes of melanoma patients whereas other IL-6-type cytokines are detected in lymph nodes and melanoma cells supernatants

(A) Semi-quantitative RT-PCR specific for IL-6-type cytokines was realized on 20 melanoma-invaded lymph nodes (l.n.), 8 non-invaded lymph nodes and 20 melanoma cell lines. The data are expressed as percentage of positive cell lines or lymph nodes. (B, C, D) ELISA specific for IL-6, IL-11 and LIF were realized on supernatants of the 4 groups of melanoma cells. Data are the means $\pm$ SEM of cytokine expression in each group and are expressed in pg/ million of cells. ** $P < 0,01$.

Figure 1

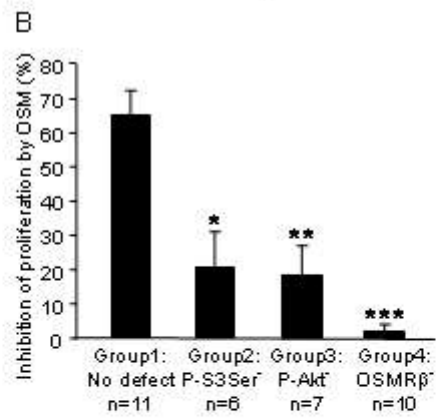
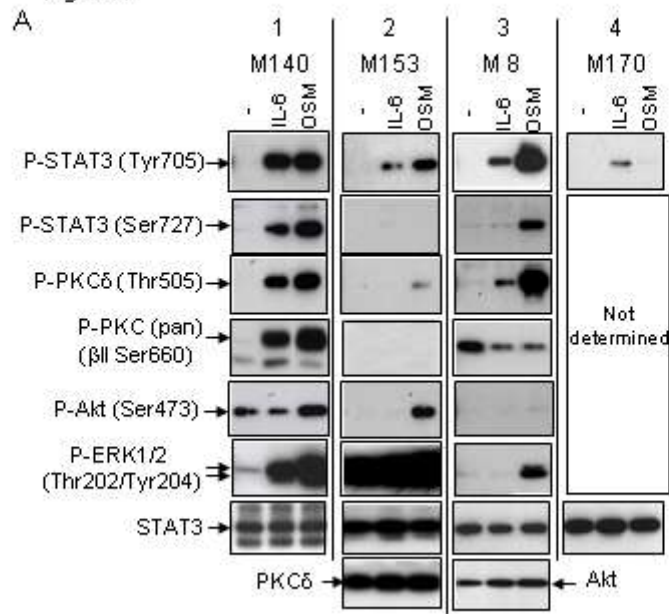
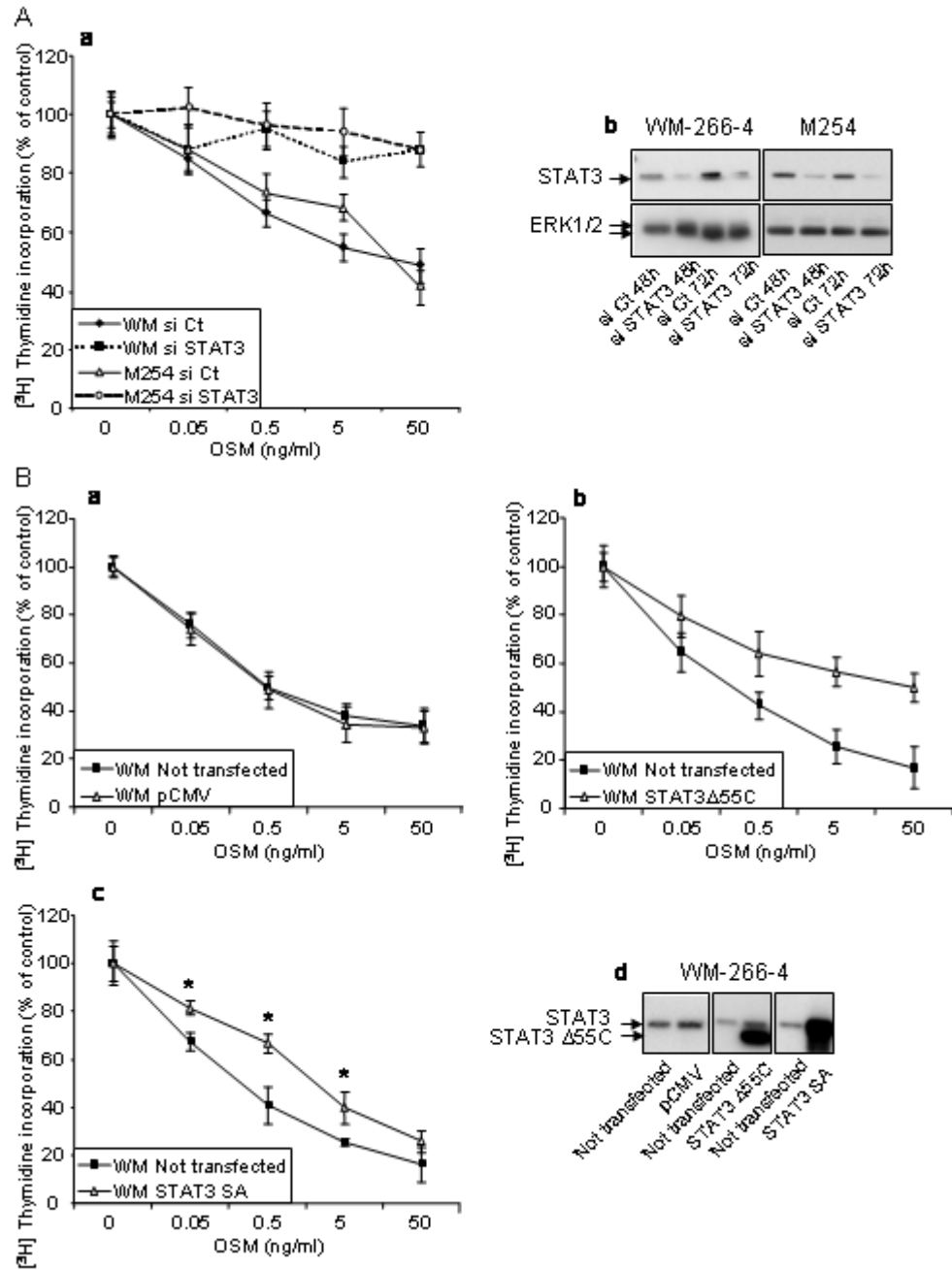


Figure 2



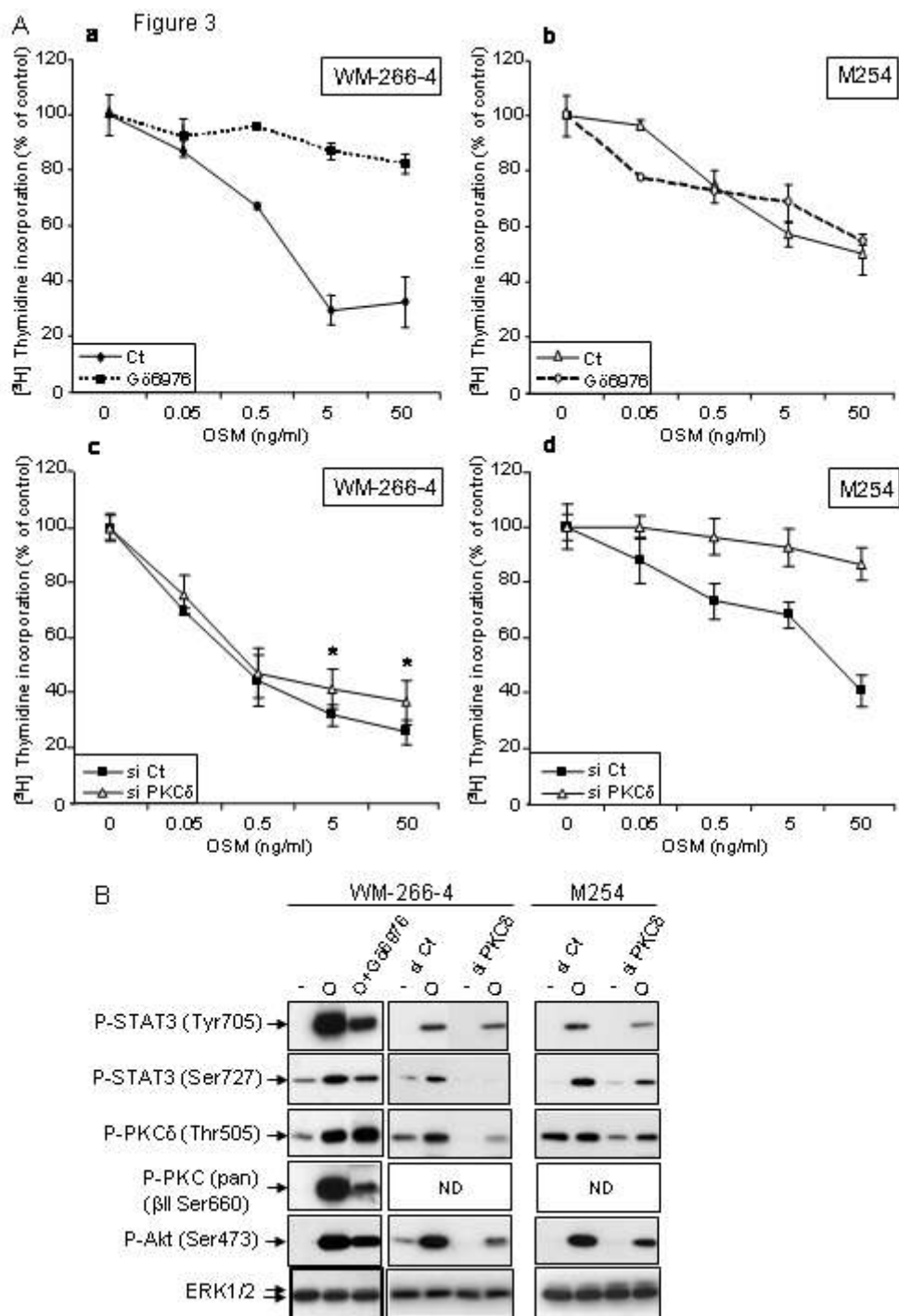


Figure 4

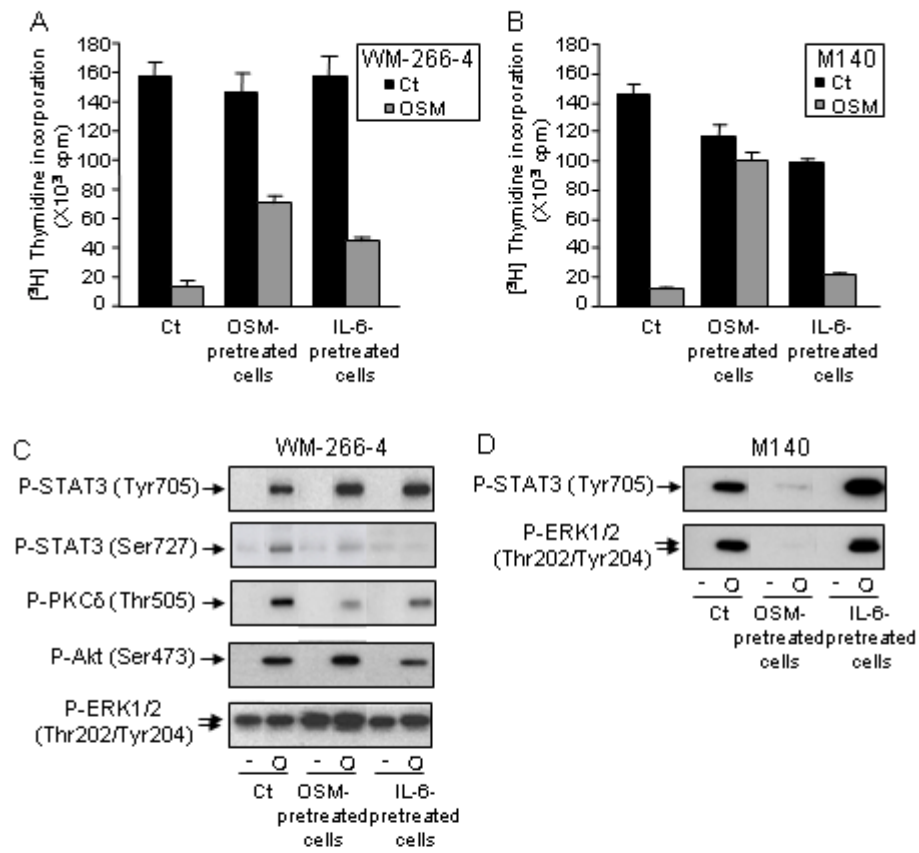
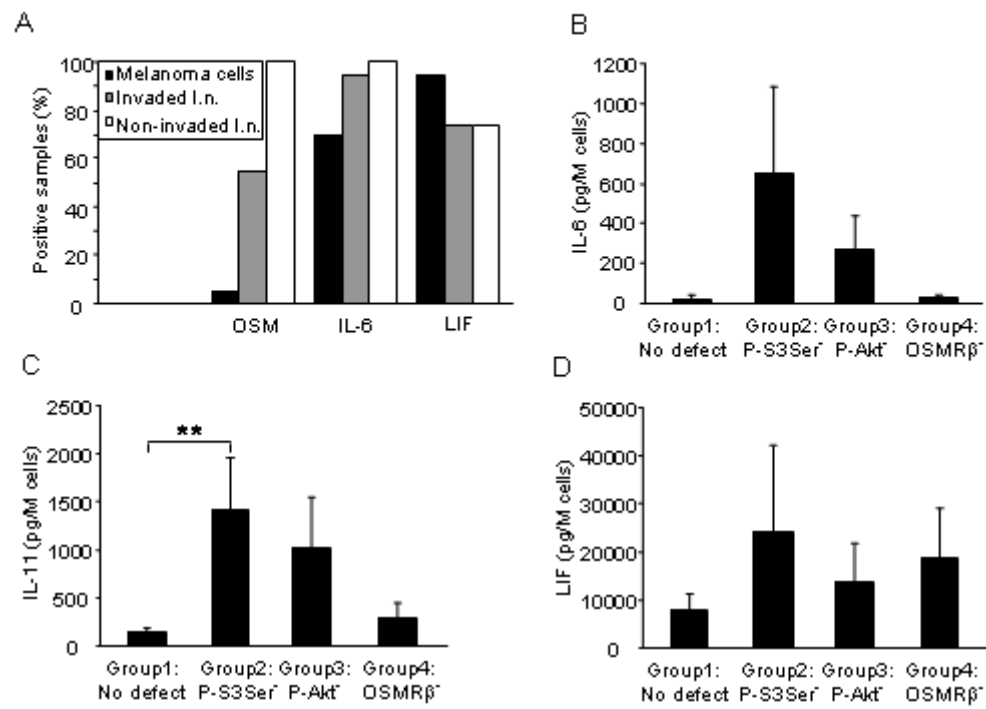


Figure 5



C. Complément de discussion à l'article II

Dans cette étude, nous avons pu compléter l'analyse des mécanismes de résistance des cellules de mélanome à l'OSM sur 33 lignées cellulaires fraîchement isolées à partir de ganglions envahis de patients atteints de mélanome de grade III. En plus de la perte d'expression de l'OSMR β qui se produit dans 30% des lignées, nous avons pu mettre en évidence des défauts de signalisation de l'OSM sur les voies PKC/STAT3 Ser727 ou Akt pour 40% des lignées, et qui sont associés à la résistance à l'OSM. Ces nouveaux défauts de signalisation expliquent pourquoi les cellules de mélanomes sont souvent à la fois résistantes à l'OSM mais aussi à l'IL-6, étant donné que les deux cytokines activent les mêmes voies de transduction du signal. Tout comme la perte de l'OSMR β , ces défauts de transduction sur deux voies complémentaires à la phosphorylation de STAT3 sur la Tyr705, sont distincts des défauts liés à l'expression de récepteurs antagonistes solubles de l'OSMR β et de la gp130 (Diveu et al. 2006; Montero-Julian et al. 1997) ; de la surexpression des suppresseurs de signalisation, comme cela a été montré pour l'IL-6 et l'IFN (Li et al. 2004; Komyod et al. 2007; Wellbrock et al. 2005) ; mais ils sont également distincts de la perte d'expression des STAT, comme cela a été mis en évidence pour l'IFN (Wong et al. 1997; Pansky et al. 2000) ; et enfin ils sont certainement distincts de la répression épigénétique des cibles des STAT, montrée pour l'IL-6 et l'IFN (Florenes et al. 1999; Rodriguez et al. 2007). Des défauts d'activation de STAT1 ou STAT5 ne sont pas responsables de la résistance à l'OSM, puisque ces activations ne sont pas constatées dans nos lignées de mélanome, contrairement à deux études qui montrent la phosphorylation de ces isoformes des STAT dans la lignée de mélanome A375, sans pour autant la corréler à l'activité anti-proliférative de l'OSM (Kortylewski et al. 1999; Auguste et al. 1997). Cette résistance à l'OSM n'est pas non plus causée par l'activation constitutive des molécules à fonctionnement en général pro-tumoral, telles que STAT3, puisqu'elle n'est pas observée dans nos lignées ; ou ERK1/2 et Akt dont l'activation ne corrèle pas avec la résistance à l'OSM ou est inexistante, respectivement.

En utilisant un dominant négatif de STAT3 (STAT3 tronqué en C-terminal ; STAT3 β) et un mutant de STAT3 sur la Ser727 (STAT3 SA), nous avons tout d'abord confirmé le rôle clé de STAT3, et montré pour la première fois l'importance de la phosphorylation de STAT3 sur la ser727 dans l'effet anti-prolifératif de l'OSM. Une association entre la PKC δ et la phosphorylation de STAT3 sur la Ser727 a été mise en évidence dans les lignées résistantes à l'OSM (groupe 2), puis confirmée dans la lignée M254 sensible à l'OSM, grâce à l'utilisation

d'un inhibiteur des PKC et d'ARN interférence ciblée sur la PKC δ , qui engendre une diminution de l'activation de STAT3 sur la Ser727 et une résistance à l'OSM. Dans la lignée WM-266-4 prétraitée à long terme avec l'OSM ou l'IL-6, nous avons également pu montrer ce lien entre la PKC δ et l'activation de STAT3 sur la Ser727. Ainsi, l'activation de la PKC δ par l'OSM permet la phosphorylation de STAT3 sur la Ser727, ce qui entraîne une activité transcriptionnelle maximale de STAT3 sur ses gènes cibles, qui sont certainement des cyclines, des CDK ou des inhibiteurs du cycle cellulaire, comme ceci a été montré (Florenes et al. 1999; Kortylewski et al. 1999). De même, le blocage de l'activité de la CDK2 par PKC δ observé dans la lignée de mélanome WM115 peut justement s'expliquer par le rôle de PKC δ sur l'induction des inhibiteurs du cycle cellulaire (La Porta et al. 2002). Cependant, nous n'avons pas observé d'induction de p21^{WAF1} ou p27^{kip1} dans nos lignées, pourtant bloquées en phase G1 du cycle cellulaire par l'OSM (résultats non montrés). De nouvelles expériences sont maintenant nécessaires afin d'identifier les cibles de STAT3 dans les mélanomes et impliquées dans l'effet anti-prolifératif de l'OSM.

Une association entre d'autres isoformes de PKC et la phosphorylation de STAT3 sur la Ser727 a également été mise en évidence dans les lignées résistantes à l'OSM (groupe 2). L'implication d'une ou plusieurs isoformes de PKC (différentes de la PKC α , β , δ ou μ) dans l'activation de STAT3 sur la Ser727 et l'inhibition de la prolifération, a été ensuite confirmée dans la lignée WM-266-4 grâce à l'utilisation d'un inhibiteur des PKC et d'ARN interférence ciblé sur la PKC α , β et δ , et d'un anticorps anti-phospho-PKC μ . De plus, dans la WM-266-4 et la M254, l'ARN interférence ciblée sur la PKC δ ainsi que l'inhibiteur des PKC non seulement réduisent la phosphorylation de STAT3 sur la Ser727 mais également sur la Tyr705 et réduisent l'activation d'Akt sur la Ser473. Ce lien possible entre les PKC et l'activation de STAT3 sur la Tyr705 et d'Akt sur la Ser473 n'est cependant pas observé dans les lignées de mélanome du groupe 2 et les WM-266-4 prétraitées par l'OSM ou l'IL-6, suggérant un rôle facultatif, secondaire des PKC dans ces activations.

Pour les lignées du groupe 3 déficientes en activation d'Akt sur la Ser473, le lien entre les PKC et cette phosphorylation d'Akt n'est pas observé non plus. Ainsi, pour expliquer la corrélation entre le défaut d'activation d'Akt et la résistance à l'OSM des lignées de mélanome de ce groupe 3, on peut émettre l'hypothèse qu'Akt a une fonction particulière anti-proliférative dans ces lignées, comme cela a été montré (Merighi et al. 2005). Cependant, l'ARN interférence ciblée sur les trois isoformes d'Akt (Akt1, 2 et 3) n'a pas permis d'induire de résistance à l'OSM. Il reste que le défaut d'activation d'Akt peut être corrélé à un défaut au

niveau d'une autre kinase anti-proliférative, autre que les PKC, et potentiellement responsable de la phosphorylation d'Akt sur la Ser473, comme la "rictor-mammalian target of rapamycin" (TORC2) (Jacinto et al. 2006). Dans tous les cas, il faudra trouver les cibles anti-prolifératives de ces kinases afin de comprendre leur implication dans l'activité de l'OSM.

Le traitement à long terme des lignées WM-266-4 et M140 par l'OSM ou l'IL-6 a induit une résistance à l'OSM liée à un défaut de signalisation sur la voie PKC/STAT3 pour la WM-266-4 et à un défaut total de transduction du signal pour la M140, vraisemblablement dû à la perte du récepteur à l'OSM. Nous avons pu montrer que ces cytokines anti-prolifératives peuvent être au contact des cellules de mélanome, soit par leur sécrétion par les cellules du système immunitaire présentes dans les ganglions lymphatiques envahis par les mélanomes (OSM et IL-6), soit par leur production par les cellules de mélanome elles-mêmes (IL-6, IL-11) (Lacrouette 2008a; Wachulska et al. 2005; Paglia et al. 1995). Ces productions d'IL-6 et IL-11 par les cellules de mélanome corrélaient d'ailleurs avec la résistance à l'OSM des groupes 2 (défauts de PKC/STAT3) et 3 (défaut d'Akt) de lignées de mélanome. Nous pouvons donc fortement suggérer que ces cytokines sont responsables d'une pression de sélection sur les cellules de mélanome qui s'exerce sur les voies de signalisation commune aux deux cytokines (WM-266-4) ou spécifiquement sur la signalisation de l'OSM (M140), en jouant certainement sur la répression épigénétique du promoteur de l'*OSMR* β (Lacrouette et al. 2007), facilitée par la surexpression des HDAC (Rothhammer et al. 2007) et la régulation potentielle de ce promoteur par STAT3 (Lacrouette et al. 2007). Afin de confirmer le rôle de l'exposition chronique à l'OSM et l'IL-6 des cellules de mélanome dans l'établissement de la résistance à ces cytokines, des marquages immunohistochimiques de ces cytokines pourraient être réalisés sur les ganglions lymphatiques envahis mais aussi sur les tumeurs primaires correspondantes, puisque les cytokines de type IL-6 sont retrouvées en quantité importante dans la peau lors de réactions inflammatoires (cf. Introduction, paragraphe II, B, 2).

En perspective, et comme mentionné précédemment (cf. discussion article I), il reste à déterminer si la sensibilité/résistance à l'OSM est importante dans le contexte de certains traitements du mélanome, notamment les immunothérapies. Si c'est le cas, la connaissance globale des mécanismes de résistance à l'OSM des lignées de mélanome (perte d'expression de l'*OSMR* β et défauts de signalisation sur les voies PKC/STAT3 et Akt), pourrait permettre d'améliorer ces immunothérapies en les combinant à de nouvelles thérapies visant à réinduire la sensibilité à l'OSM.

Partie 2

La sensibilité à l'Oncostatine M et/ou l'Interleukine-6 des lignées cellulaires issues de mélanome métastatique corrèle avec la survie sans rechute des patients traités par des lymphocytes infiltrant les tumeurs

A. Introduction

Nous avons montré précédemment que la moitié des 33 lignées de mélanome issues de ganglions envahis de patients atteints de mélanome de grade III, était bloquée dans leur prolifération par l'OSM. L'autre moitié de ces lignées de mélanome métastatique est résistante à l'OSM (inhibée dans leur prolifération à moins de 20%). Cette résistance à l'OSM est due à la perte épigénétique de l'OSMR β et/ou à des défauts de signalisation (notamment sur la voie des PKC/STAT3) en réponse à l'OSM (Lacrouette et al. 2007; Lacrouette 2008a). Afin d'évaluer l'importance de la sensibilité et/ou résistance à l'OSM des cellules de mélanome observée *in vitro*, sur l'échappement au système immunitaire, il était nécessaire d'analyser les effets anti-tumoraux de l'OSM *in vivo* et de voir l'impact de cette résistance à l'OSM sur l'issue clinique des patients atteints de mélanome métastatique, comme cela a été observé pour l'IFN γ , le TNF α et l'IL-6 (Boudny et al. 2005; van Horssen et al. 2006; Mouawad et al. 1999).

Dans cette étude, nous avons analysé rétrospectivement l'impact de la résistance des cellules de mélanome aux cytokines anti-prolifératives (OSM, IL-6, IFN γ et TNF α) sur la réponse clinique de 24 patients atteints de mélanome de grade III et traités par des TIL. La sensibilité des cellules de mélanome à l'OSM et/ou l'IL-6 corrèle avec la survie sans rechute des patients, mais pas la sensibilité à l'IFN γ ou au TNF α . Nous montrons que les TIL sont capables de produire l'OSM et l'IL-6 juste avant leur injection aux patients, et dans des souris nude xénogreffées avec des lignées de mélanome humain, nous définissons un effet direct anti-prolifératif de l'OSM (Ki-67) plutôt que pro-apoptotique (TUNEL). Ainsi, la résistance à l'OSM et/ou à l'IL-6 des cellules de mélanome apparaît comme un nouveau mécanisme d'échappement au système immunitaire, représenté par les TIL dans cette étude, qui pourrait être ajouté aux facteurs pronostiques existant pour les patients atteints de mélanome de grade III.

B. Article III

**“La sensibilité à l’Oncostatine M et/ou l’Interleukine-6 des lignées cellulaires issues de mélanome métastatique corrèle avec la survie sans rechute des patients traités par des lymphocytes infiltrant les tumeurs”,
soumis à The American Journal of Pathology.**

L’immunothérapie par transfert adoptif de TIL montre des résultats cliniques prometteurs pour les patients atteints de mélanome de grade III (métastases ganglionnaires), mais certains patients ne répondent pas à ce traitement. Dans cette étude, nous avons analysé rétrospectivement l’impact de la résistance des cellules de mélanome à des cytokines anti-prolifératives sur la réponse clinique de 24 patients atteints de mélanome métastatique et traités par des TIL. La survie sans rechute des patients corrèle significativement avec la sensibilité des cellules de mélanome à l’OSM et/ou l’IL-6, mais pas avec la sensibilité à l’IFN γ ou au TNF α . La sensibilité à l’OSM/IL-6 ne corrèle pas avec les autres facteurs pronostiques connus. De plus, l’OSM et l’IL-6 sont produites par les TIL juste avant leur injection aux patients. Dans des souris immunodéficientes, l’OSM réduit la croissance tumorale de xénogreffes de mélanome humain, cet effet étant direct par l’inhibition de la prolifération des cellules tumorales plutôt que par l’induction de l’apoptose ou de la nécrose. Ainsi, la résistance à l’OSM/IL-6 des cellules de mélanome apparaît comme un nouveau mécanisme d’échappement au traitement par les TIL qui pourrait être ajouté aux autres facteurs pronostiques existant pour les patients atteints de mélanome de grade III. Ce mécanisme d’action pourrait être également important dans d’autres protocoles d’immunothérapie, et pourrait mener à de meilleurs pronostics et traitement anti-cancéreux.

Relationship between responsiveness of cancer cells to Oncostatin M and/or IL-6 and survival of stage III melanoma patients treated with tumor-infiltrating lymphocytes

Aline Lacreusette,^{*†} Audrey Lartigue,^{*†} Jean-Michel Nguyen,[‡] Isabelle Barbieux,^{*†} Marie-Christine Pandolfino,^{*†§} François Paris,^{*†} Amir Khammari,^{*†¶} Brigitte Dréno,^{*†§¶} Yannick Jacques,^{*†} Frédéric Blanchard,^{†||} and Anne Godard,^{*†**}

From the INSERM U892,^{} Centre de Recherche en Cancérologie, Nantes, France ; the Université de Nantes,[†] UFR Médecine, IFR26, Institut de Biologie, Nantes, France ; the PIMESP,[‡] Nantes, France ; the Unit of Cell and Gene Therapy,[§] CHU de Nantes, Nantes, France ; the Unit of Skin Cancer,[¶] CHU de Nantes, Nantes, France; the INSERM ERI7,^{||} Nantes, France; and the Laboratoire de biochimie,^{**} CHU de Nantes, Nantes, France*

Supported by the Ligue contre le Cancer, the Fondation pour la Recherche Médicale, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and the Ministère de la Recherche.

Current address of A. Lartigue: CNRS - UPR2589, Laboratoire Information Génomique et Structurale, Institut de Biologie structurale et Microbiologie, Marseille, France.

Address reprint requests to Aline Lacreusette, INSERM U892, Centre de Recherche en Cancérologie, 9 Quai Moncousu, F-44035 Nantes Cedex 01, France. E-mail : Aline.Lacreusette@univ-nantes.fr

Running head: OSM/IL-6 sensitivity in melanoma patients

Number of text pages: 25, **number of tables:** 1, **number of figures:** 3.

Abstract

Immunotherapy by adoptive transfer of autologous tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) shows promising clinical results for stage III (lymph nodes metastasis) melanoma patients but some of them remain unresponsive. Here we analyzed retrospectively the impact of resistance of melanoma cells to anti-proliferative cytokines on the clinical outcome of 24 TIL-treated metastatic melanoma patients. Patient relapse-free survival significantly correlated with Oncostatin M (OSM) and/or IL-6 sensitivity of melanoma cells, but not with interferon (IFN) γ or tumor necrosis factor (TNF) α sensitivity. OSM/IL-6 sensitivity however did not correlate with other known prognostic factors. Moreover, OSM and IL-6 were produced by TIL just before their injection to patients. In immunodeficient mice, OSM reduced human melanoma xenograft tumor growth, this effect being direct through inhibition of tumor cell proliferation rather than induction of apoptosis or necrosis. Thus, OSM/IL-6 resistance of melanoma cells appears as a new escape mechanism to TIL treatment that could be added to the existing prognostic factors for early stage melanoma patients. This mechanism of action could be also relevant in other immunotherapy protocols, and could lead to better prognosis and anti-cancer treatments.

Introduction

Melanoma is a highly malignant, increasingly common tumor for which treatment failure occurs frequently. The best manner to reduce mortality is early detection and complete surgical excision of early stage melanoma (stage I-II).(Balch et al. 2001) In case of lymph nodes metastases (stage III), there is until today only limited therapeutic options owing to the inherent resistance or escape of melanoma to chemotherapy, targeted therapy and immunotherapy.(Chin et al. 2006; Wolchok et al. 2007) However, evolving knowledge on melanoma genetics and immune regulation, especially for immunotherapy by adoptive transfer of autologous tumor-infiltrating lymphocytes (TIL), showed promising clinical results and significantly ameliorated patients response.(Flaherty 2006; Wrzesinski et al. 2005; Dreno et al. 2002; Khammari et al. 2007) Cytokine-based therapies, using interferon (IFN) α and interleukin (IL)-2, have been approved by the Food and Drug Administration (FDA) for systemic adjuvant therapy in stage II/III and distant metastases (stage IV) melanoma patients respectively. IFN α and IL-2 are also currently under phase II/III investigations like the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and IL-18 in systemic treatments alone, or in combination with chemotherapy and immunotherapy.(Atkins 2006; Kirkwood et al. 2006) Moreover, tumor-targeted cytokines such as the immunocytokine IL-2 linked to anti-disialoganglioside (GD) 2 and the melanoma differentiation-associated gene (MDA)-7/IL-24 showed good phase I results.(King et al. 2004; Fisher et al. 2007) MDA-7/IL-24 not only increased anti-tumor immune responses but induced cancer-selective apoptosis.(Fisher et al. 2007)

Although some clinical trials gave encouraging results, many patients did not respond and the resistance mechanisms of metastatic melanoma seem to be multiple and dependent on the type of treatment. In addition to the usual prognostic factors of the American Joint Committee on Cancer (AJCC) staging system for melanoma,(Balch et al. 2001) the number of

invaded lymph-nodes appeared to be important for the efficiency of autologous TIL plus IL-2 treatment in an adjuvant setting of stage III melanoma patients.(Dreno et al. 2002; Khammari et al. 2007) Two retrospective studies on these patients showed that the specificity of injected TIL also play a role in disease outcome,(Labarriere et al. 2002; Benlalam et al. 2007) as already described.(Kawakami et al. 1995) Furthermore, the presence of regulatory T cells (Treg) has been linked to the resistance of melanoma to immunotherapy(Wrzesinski et al. 2005) and their negative regulation of immune functions could be reinforced by immunosuppressive cytokines produced by the melanoma cells, that also correlated with poor prognosis.(Quereux et al. 2007) Other common immune escape strategies are developed by melanoma cells, like the downregulation of major histocompatibility complex (MHC) class I-II or tumor-associated antigens (TAA), but they are not always associated with patient survival.(Quereux et al. 2007; Hofbauer et al. 2004; van Houdt et al. 2005) Notably, effector functions of immune cells or the efficiency of biochemotherapy are also blocked in melanoma cells, by the expression of an antagonist of granzyme B and an inhibitor of apoptosis survivin, or the downregulation of cell cycle inhibitors respectively.(van Houdt et al. 2005; Takeuchi et al. 2005; Mori et al. 2005) Moreover, disease outcome of metastatic melanoma patients treated with tumor necrosis factor (TNF) α -based isolated limb perfusion significantly correlated with increased expression of a TNF receptor-1 upregulating factor.(van Horssen et al. 2006) Signaling defects of IFN γ treated melanoma cells were associated with bad prognosis for IFN γ therapy,(Boudny et al. 2005) whereas it was not the case for IFN α therapy.(Lesinski et al. 2005) Finally, IL-6 chronically present in the serum of melanoma patients before bio- and/or chemotherapy was correlated with poor survival and more importantly with the loss of IL-6 receptor expression by melanoma cells.(Tartour et al. 1994; Tas et al. 2005; Mouawad et al. 1999) These last results suggest that melanoma cells are not

only able to escape from immune recognition but are also directly influenced by cytokines, with consequences for patients relapse-free survival.

The proliferation of melanocytes and early-stage melanoma cell lines is inhibited *in vitro* by IFN γ , TNF α , IL-6 and Oncostatin M (OSM), another member of the IL-6-type cytokine family, whereas cell lines from metastatic lesions often loose responsiveness to these cytokines, suggesting an important role of these cytokines in the control of melanoma progression.(Bani et al. 1996; Lu et al. 1993) Moreover, beside their immunostimulating properties, several cytokines have proven to be effective in directly restricting melanoma progression *in vivo*. IFN γ had anti-proliferative activities on mouse B16 melanoma cells and soluble IL-6 receptor/IL-6 fusion protein mediated growth inhibition and rejection of B16 melanoma cells.(Yu et al. 2001; Ozbek et al. 2001) Recently, human OSM has been shown to partially inhibit pulmonary mouse B16 melanoma metastases,(Ouyang et al. 2006) however it was presumably due to a leukemia inhibitory factor (LIF) -like effect, another IL-6-type cytokine sharing a receptor with OSM.

OSM is a multifunctional cytokine, produced mainly by activated T lymphocytes, and implicated in fetal and adult hematopoiesis and in extrathymic lymph nodes lymphopoiesis. OSM has also been shown to induce leucocyte adhesion and the production of pro-inflammatory cytokines and proteins in several cell types such as endothelial cells, hepatocytes, and keratinocytes.(Tanaka et al. 2003; Boniface et al. 2007; Sugaya et al. 2006) Furthermore, OSM is able to regulate the proliferation and/or differentiation of these previous cell types and more interestingly, OSM is the most active IL-6-type cytokine in inhibiting the proliferation of cell lines derived from numerous solid tumor such as melanoma.(Grant et al. 1999; Tanaka et al. 2003; Lu et al. 1993) Although the proliferation of half of melanoma cells was inhibited by OSM, we recently demonstrated that the other half of our 33 metastatic melanoma short-term cultures, is resistant to OSM (until around 20% of growth inhibition).

This OSM-resistance was due to the epigenetic loss of the specific OSM receptor β (OSMR β) and/or signaling defects (most notably in the PKC/STAT3 pathway) in response to OSM,(Lacreusette et al. 2007) (Lacreusette et al., submitted). Consequently, it would be important to determine if OSM-resistance correlates with the clinical outcome of metastatic melanoma patients and to better define the anti-cancer effect of OSM *in vivo*.

Here, we analyzed retrospectively the potent association between the resistance of melanoma cells to anti-proliferative cytokines (OSM, IL-6, IFN γ and TNF α) and the clinical outcome of 24 stage III melanoma patients enrolled in a previously described phase II/III clinical trial and treated with TIL plus IL-2. OSM and/or IL-6 sensitivity of melanoma cells appeared to correlate with patient relapse-free survival, but not IFN γ or TNF α sensitivity. We show that TIL were able to produce OSM and IL-6 just before their injection to patients and in nude mice xenografted with human melanoma tumors, we defined a direct growth inhibitory effect of OSM, acting on cell proliferation (Ki-67) rather than apoptosis (TUNEL). Thus, OSM/IL-6 resistance of melanoma cells appears as a new escape mechanism to host immune attack, which could be added to the existing prognostic factors at early stage of melanoma.

Materials and Methods

Melanoma cells, cell proliferation assay and reagents

We used 24 metastatic melanoma short-term (under 10 subcultures) cell cultures, established from tumor-invaded lymph nodes of stage IIIB and IIIC (AJCC(Balch et al. 2001)) melanoma patients (Unit of Skin Cancer, CHU Nantes), treated with TIL plus IL-2 in a phase II/III clinical trial.(Khammari et al. 2007; Dreno et al. 2002; Pandolfino et al. 2001) The cell lines

were established before any patient treatment and were maintained in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal calf serum and 2mM L-glutamine (Sigma, Lyon, France).

For cell proliferation assays, recombinant human OSM, IL-6, IFN γ or TNF α (R&D Systems, Lille, France) at 50 ng/ml each, were incubated with cells for 72h and [3 H] Thymidine incorporation was measured, as described previously.(Blanchard et al. 2002)

Production of OSM and IL-6 by TIL

TIL culture method has been previously reported.(Dreno et al. 2002; Labarriere et al. 2002) Briefly, the isolation of TIL from fragments of stage III melanoma-invaded lymph nodes began with their culture in X-vivo 15 serum-free medium (Biowhittaker, Walkersville, MD, USA) containing 150 IU/ml recombinant IL-2 (Eurocetus, Rueuil-Malmaison, France) for 10 to 14 days. Then, *ex-vivo* expanded TIL prepared for the injection were obtained by culturing them for 10 days with irradiated feeder cells in IL-2 medium, containing phytohemagglutinin for 2 days (Difco, Detroit, MI, USA), and for additional 10 days with IL-2 medium only. TIL expansion was performed in the Unit of Cell and Gene Therapy, CHU Nantes. In this study, we cultured for 3 days in IL-2 medium the available cryopreserved TIL of 9 patients (over the 24), as well as 5 fresh TIL of patients enrolled in another clinical trial, just before their injection. TIL supernatants were then collected and subjected to ELISA kits specific for human OSM (detection limit: 30 pg/ml, R&D Systems) and human IL-6 (detection limit: 15 pg/ml, Biosource, Nivelles, Belgium).

Recombinant human OSM expression and purification

The expression vector pGEX-3c-OSM, subcloned from a pGEX-2T containing human OSM cDNA, was modified to include a rhinovirus 3c protease recognition sequence between glutathione-S-transferase (GST) and OSM cDNA, and was a kind gift from Dr

Staunton.(Staunton et al. 1998) The mature form of human OSM (amino acids 1-196) was expressed as a GST fusion protein in BL21 *Escherichia Coli*, under 0,2 mM IPTG (Sigma) at 28°C for 15 hours. The clarified bacterial lysate was subjected to a first step of purification of the GST-OSM fusion protein on a affinity GSTPrep column (GE Healthcare Europe GmbH, Orsay, France) by the use of 10 mM reduced glutathione, pH 8 (Sigma). The GST-OSM eluate was then dialyzed against a cleavage buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7 (sigma)) and cleaved for 4 hours at 4°C using PreScission Protease (GE Healthcare). The digested sample was submitted to a second step of purification on a GSTPrep column, to separate OSM from GST. After a dialysis against 20 mM sodium citrate, 100 mM NaCl, pH 4, a third step of purification, on a ion exchange RESOURCE S column (GE Healthcare), recovered OSM by the use of 20 mM sodium citrate, 1M NaCl, pH 4. All the purification steps were controlled on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. A last dialysis against phosphate-buffered saline (PBS), concentration and 0,22 µm filtration of OSM, allowed us to check the final concentration using bicinchoninic acid assay (Perbio Science, Brebières, France), the 98% purity using the Protein 200 Plus Assay from Agilent Technologies (Massy, france) and a level of endotoxin <1 EU/µg OSM (Cambrex, Verviers, Belgium). Using the cell proliferation assay, we finally checked on the melanoma cells, that the anti-proliferative activity of our recombinant human OSM is the same as OSM from R&D Systems.

Human melanoma xenograft tumors in nude mice

Mice were housed at the animal facility of INSERM U601, approved by the French Association for Accreditation of Animal Care Laboratories. All experiments were performed in accordance with the institutional guidelines of the French Ethical Committee and under the supervision of authorized investigators. 16 female nude mice Rj: NMRI-Nu (Nu/Nu), 8 weeks

old, from Elevages Janvier (Le Genest Saint Isle, France) were challenged subcutaneously with either OSM-sensitive (OSMR β^+) melanoma cells (M200: 4,5.10⁶ cells/mouse, M245: 2,5.10⁶ cells/mouse, M254: 7,5.10⁶ cells/mouse) or OSM-resistant (OSMR β^-) melanoma cells (M102 and M134: 6.10⁶ cells/mouse each). Once the tumor had reached 100 mm³, at least 10 mice were randomized and subdivided in 2 groups: the control PBS or treated OSM group. Mice received 10 μ g of recombinant human OSM intraperitoneally (I.P.) daily. Animals were weighted twice a week and caliper measurements determined the tumor volume according to the formula $1 \times L \times T \times \Pi/6$, where l, L and T are respectively the smallest, largest perpendicular tumor diameters and the thickness of the tumor.

We also determined the half-life of human OSM after I.P. injections of 10 μ g OSM in 5 tumor-free nude mice. Blood was drawn intermittently from the retro-orbital vein and sera were subjected to a specific human OSM ELISA (R&D Systems). For red and white blood cells and platelets counting, we collected one blood sample per week during PBS or OSM-treatment of 5 tumor-free mice per group, and these samples were subjected to an hematology analyzer (Melet Schloesing Laboratories, Osny, France).

Immunohistochemistry

At the end of the experiments, mice were sacrificed by cervical dislocation, their tumor excised, fixed in paraformaldehyde (PFA) 4% (Sigma) and embedded in paraffin. All the melanoma cells injected in mice in this study were first assessed for OSMR β expression *in vivo*, as described previously.(Lacreusette et al. 2007) Then, 5 μ m sections of PFA-fixed, paraffin-embedded OSM-sensitive (OSMR β^+) melanoma tumors (M200 and M245) and OSM-resistant (OSMR β^-) tumors (M102) treated with either PBS or OSM, were evaluated for their Ki-67 mitotic index expression or submitted to Terminal deoxynucleotidyl transferase

dUTP Nick End Labelling (TUNEL) assay, specific for the apoptosis-linked DNA fragmentation.

For the Ki-67 staining, after heat-induced epitope retrieval in 10 mM sodium citrate pH 6 and endogenous peroxidases blocking (DakoCytomation, Trappes, France), sections were incubated for 1 hour with mouse antihuman Ki-67 antigen (clone MIB-1, DakoCytomation) diluted 1/50 in PBS-bovine serum albumine (BSA, Sigma) 0,1% or with mouse immunoglobulins (Ig) G (Sigma) as a negative control. The rinsed sections were then incubated for 30 min with 1/2 dilution of biotinylated goat antimouse Ig (DakoCytomation). Immunostaining for Ki-67 antigen was revealed using streptavidin-horseradish peroxidase and diaminobenzidine (DAB) plus (Dakocytomation), and nuclei were counterstained with Mayer's Hemalun.

For TUNEL assay, tumor sections were permeabilized by 20 µg/ml Proteinase K digestion (Sigma) for 30 min at 37°C in 10 mM Tris-HCl, pH 8. Then, after endogenous peroxidases blocking, sections were incubated with TUNEL Enzyme for 1 hour at 37°C or with TUNEL Label Mix only as a negative control (Roche Diagnostics, Meylan, France). The TUNEL Enzyme targeting of fragmented DNA was revealed using TUNEL Peroxidase antibody incubation on sections for 30 min at 37°C (Roche) and DAB plus, and nuclei were counterstained with Mayer's Hemalun. Of note, we also incubated tumor sections with 1500 U/ml Dnase I (Roche) for 10 min in 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mg/ml BSA, pH 7,5, just after Proteinase K digestion, for a positive control of the TUNEL assay.

For quantification of Ki-67 and TUNEL staining, 4 representatives tumors per group of mice were selected and on each tumor, 7 representatives fields (700 cells) were evaluated for their positive nuclei staining.

Statistical analyses

Patients relapse-free and overall survival probabilities were estimated by the Kaplan–Meier method. Log rank and likelihood ratio tests were used to assess the effect of each cytokine. Other data are represented as mean $\pm$ standard deviation (SD). The effect of PBS and OSM on human melanoma growth in mice were compared using the Mixed Model for Longitudinal Repeated Data. Correlations between continuous data were accessed using the Spearman and Pearson test. Continuous data were compared using the Mann-Whitney test and the Wilcoxon test. Categorical data were compared using the Fisher test. A value of $P < 0,05$ was considered as significant.

Results

Melanoma cells responsiveness to OSM and/or IL-6 is correlated with relapse-free and overall survival of patients treated with autologous TIL

The metastatic melanoma short-term cultures, that we previously used for the description of OSM-resistance mechanisms, were derived from tumor-invaded lymph nodes of stage III melanoma patients,(Lacreusette et al. 2007) (Lacreusette et al., submitted). After lymph node resection, patients were included in a phase II/III clinical trial, where autologous TIL were administrated in an adjuvant setting. TIL transfer significantly ameliorated the clinical outcome but some patients still relapsed after this treatment.(Dreno et al. 2002; Labarriere et al. 2002; Khammari et al. 2007) To determine if resistance of melanoma cells to growth inhibition by cytokines *in vitro* could be correlated with the clinical outcome of the corresponding TIL-treated melanoma patients,(Dreno et al. 2002; Labarriere et al. 2002; Khammari et al. 2007) we retrospectively (median follow up of 10 years) analyzed patient relapse-free and overall survival in various groups of cytokine sensitive or resistant melanoma

cells. On the 44 patients treated with autologous TIL, 24 cell lines were established and analyzed for growth inhibition by OSM, IL-6, IFN γ and TNF α . We used a threshold of 20% of inhibition of proliferation to discriminate between the cytokine-sensitive and cytokine-resistant melanoma cell lines (table 1). This choice was based on experiments reproducibility, an inhibition of less than 20% being not statistically significant (see table 1 footnotes). So, 54% of the melanoma cell lines were sensitive to OSM (ranging from 21 to 89% of growth inhibition) and the other half was resistant to OSM (ranging from -7 to 19% of growth inhibition) (table 1 and data not shown). The majority of the OSM-sensitive cell lines were also sensitive to IL-6 (62% of cells) whereas only 36% of OSM-resistant cells remained sensitive to IL-6 (table 1). Thus, OSM and IL-6 sensitivity appeared well correlated (Figure 1C; $p=0.01$), as we previously showed.(Lacreusette et al. 2007) There was a higher percentage of TNF α -sensitive cell lines in the OSM-resistant group (64% in comparison to 46% in the OSM-sensitive group; table 1) but this was not statistically significant. We observed only five IFN γ -resistant cell lines and therefore a high percentage (around 80%) of IFN γ -sensitive cells were found in both the OSM-sensitive and -resistant group (table 1).

As shown in figure 1A and B, neither OSM nor IL-6 sensitivity were significantly correlated with patient relapse-free survival. However, OSM and IL-6 are closely related cytokines sharing the gp130 receptor subunit(Grant et al. 1999) and their growth inhibitory activity were significantly correlated in melanoma (figure 1C; $p=0.01$). Therefore, we analyzed the relapse-free survival of patients whose corresponding melanoma cell line was growth inhibited by OSM or IL-6 or both cytokines. By doing so, we added 4 patients sensitive to IL-6 but resistant to OSM to the OSM-sensitive group (encircled patients in figure 1C) and obtained a good correlation between OSM/IL-6 sensitivity and the relapse-free survival ($p=0.007$; figure 1D). Similar results were obtained when the overall survival was taken into account ($p=0,016$), since all the patients who relapsed, then died during the

observation course (data not shown and reference(Khammari et al. 2007)). Using Cox modelling of continuous percentages of growth inhibition, we obtained again a correlation between OSM/IL-6 sensitivity and the overall survival of patients ($p=0.023$). On the contrary, IFN γ and TNF α sensitivity of melanoma cell lines were not correlated with patient relapse-free survival (figure 1E and F). We also looked for an association between cytokines sensitivity and melanoma characteristics known to have a prognostic significance: Breslow thickness, clark stage, ulceration, capsular effraction and the number of detectable positive lymph nodes,(Balch et al. 2001; Dreno et al. 2002) but we could not observe a correlation between these factors and cytokines sensitivity.

Production of OSM and IL-6 by injected TIL

OSM and IL-6 are known to be produced by activated lymphocytes,(Tanaka et al. 2003; Grant et al. 1999) suggesting that the injected TIL could produce these cytokines to inhibit melanoma proliferation. After *ex-vivo* expansion in presence of IL-2, aliquots of TIL prepared for the administration to patients were cryopreserved, then phenotypically and fonctionally analyzed. TIL were composed of CD4 $^{+}$ and CD8 $^{+}$ T cells and the majority of them were able to produce IFN γ and TNF α in presence of autologous melanoma cells(Pandolfino et al. 2001). Therefore, we evaluated the production of OSM and IL-6 by the TIL of nine patients, the other being not available. We used the cryopreserved TIL and after three days of culture in presence of IL-2, we detected OSM and IL-6 in the supernatants of TIL corresponding to the OSM-sensitive (n=3) or -resistant melanoma cell line (n=6), without a significant difference (table 1). Of note, we also detected OSM (mean = 2906 pg/million of cells) and higher level of IL-6 (mean = 97 pg/million of cells) in five supernatants of fresh TIL cultures just before their injection to patients enrolled in another clinical trial. Thus, we observed OSM and IL-6

production by TIL just before their administration to patients, suggesting that part of the TIL efficacy rely on production of these growth inhibitory cytokines.

Direct inhibition of human melanoma growth in immunodeficient mice by OSM

Previous studies demonstrated that IL-6 was able to inhibit melanoma growth in mice.(Ozbek et al. 2001) To sustain our finding that OSM was also a major growth inhibitory cytokine for melanoma cells and thus could have an important role on patient response to TIL treatment, we studied the effect of human OSM on the growth of human melanoma cells injected subcutaneously in nude mice. We first confirmed that the OSM-sensitive and -resistant melanoma cells indeed expressed or not the OSMR β respectively (detected by immunohistochemistry) (references(Lacreusette et al. 2007), (Lacreusette et al., submitted) and data not shown). As shown in figure 2A and B, daily I.P. injection of OSM (10 μ g) significantly delayed tumor growth of the OSM-sensitive (OSMR β^+) M200 and M245 cells, the mean reduction of tumoral volume at the end of the experiment being 46% and 59%, respectively. Similar results were obtained with a third OSM-sensitive tumor (M254, data not shown). In contrast, there was no significant effect of OSM for mice bearing OSM-resistant (OSMR β^-) M102 and M134 tumors (figure 2C and D).

Of note, we analyzed by ELISA the serum concentrations of OSM after I.P. injection and determined a half-life of three hours (data not shown), significantly higher than the half-life of 45 minutes observed after intravenous injection of OSM.(Wallace et al. 1995) Red blood cells, white blood cells and platelets counts as well as the weight of mice remained unchanged during the course of OSM-treatments in comparison to control, PBS-injected mice (data not shown), a result different from previous studies showing an increase of platelets numbers by OSM.(Wallace et al. 1995) Thus, in a nude mice model we could demonstrate an

inhibition of human melanoma growth by OSM, this *in vivo* effect being restricted to OSMR β^+ melanoma xenograft tumors.

Anti-proliferative activity of OSM on human melanoma in mice

To go further in the mechanisms of melanoma growth inhibition by OSM *in vivo*, we analyzed the mitotic index and the apoptosis-linked DNA fragmentation, by the detection of Ki-67 and the use of TUNEL assay in immunohistochemistry, respectively. As shown in figure 3A, OSM-treated M245 tumors had a reduced number of nuclear staining for Ki-67 (b) in comparison to PBS-treated tumors (a). These results were confirmed by quantification of the Ki-67 staining on M245 and M200 OSM-sensitive tumors, which showed a significant 14% and 40% reduced number of Ki-67 positive cells between PBS and OSM condition, respectively (figure 3B). On the contrary, the OSM-resistant M102 tumors did not show any difference of Ki-67 staining between PBS and OSM condition (figure 3B). Concerning the TUNEL assay, no difference of nuclear staining could be observed between PBS and OSM-treated M245 tumors (figure 3A, c and d), as well as for M200 and M102 tumors (data not shown). Similarly, necrosis of the tumors was not modified by OSM treatment (data not shown). Therefore, OSM induced a growth delay of human OSMR β^+ melanoma by acting negatively on cell division rather than by inducing apoptosis.

Discussion

In this study, we demonstrate a strong relationship between sensitivity of melanoma cells to OSM and/or IL-6, two cytokines produced by TIL, and relapse-free survival of stage III melanoma patients treated with TIL, probably due to a direct inhibition of human melanoma growth by OSM and/or IL-6 through restriction of cancer cell proliferation.

As we already described,(Lacreusette et al. 2007) OSM is more active than IL-6 to inhibit melanoma proliferation *in vitro*, whereas other IL-6 type cytokines such as LIF or IL-11 are ineffective. OSM and IL-6 sensitivity of the 24 melanoma cell lines used here were significantly correlated. This link was certainly due to common signaling defects in response to both cytokines (Lacreusette et al., submitted), but there was also a specific loss of OSMR β in some melanoma cells,(Lacreusette et al. 2007) explaining that 36% of the cell lines (four melanoma cell lines) were OSM-resistant but remained sensitive to IL-6. So, taking into account these four IL-6-sensitive cell lines in addition to the OSM-sensitive ones, we could show a significant correlation between OSM and/or IL-6 sensitivity and the relapse-free and overall survival of TIL-treated patients. These results are concordant with previous studies showing a correlation between loss of IL-6 receptor expression by melanoma cells and poor survival after biochemotherapy(Mouawad et al. 1999) and confirm that OSM and IL-6 are closed and redundant cytokines to inhibit melanoma progression, as described in other cell or tissue models.(Tanaka et al. 2003; Grant et al. 1999) Interestingly, OSM/IL-6 sensitivity of melanoma cells was not correlated with other prognostic factors such as number of invaded lymph nodes,(Dreno et al. 2002; Khammari et al. 2007) specificity of injected TIL(Labarriere et al. 2002) and the production of immunosuppressive cytokines by melanoma cells,(Quereux et al. 2007) suggesting that the OSM/IL-6 sensitivity could be a new independent prognostic factor. However, over the 17 patients in the OSM/IL-6-sensitive group, nine patients survived but eight relapsed and died rapidly. The absence of response for these patients was not explained by a higher number of invaded lymph nodes, the non-specificity of TIL or a more important production of immunosuppressive cytokines in comparison to the responsive patients (data not shown). Another potential cause of the partial failure of adjuvant TIL+IL-2 treatment in the OSM/IL-6-sensitive group could be the lack of *in vivo* persistence of TIL, like it has been described.(Robbins et al. 2004; Shen et al. 2007)

On the contrary, TNF α and IFN γ sensitivity of melanoma cells were not correlated with TIL-treated patient relapse-free survival, that is different from what has been observed during TNF α or IFN γ treatment respectively.(van Horssen et al. 2006; Boudny et al. 2005) Moreover, OSM and/or IL-6 sensitivity of melanoma cells were involved in patient relapse-free and overall survival after TIL+IL-2 treatment is given but not before any treatment (see results). So, the treatment context seems to be important for the impact of cytokine sensitivity of melanoma cells on patient response. For OSM/IL-6 sensitivity of melanoma cells to be consistent, the production of high doses of OSM and IL-6 by injected TIL should be as relevant as their *in vivo* maintenance in a proliferative and activated state in presence of IL-2. It would be interesting to evaluate the power of discrimination of OSM/IL-6 sensitivity between responders and non-responders stage III melanoma patients in other immunotherapy protocols.

In immunodeficient mice, OSM inhibits human melanoma growth by acting negatively on cell proliferation, as shown by a weaker percentage of Ki-67 positive cells in the OSM-treated tumors, whereas apoptosis (TUNEL staining) and necrosis were equivalent in both OSM and PBS-treated tumors. This anti-proliferative activity of OSM could be due to the induction and stabilization of negative regulators of the cell cycle, the cyclin-dependent kinase (cdk) inhibitors p21^{WAF1/CIP1} and p27^{Kip1}, as shown *in vitro*.(Florenes et al. 1999; Kortylewski et al. 1999) However, in our melanoma cells cultures, we could not observe an induction of these cell cycle inhibitors in response to OSM but the cells were effectively blocked in the G1 phase of the cell cycle (data not shown).

It is also important to note that human OSM injected to mice is not supposed to bind to the mouse OSM receptor composed of the gp130 and OSMR β subunits, but will activate the mouse LIF receptor composed of gp130 and LIFR α subunits.(Grant et al. 1999) In contrast, the human melanoma xenograft tumors will respond to human OSM through either the human

LIF receptor or the human OSM receptor when expressed. Since human OSM does not modulate the growth of human OSMR β ⁻ tumors (M102 or M134 cells) in mice, our results indicate that growth inhibition by OSM is direct and depend on OSMR β expression by the tumor cells. Moreover, we could not detect any side effect or toxicity of human OSM in nude mice, so we can argue that activation of the mouse LIF receptor by human OSM in other tissues was not highly toxic. In contrast, we observed that mouse OSM is highly toxic in rodents(Brounais) whereas human OSM in monkeys induces inflammation, transient increase in body temperature and thymic lymphoid depletion.(Loy et al. 1999) Similar observations on inflammation have been made for IL-6 in phase I clinical trials.(Olencki et al. 2000) In this context, a local OSM and IL-6 production by TIL in the tumor microenvironment would restrict the unwanted side effects of these cytokines.

In conclusion, the melanoma xenograft tumor models used here clearly indicate that OSM directly inhibits tumor proliferation but clinical trials including pharmacological studies are required to clearly describe the potent benefits of systemic OSM in humans. This finding, together with the IL-6-mediated growth inhibition and rejection of mouse B16 melanoma cells in mice,(Ozbek et al. 2001) highly suggest a role of these cytokines produced by T lymphocytes as anti-cancer agents and thus probably contribute to the relapse-free and overall survival of stage III melanoma patients treated with TIL. Although this relationship needs to be confirmed on larger cohorts of patients, OSM/IL-6 resistance of melanoma cells appears as a new escape mechanism to host immune attack, that could be added to the existing independent prognostic factors. For the patients non-responsive to immunotherapy, it will be important among other things to reinstate the OSM/IL-6 sensitivity of melanoma cells by the re-expression of OSMR β (Lacreusette et al. 2007) or the re-establishment of specific signal transduction pathways (Lacreusette et al., submitted).

Acknowledgments

We thank Catherine Saï-Maurel, Sylvia Lambot and Sandrine Minault for their technical assistance with mice experiments.

Figure legends

Figure 1. Responsiveness of melanoma cells to OSM and/or IL-6 correlates with relapse-free survival of patients treated with TIL.

Probability of relapse-free survival for 24 TIL+IL-2-treated stage III melanoma patients in relation with the sensitivity of their melanoma cells to OSM (**A**), IL-6 (**B**), OSM and/or IL-6 (**D**), IFN γ (**E**) and TNF α (**F**). (**C**) Dot plot and tendency curve representation of the correlation between OSM and IL-6 sensitivity of melanoma cells, each expressed in percentage of inhibition of proliferation to the non-treated cells. Encircled cell lines are the 4 cell lines sensitive to IL-6 but resistant to OSM that were added to the OSM sensitive group to obtain the OSM and/or IL-6 sensitive group in D. See table 1 footnotes for a description of the proliferation assay and the threshold used to discriminate between sensitive and resistant cell lines. Statistical significance (p) is indicated for each panel.

Figure 2. Direct inhibition of human melanoma growth in immunodeficient mice by OSM.

The human melanoma cells either OSM-sensitive (OSMR β^+): M200 (**A**) and M245 (**B**), or OSM-resistant (OSMR β^-): M102 (**C**) and M134 (**D**), were subcutaneously injected in nude mice. Once the tumor had reached 100 mm³ (time=0), 10 μ g OSM or PBS was administrated I.P. daily. Data are the means $\pm$ SD of the tumor volume of n=6 M200 tumors (**A**), n=8 M245

tumors **(B)**, n=8 M102 tumors **(C)**, n=6 M134 tumors **(D)**, and are representatives of 2 independent experiments. Statistical significance (p) is indicated for each panel.

Figure 3. Anti-proliferative activity of OSM on human melanoma in mice.

(A) Immunohistochemical Ki-67 staining (a, b) and TUNEL assay (c, d) for the PBS or OSM-treated, OSM-sensitive M245 tumor. Nuclei were counterstained with Mayer's Hemalun. Original magnification x 25. **(B)** Quantification of Ki-67 staining for PBS or OSM-treated, OSM-sensitive tumors (M200 and M245) and OSM-resistant tumors (M102). Data are the means $\pm$ SD of the percentage of Ki-67 positive cells, for representative fields of 4 tumors per group of mice. * p= 0,037, *** p<0,0001.

References

1. Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, Fleming ID, Gershenwald JE, Houghton A, Jr., Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MF, Morton DL, Reintgen DS, Ross MI, Sober A, Thompson JA, Thompson JF: Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 2001, 19:3635-3648
2. Chin L, Garraway LA, Fisher DE: Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era. *Genes Dev* 2006, 20:2149-2182
3. Wolchok JD, Saenger YM: Current topics in melanoma. *Curr Opin Oncol* 2007, 19:116-120
4. Flaherty KT: Chemotherapy and targeted therapy combinations in advanced melanoma. *Clin Cancer Res* 2006, 12:2366s-2370s
5. Wrzesinski C, Restifo NP: Less is more: lymphodepletion followed by hematopoietic stem cell transplant augments adoptive T-cell-based anti-tumor immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 2005, 17:195-201
6. Dreno B, Nguyen JM, Khammari A, Pandolfino MC, Tessier MH, Bercegeay S, Cassidanius A, Lemarre P, Billaudel S, Labarriere N, Jotereau F: Randomized trial of adoptive transfer of melanoma tumor-infiltrating lymphocytes as adjuvant therapy for stage III melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 2002, 51:539-546
7. Khammari A, Nguyen JM, Pandolfino MC, Quereux G, Brocard A, Bercegeay S, Cassidanius A, Lemarre P, Volteau C, Labarriere N, Jotereau F, Dreno B: Long-term follow-up of patients treated by adoptive transfer of melanoma tumor-infiltrating lymphocytes as adjuvant therapy for stage III melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 2007, 56:1853-1860
8. Atkins MB: Cytokine-based therapy and biochemotherapy for advanced melanoma. *Clin Cancer Res* 2006, 12:2353s-2358s
9. Kirkwood JM, Moschos S, Wang W: Strategies for the development of more effective adjuvant therapy of melanoma: current and future explorations of antibodies, cytokines, vaccines, and combinations. *Clin Cancer Res* 2006, 12:2331s-2336s
10. King DM, Albertini MR, Schalch H, Hank JA, Gan J, Surfus J, Mahvi D, Schiller JH, Warner T, Kim K, Eickhoff J, Kendra K, Reisfeld R, Gillies SD, Sondel P: Phase I clinical trial of the immunocytokine EMD 273063 in melanoma patients. *J Clin Oncol* 2004, 22:4463-4473
11. Fisher PB, Sarkar D, Lebedeva IV, Emdad L, Gupta P, Sauane M, Su ZZ, Grant S, Dent P, Curiel DT, Senzer N, Nemunaitis J: Melanoma differentiation associated gene-7/interleukin-24 (mda-7/IL-24): novel gene therapeutic for metastatic melanoma. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007, 224:300-307
12. Labarriere N, Pandolfino MC, Gervois N, Khammari A, Tessier MH, Dreno B, Jotereau F: Therapeutic efficacy of melanoma-reactive TIL injected in stage III melanoma patients. *Cancer Immunol Immunother* 2002, 51:532-538
13. Benlalam H, Vignard V, Khammari A, Bonnin A, Godet Y, Pandolfino MC, Jotereau F, Dreno B, Labarriere N: Infusion of Melan-A/Mart-1 specific tumor-infiltrating lymphocytes enhanced relapse-free survival of melanoma patients. *Cancer Immunol Immunother* 2007, 56:515-526
14. Kawakami Y, Eliyahu S, Jennings C, Sakaguchi K, Kang X, Southwood S, Robbins PF, Sette A, Appella E, Rosenberg SA: Recognition of multiple epitopes in the human melanoma antigen gp100 by tumor-infiltrating T lymphocytes associated with in vivo tumor regression. *J Immunol* 1995, 154:3961-3968

15. Quereux G, Pandolfino MC, Knol AC, Khammari A, Volteau C, Nguyen JM, Dreno B: Tissue prognostic markers for adoptive immunotherapy in melanoma. *Eur J Dermatol* 2007, 17:295-301
16. Hofbauer GF, Burkhart A, Schuler G, Dummer R, Burg G, Nestle FO: High frequency of melanoma-associated antigen or HLA class I loss does not correlate with survival in primary melanoma. *J Immunother* (1997) 2004, 27:73-78
17. van Houdt IS, Oudejans JJ, van den Eertwegh AJ, Baars A, Vos W, Bladergroen BA, Rimoldi D, Muris JJ, Hooijberg E, Gundy CM, Meijer CJ, Kummer JA: Expression of the apoptosis inhibitor protease inhibitor 9 predicts clinical outcome in vaccinated patients with stage III and IV melanoma. *Clin Cancer Res* 2005, 11:6400-6407
18. Takeuchi H, Morton DL, Elashoff D, Hoon DS: Survivin expression by metastatic melanoma predicts poor disease outcome in patients receiving adjuvant polyvalent vaccine. *Int J Cancer* 2005, 117:1032-1038
19. Mori T, O'Day SJ, Umetani N, Martinez SR, Kitago M, Koyanagi K, Kuo C, Takeshima TL, Milford R, Wang HJ, Vu VD, Nguyen SL, Hoon DS: Predictive utility of circulating methylated DNA in serum of melanoma patients receiving biochemotherapy. *J Clin Oncol* 2005, 23:9351-9358
20. van Horssen R, Rens JA, Brunstein F, Guns V, van Gils M, Hagen TL, Eggermont AM: Intratumoural expression of TNF-R1 and EMAP-II in relation to response of patients treated with TNF-based isolated limb perfusion. *Int J Cancer* 2006, 119:1481-1490
21. Boudny V, Dusek L, Adamkova L, Chumchalova J, Kocak I, Fait V, Lauerova L, Krejci E, Kovarik J: Lack of STAT 1 phosphorylation at TYR 701 by IFN γ correlates with disease outcome in melanoma patients. *Neoplasma* 2005, 52:330-337
22. Lesinski GB, Valentino D, Hade EM, Jones S, Magro C, Chaudhury AR, Walker MJ, Carson WE, 3rd: Expression of STAT1 and STAT2 in malignant melanoma does not correlate with response to interferon-alpha adjuvant therapy. *Cancer Immunol Immunother* 2005, 54:815-825
23. Tartour E, Dorval T, Mosseri V, Deneux L, Mathiot C, Brailly H, Montero F, Joyeux I, Pouillart P, Fridman WH: Serum interleukin 6 and C-reactive protein levels correlate with resistance to IL-2 therapy and poor survival in melanoma patients. *Br J Cancer* 1994, 69:911-913
24. Tas F, Oguz H, Argon A, Duranyildiz D, Camlica H, Yasasever V, Topuz E: The value of serum levels of IL-6, TNF-alpha, and erythropoietin in metastatic malignant melanoma: serum IL-6 level is a valuable prognostic factor at least as serum LDH in advanced melanoma. *Med Oncol* 2005, 22:241-246
25. Mouawad R, Khayat D, Merle S, Antoine EC, Gil-Delgado M, Soubrane C: Is there any relationship between interleukin-6/interleukin-6 receptor modulation and endogenous interleukin-6 release in metastatic malignant melanoma patients treated by biochemotherapy? *Melanoma Res* 1999, 9:181-188
26. Bani MR, Rak J, Adachi D, Wiltshire R, Trent JM, Kerbel RS, Ben-David Y: Multiple features of advanced melanoma recapitulated in tumorigenic variants of early stage (radial growth phase) human melanoma cell lines: evidence for a dominant phenotype. *Cancer Res* 1996, 56:3075-3086
27. Lu C, Rak JW, Kobayashi H, Kerbel RS: Increased resistance to oncostatin M-induced growth inhibition of human melanoma cell lines derived from advanced-stage lesions. *Cancer Res* 1993, 53:2708-2711
28. Yu D, Thomas-Tikhonenko A: Intratumoral delivery of an interferon gamma retrovirus-producing cells inhibits growth of a murine melanoma by a non-immune mechanism. *Cancer Lett* 2001, 173:145-154

29. Ozbek S, Peters M, Breuhahn K, Mann A, Blessing M, Fischer M, Schirmacher P, Mackiewicz A, Rose-John S: The designer cytokine hyper-IL-6 mediates growth inhibition and GM-CSF-dependent rejection of B16 melanoma cells. *Oncogene* 2001, 20:972-979
30. Ouyang L, Shen LY, Li T, Liu J: Inhibition effect of Oncostatin M on metastatic human lung cancer cells 95-D in vitro and on murine melanoma cells B16BL6 in vivo. *Biomed Res* 2006, 27:197-202
31. Tanaka M, Miyajima A: Oncostatin M, a multifunctional cytokine. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2003, 149:39-52
32. Boniface K, Diveu C, Morel F, Pedretti N, Froger J, Ravon E, Garcia M, Venereau E, Preisser L, Guignouard E, Guillet G, Dagregorio G, Pene J, Moles JP, Yssel H, Chevalier S, Bernard FX, Gascan H, Lecron JC: Oncostatin M secreted by skin infiltrating T lymphocytes is a potent keratinocyte activator involved in skin inflammation. *J Immunol* 2007, 178:4615-4622
33. Sugaya M, Fang L, Cardones AR, Kakinuma T, Jaber SH, Blauvelt A, Hwang ST: Oncostatin M enhances CCL21 expression by microvascular endothelial cells and increases the efficiency of dendritic cell trafficking to lymph nodes. *J Immunol* 2006, 177:7665-7672
34. Grant SL, Begley CG: The oncostatin M signalling pathway: reversing the neoplastic phenotype? *Mol Med Today* 1999, 5:406-412
35. Lacreusette A, Nguyen JM, Pandolfino MC, Khammari A, Dreno B, Jacques Y, Godard A, Blanchard F: Loss of oncostatin M receptor beta in metastatic melanoma cells. *Oncogene* 2007, 26:881-892
36. Pandolfino MC, Labarriere N, Tessier MH, Cassidanius A, Bercegeay S, Lemarre P, Dehaut F, Dreno B, Jotereau F: High-scale expansion of melanoma-reactive TIL by a polyclonal stimulus: predictability and relation with disease advancement. *Cancer Immunol Immunother* 2001, 50:134-140
37. Blanchard F, Kinzie E, Wang Y, Duplomb L, Godard A, Held WA, Asch BB, Baumann H: FR901228, an inhibitor of histone deacetylases, increases the cellular responsiveness to IL-6 type cytokines by enhancing the expression of receptor proteins. *Oncogene* 2002, 21:6264-6277
38. Staunton D, Hudson KR, Heath JK: The interactions of the cytokine-binding homology region and immunoglobulin-like domains of gp130 with oncostatin M: implications for receptor complex formation. *Protein Eng* 1998, 11:1093-1102
39. Wallace PM, Macmaster JF, Rillema JR, Rouleau KA, Hanson MB, Burstein SA, Shoyab M: In vivo properties of oncostatin M. *Ann N Y Acad Sci* 1995, 762:42-54
40. Robbins PF, Dudley ME, Wunderlich J, El-Gamil M, Li YF, Zhou J, Huang J, Powell DJ, Jr., Rosenberg SA: Cutting edge: persistence of transferred lymphocyte clonotypes correlates with cancer regression in patients receiving cell transfer therapy. *J Immunol* 2004, 173:7125-7130
41. Shen X, Zhou J, Hathcock KS, Robbins P, Powell DJ, Jr., Rosenberg SA, Hodes RJ: Persistence of tumor infiltrating lymphocytes in adoptive immunotherapy correlates with telomere length. *J Immunother* (1997) 2007, 30:123-129
42. Florenes VA, Lu C, Bhattacharya N, Rak J, Sheehan C, Slingerland JM, Kerbel RS: Interleukin-6 dependent induction of the cyclin dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 is lost during progression of human malignant melanoma. *Oncogene* 1999, 18:1023-1032
43. Kortylewski M, Heinrich PC, Mackiewicz A, Schniertshauer U, Klingmuller U, Nakajima K, Hirano T, Horn F, Behrmann I: Interleukin-6 and oncostatin M-induced growth inhibition of human A375 melanoma cells is STAT-dependent and involves upregulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27/Kip1. *Oncogene* 1999, 18:3742-3753

44. Brounais B, C. Chipoy, K. Mori, C. Charrier, S. Battaglia, P. Pilet, C. D. Richards, D. Heymann, F. Rédini and F. Blanchard: Oncostatin M induces bone loss and sensitizes rat osteosarcoma to the anti-tumor effect of midostaurin in vivo. Clin Cancer Res (in press)
45. Loy JK, Davidson TJ, Berry KK, Macmaster JF, Danle B, Durham SK: Oncostatin M: development of a pleiotropic cytokine. Toxicol Pathol 1999, 27:151-155
46. Olencki T, Finke J, Tubbs R, Elson P, McLain D, Herzog P, Budd GT, Gunn H, Bukowski RM: Phase 1 trial of subcutaneous IL-6 in patients with refractory cancer: clinical and biologic effects. J Immunother (1997) 2000, 23:549-556

Table 1. Sensitivity of melanoma cells to anti-proliferative cytokines and cytokines production by corresponding TIL

Growth inhibition of melanoma cells *	Cytokines production by corresponding TIL [†]	
	OSM	IL-6
<i>OSM-sensitive melanoma cells (n=13)</i>	<i>(n=3)</i>	
IL-6-sensitive: 62% [‡]		
IFN γ -sensitive: 77%	1475 $\pm$ 772	9 $\pm$ 5
TNF α -sensitive: 46%	(1082)	(7)
<i>OSM-resistant melanoma cells (n=11)</i>	<i>(n=6)</i>	
IL-6-sensitive: 36% [‡]		
IFN γ -sensitive: 82%	2333 $\pm$ 1334	56 $\pm$ 103
TNF α -sensitive: 64%	(1960)	(15)

*Two groups of cells were obtained following 72h cell proliferation assays with OSM, IL-6, IFN γ and TNF α at 50 ng/ml. Three independent experiments, each in triplicate cultures, were realized and were highly reproducible for each cell line. A threshold of 20% of inhibition of proliferation (compared to non-treated cells) was chosen to discriminate between OSM-sensitive and -resistant cells. The same threshold was used for IL-6, IFN γ and TNF α sensitivity discrimination.

[†]ELISA determination of OSM and IL-6 production by TIL after 3 days of culture in IL-2 medium. Data are expressed in pg of cytokine per million of TIL and are the mean $\pm$ SD of 3 and 6 TIL cultures, corresponding to the OSM-sensitive and -resistant melanoma cells, respectively. The median cytokine productions are shown in parenthesis.

[‡]Statistically significant difference between OSM-sensitive and OSM-resistant melanoma cells.

Figure 1

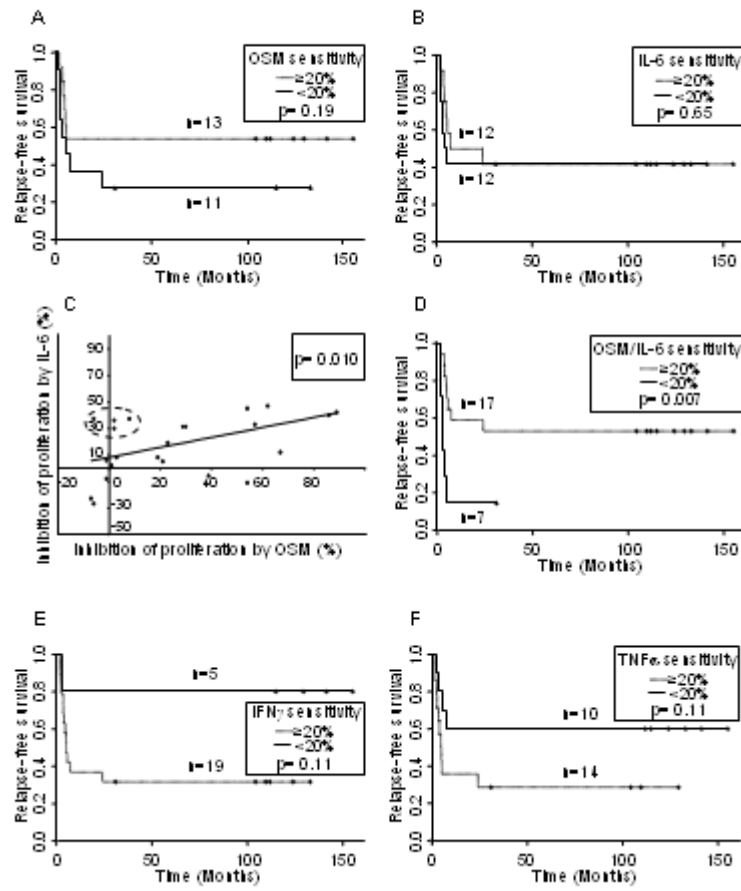


Figure 2

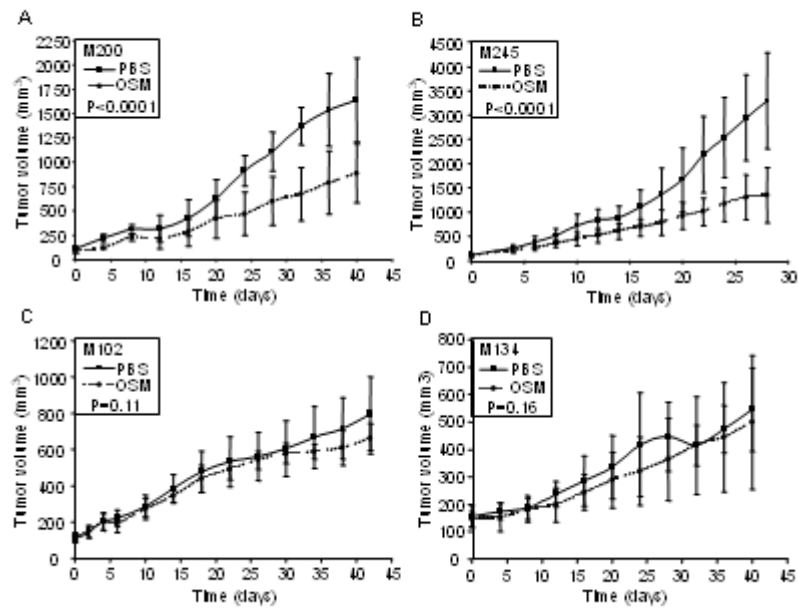
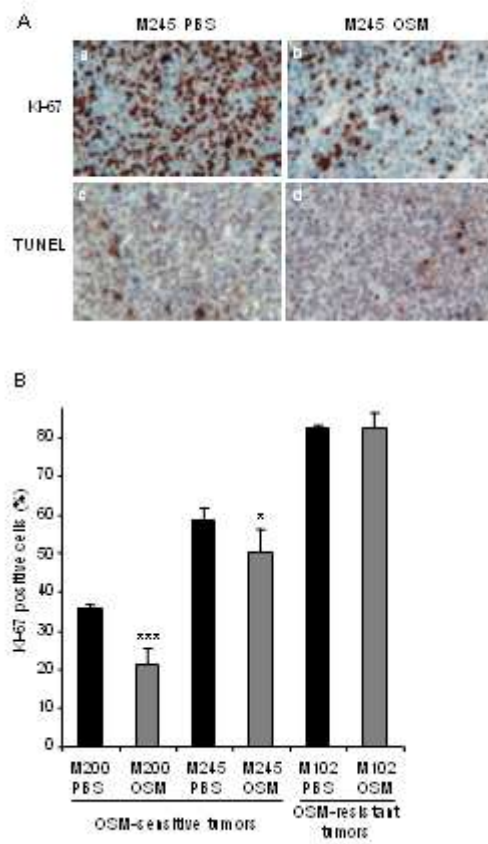


Figure 3



C. Complément de discussion à l'article III

Dans cette étude, nous avons voulu savoir si la résistance à l'OSM peut influencer l'issue clinique des patients atteints de mélanome métastatique, comme cela a pu être observé pour l'IFN γ , le TNF α et l'IL-6 (Boudny et al. 2005; van Horssen et al. 2006; Mouawad et al. 1999). Les patients étudiés de façon rétrospective dans l'article III ont été traités par des TIL plus IL-2, et il nous semblait donc important d'évaluer la production de ces cytokines anti-prolifératives par les TIL injectés. Nous avons également analysé l'effet anti-tumoral potentiel de l'OSM humaine *in vivo* dans des modèles de mélanome humain xénotransplantés, étant donné que la seule étude précédemment réalisée portait sur l'activité de l'OSM humaine dans un modèle de mélanome murin (Ouyang et al. 2006). Cette étude concluait à un léger effet inhibiteur "LIF-like" sur les métastases pulmonaires du mélanome murin B16 (Ouyang et al. 2006). L'effet anti-tumoral de l'IL-6 avait déjà été démontré dans le modèle de mélanome murin B16 (Ozbek et al. 2001).

Pris indépendamment, aucune résistance/sensibilité à une cytokine (IFN γ , TNF α , IL-6 ou OSM) ne corrèle significativement avec la survie sans rechute des patients. Cependant, l'OSM et l'IL-6 sont des cytokines très proches, partageant la sous-unité réceptrice gp130 et dont les activités anti-prolifératives sont significativement corrélées sur les lignées de mélanome. Nous avons donc analysé la survie sans rechute des patients dont la lignée de mélanome correspondante était inhibée par l'OSM ou par l'IL-6 ou par les deux cytokines. Ainsi, nous avons observé une corrélation inverse et significative entre la résistance à l'OSM et/ou l'IL-6 et la survie sans rechute des patients. Ce facteur apparaît comme un nouveau facteur pronostique indépendant car il ne corrèle pas avec les autres facteurs pronostiques connus: épaisseur de la tumeur primaire (Breslow), étape du développement tumoral selon le modèle de Clark, présence d'ulcération, nombre de ganglions envahis... De plus, les TIL injectés aux patients produisent l'OSM et l'IL-6, suggérant qu'une partie de l'efficacité de ce traitement est liée à la production par les TIL de ces cytokines anti-prolifératives. La résistance au traitement par les TIL n'apparaît pas liée à un défaut de production de ces cytokines, qui sont sécrétées à des niveaux similaires par tous les TIL injectés, mais bien à un défaut de réponse à ces cytokines au niveau des cellules tumorales. Ces défauts, comme indiqués dans les articles I et II, font intervenir une perte du récepteur à l'OSM ou des anomalies des voies de transduction PKC/STAT3 ou Akt.

Dans des modèles de souris nude xénotransplantées, nous avons également pu mettre en évidence un effet anti-prolifératif de l'OSM par une action négative sur la prolifération des

mélanomes humains sensibles à l'OSM (OSMR β^+). Cet effet se traduit par un retard de croissance significatif des mélanomes, et non par une régression tumorale, qui aurait pu être observée en cas d'activité pro-apoptotique majeure de l'OSM. Au contraire, la progression des mélanomes résistants à l'OSM (OSMR β^-) n'est pas modulée par l'OSM, indiquant que l'effet anti-prolifératif de cette cytokine est direct et n'implique vraisemblablement pas de réponse de l'hôte contre la tumeur. L'observation de l'activité anti-proliférative de l'OSM dans ces modèles murins pré-cliniques, sur les cellules cancéreuses issues des ganglions de patients atteints de mélanome de grade III, a permis de renforcer notre hypothèse sur l'importance de la sensibilité à l'OSM des cellules de mélanome pour l'efficacité du traitement TIL. La production d'OSM et d'IL-6 par les TIL injectés aux patients maintiendrait les cellules de mélanome dans un état de faible prolifération, réduisant ainsi la charge tumorale, et permettant aux autres mécanismes effecteurs cytotoxiques des TIL d'agir plus facilement.

Si la corrélation entre la sensibilité des cellules de mélanome à l'OSM et/ou l'IL-6 et la survie sans rechute des patients traités par des TIL est confirmée sur un plus grand nombre de patients, elle pourrait alors être évaluée dans d'autres types d'immunothérapies. On pourrait ainsi avoir une vision plus large de l'utilisation potentielle de cette sensibilité ou résistance à l'OSM/IL-6 des cellules de mélanome comme facteur pronostique indépendant pour les patients atteints de mélanome de grade III et traités par immunothérapie. La connaissance globale des mécanismes de résistance à l'OSM des lignées de mélanome (perte d'expression de l'OSMR β (Lacrouette et al. 2007) et défauts de signalisation sur les voies PKC/STAT3 ou Akt (Lacrouette 2008a)), pourrait alors être utilisée pour mettre en place des protocoles de recherche clinique combinant les immunothérapies à d'autres thérapies visant à réinduire la sensibilité à l'OSM.

Conclusion et perspectives

Les patients atteints de mélanome métastatique sont réfractaires à de nombreux traitements comme les chimiothérapies, les immunothérapies actives ou les thérapies ciblées. A ce jour, les résultats les plus encourageants ont été obtenus avec l'immunothérapie passive ou par transfert adoptif de TIL (Dreno et al. 2002; Khammari et al. 2007; Dudley et al. 2002; Dudley et al. 2005). Cependant, certains patients ne répondent toujours pas et les cellules de mélanomes peuvent donc être résistantes à ces immunothérapies passives, soit par une absence de reconnaissance des cellules tumorales par les LT cytotoxiques, par une impossibilité de ces LT cytotoxiques à éliminer les cellules tumorales, ou par une perte possible de la capacité des LT cytotoxiques à réduire la prolifération des cellules de mélanomes par l'activité directe anti-proliférative des cytokines. En effet, la sensibilité/résistance des cellules de mélanome à certaines cytokines comme l'IFN γ , le TNF α et l'IL-6 a été corrélée à la survie des patients atteints de mélanome métastatique, et ces cytokines montrent une activité anti-proliférative directe sur des modèles de mélanome murin (Boudny et al. 2005; van Horssen et al. 2006; Mouawad et al. 1999; Yu et al. 2001; Ozbek et al. 2001).

La même activité anti-proliférative de ces cytokines a été observée *in vitro*, et également pour l'OSM, qui est la cytokine de type IL-6 la plus efficace dans l'inhibition de la prolifération des cellules de mélanome, suivie de l'IL-6 elle-même (Lacrouette et al. 2007). A l'inverse, les autres cytokines de cette famille (LIF, IL-11, IL-31) n'ont aucun effet anti-prolifératif ((Lacrouette et al. 2007) et résultats non montrés). A notre connaissance, les effets du CNTF, de la CT-1, de la CLC et de la neuropoïétine n'ont pas été étudiés sur le mélanome. Les lignées de mélanome issues des stades tumoraux métastatiques présentent souvent une résistance aux cytokines, et quelques mécanismes de résistance ont été décrits pour l'IFN γ , le TNF α et l'IL-6 (cf. paragraphe suivant). Concernant l'OSM, les mécanismes de résistance des cellules de mélanome à cette cytokine ont été très peu étudiés, et il en est de même pour son activité anti-tumorale potentielle *in vivo*, ainsi que pour le rôle de la résistance à l'OSM dans la réponse clinique des patients atteints de mélanome métastatique.

La description des mécanismes de résistance à l'OSM, qui sont soit spécifiques à l'OSM pour 30% des lignées de mélanome (perte d'expression de l'OSMR β (Lacrouette et al. 2007)), soit communs à l'OSM et à l'IL-6 pour 40% des lignées (défauts de signalisation sur les voies PKC/STAT3 ou Akt (Lacrouette 2008a)), explique pourquoi les cellules de mélanome sont globalement co-résistantes à l'OSM et à l'IL-6. Cette résistance ne corrèle cependant pas avec celle à l'IFN γ ou au TNF α (Lacrouette et al. 2007; Lacrouette 2008b).

Ces résultats sont donc différents de la résistance à de multiples cytokines qui a été montrée dans la lignée de mélanome WM35 ayant subi une mutagénèse afin de la transformer en mélanome métastatique (Bani et al. 1996). Ces mécanismes de résistance à l'OSM sont également bien distincts de ceux décrits pour l'IL-6 et l'IFN qui portent sur le blocage de toutes les voies de transduction de ces cytokines par la surexpression des suppresseurs de signalisation (Li et al. 2004; Komyod et al. 2007; Wellbrock et al. 2005) ou sur le blocage de l'induction des gènes cibles des STAT par ces cytokines (Florenes et al. 1999; Rodriguez et al. 2007). Les mécanismes de résistance au TNF α sont liés à la résistance à l'apoptose, caractéristique des cellules de mélanome (Gray-Schopfer et al. 2007; Soengas et al. 2003; Ivanov et al. 2003) et sont donc spécifiques au TNF α .

Concernant les mécanismes de la résistance à l'OSM, en plus de la perte d'expression de l'OSMR β (figure 7) majoritairement par déacétylation des histones au niveau du promoteur de son gène, nous avons pu mettre en évidence un défaut d'activation de STAT3 sur la Ser727 par la PKC δ ou une autre isoforme de PKC pour 21% des lignées, ainsi qu'un défaut d'activation d'Akt sur la Ser473 pour 18% des lignées (figure 7) (Lacreusette 2008a). Il reste donc à déterminer quelle isoforme de PKC assure la phosphorylation de STAT3 sur la Ser727 pour certaines lignées de mélanome. Nous pouvons émettre l'hypothèse que la PKC η pourrait être cette isoforme recherchée (cf. discussion de l'article II). Il faudra également identifier les voies activatrices de ces PKC en réponse à l'OSM et qui font défaut dans les lignées résistantes à l'OSM. La voie des PI3K/PDK1 a déjà été impliquée dans l'activation de la PKC δ (Le Good et al. 1998). Enfin, la kinase responsable de l'activation d'Akt sur la Ser473 est encore à identifier puisqu'il ne s'agirait pas des PKC mais éventuellement de TORC2 (Jacinto et al. 2006) (cf. discussion de l'article II) (figure 7).

Nous avons montré que les PKC sont impliquées dans la phosphorylation de STAT3 sur la Ser727 et que cette activation permet à l'OSM de bloquer la prolifération des cellules de mélanome (Lacreusette 2008a). Cette activité anti-proliférative de l'OSM pourrait s'expliquer par l'induction ou la stabilisation des inhibiteurs du cycle cellulaire par STAT3, comme ceci a été montré pour p21^{WAF1/CIP1} et p27^{Kip1} (Florenes et al. 1999; Kortylewski et al. 1999). De plus, une régulation négative de la prolifération par l'OSM a été mise en évidence *in vivo* sur nos cellules de mélanome xénogreffées aux souris (Lacreusette 2008b). Cependant, nous n'avons pas observé d'induction de p21^{WAF1/CIP1} et p27^{Kip1} en réponse à l'OSM dans nos cellules de mélanome, qui sont tout de même bloquées en phase G1 du cycle cellulaire (résultats non montrés). Ainsi, il faudra identifier les inhibiteurs du cycle cellulaire, les

cyclines ou les CDK qui sont ciblées par STAT3 en réponse à l'OSM dans nos cellules de mélanome. De la même façon, il faudra trouver les cibles anti-prolifératives d'Akt ou de sa kinase activatrice, comme TORC2, afin de comprendre leur implication dans l'activité de l'OSM (figure 7).

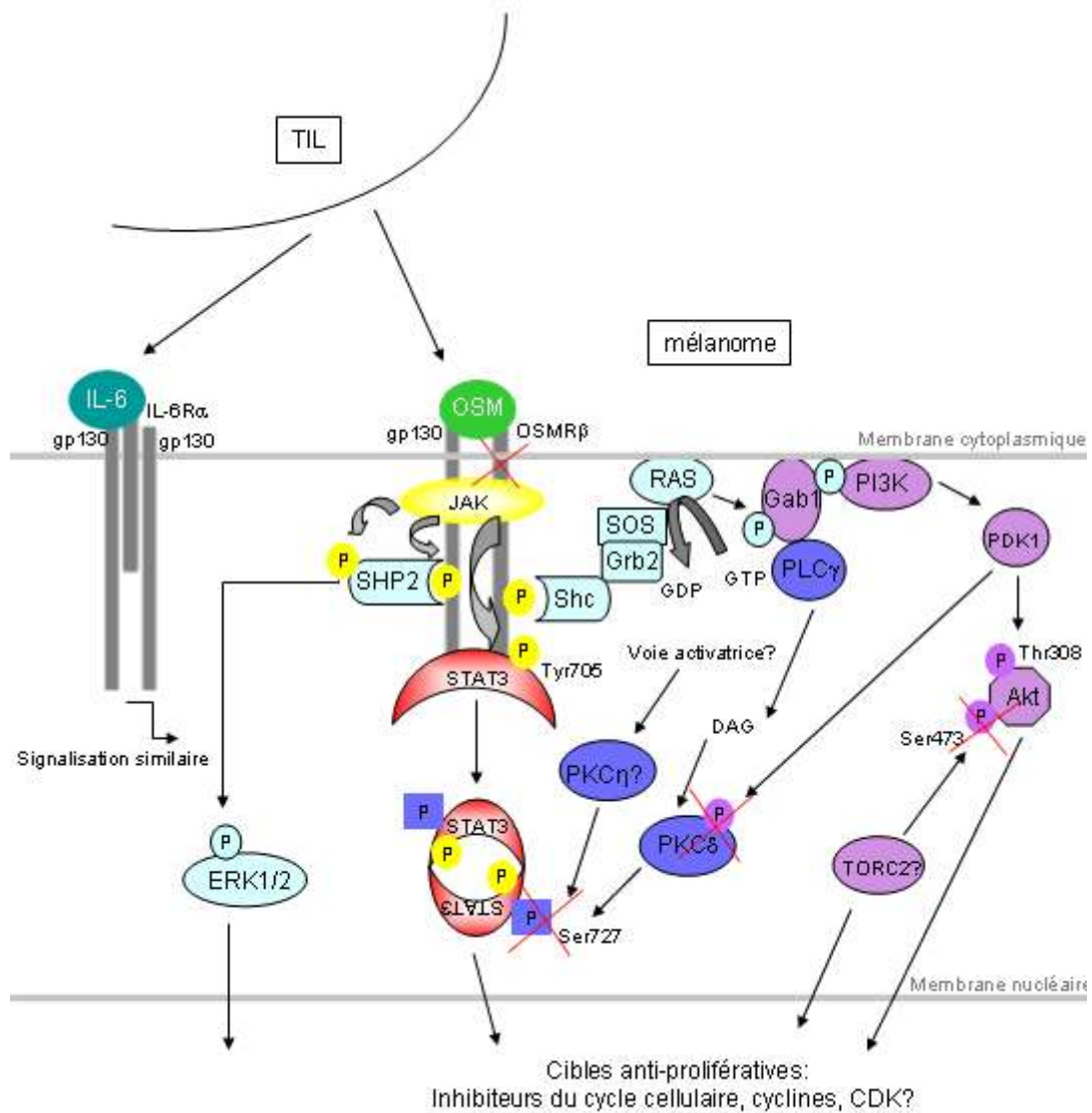


Figure 7: Mécanismes de résistance à l'OSM et à l'IL-6 des cellules de mélanome démontrés dans cette étude

D'autre part, nous avons pu montrer que l'OSM et l'IL-6 (et potentiellement l'IL-11) peuvent exercer une pression de sélection sur les cellules de mélanome et entraîner la résistance à l'OSM par les mécanismes décrits précédemment (Lacrouette 2008a). Le rôle de l'exposition chronique à l'OSM et l'IL-6 des cellules de mélanome dans l'établissement de la résistance à ces cytokines pourra être confirmé par des marquages immunohistochimiques de ces cytokines sur les ganglions lymphatiques envahis mais aussi sur les tumeurs primaires correspondantes, puisque les cytokines de type IL-6 sont produites et ont une activité pro-inflammatoire importante dans la peau (cf. Introduction, paragraphe II, B, 2). Cela suggérerait fortement que les cellules de mélanome précoce deviennent résistantes à l'OSM et/ou à l'IL-6 pour échapper au système immunitaire et métastaser. Cependant l'étape précise, entre le mélanome localisé à la peau (grade I) et le mélanome présentant des métastases ganglionnaires (grade III), et qui permet l'établissement de la résistance à ces cytokines, n'est pas connue. L'étude de souris déficientes ou transgéniques pour l'OSM ou l'IL-6 pourrait préciser le rôle de ces cytokines dans les premiers stades de progression du mélanome. De façon générale, une meilleure compréhension de l'étiologie du mélanome, et notamment de l'histoire inflammatoire de ces tumeurs, devrait aider à mieux diagnostiquer et donc mieux traiter ces patients.

Nous avons établi une corrélation entre la sensibilité des cellules de mélanome à l'OSM et/ou l'IL-6 et la survie sans rechute des patients atteints de mélanome de grade III et traités par des TIL (Lacrouette 2008b). Cependant, quelques patients ont rechuté dans le groupe de lignées de mélanome sensibles à l'OSM et/ou l'IL-6. Une cause probable à cet échec partiel du traitement TIL peut être un défaut de persistance des TIL *in vivo*, comme cela a été décrit (Robbins et al. 2004; Shen et al. 2007). Ainsi, l'évaluation du maintien des populations de TIL après leur injection aux patients, déjà réalisée lors des immunothérapies utilisant des TIL spécifiques d'antigènes tumoraux (Shen et al. 2007), pourrait être utilisée pour voir si les TIL sont toujours présents pour produire l'OSM et l'IL-6 et pour restreindre la prolifération des cellules de mélanome. Si dans les futurs essais cliniques la résistance à l'OSM et/ou l'IL-6 des cellules de mélanome est confirmée comme étant importante pour la survie sans rechute d'un grand nombre de patients traités par des TIL ou d'autres types d'immunothérapies, on pourrait alors considérer cette résistance comme un nouveau facteur pronostique. La description des mécanismes de résistance à l'OSM des lignées de mélanome (Lacrouette et al. 2007; Lacrouette 2008a), pourrait alors être utilisée pour combiner les immunothérapies à d'autres thérapies visant à réinduire la sensibilité à l'OSM, comme les inhibiteurs des HDAC pour faire réexprimer l'OSMR β (cf. discussion de l'article I), ou des

thérapies ciblant les voies de transduction PKC/STAT3 ou Akt ainsi que leurs kinases activatrices en amont.

La corrélation entre la sensibilité des cellules de mélanome aux cytokines et la survie sans rechute des patients traités par des TIL a pu être observée pour l'OSM et/ou l'IL-6 mais pas pour l'IFN γ ou le TNF α (Lacreusette 2008b), contrairement aux résultats obtenus dans le contexte de patients traités directement par l'IFN γ ou le TNF α (Boudny et al. 2005; van Horssen et al. 2006). Ainsi, étant donné l'activité *in vivo* de l'OSM que nous avons mis en évidence (Lacreusette 2008b), il serait intéressant d'évaluer l'effet anti-cancéreux potentiel de l'OSM injecté à des patients atteints de mélanome de grade III et sensibles à l'OSM. Ce traitement à l'OSM pourrait être utilisé en combinaison avec les chimiothérapies, les immunothérapies ou les thérapies ciblées ; en injection systémique ou plus ciblée sous forme d'immunocytokine reconnaissant les cellules de mélanome, comme pour l'IL-2 (King et al. 2004). Bien entendu, une évaluation pharmacologique de la toxicité de l'OSM chez l'homme devra être réalisée, étant donné les effets importants de cette cytokine sur l'inflammation (augmentation de la "serum amyloid A" et l'IL-6 par le foie, augmentation de la température) et sur la déplétion lymphoïde thymique qui ont pu être constatés chez le singe (Loy et al. 1999), ainsi que la toxicité et l'inflammation sévère chez le rat causée par l'OSM murine (Brounais).

Dans leur ensemble, ces travaux indiquent que l'OSM possède des activités anti-tumorales importantes qui pourraient être utilisées pour améliorer le traitement du mélanome, notamment dans le cadre de certaines immunothérapies où ces cytokines sont produites localement dans le microenvironnement tumoral. De façon similaire, le traitement d'autres types de tumeurs sensibles aux effets anti-prolifératifs de l'OSM pourrait être envisagé après des études fondamentales, pré-cliniques et cliniques.

Bibliographie

- Adamina, M. and D. Oertli (2005). "Antigen specific active immunotherapy: lessons from the first decade." *Swiss Med Wkly* 135(15-16): 212-21.
- Airoidi, I., E. Di Carlo, C. Cocco, G. Taverniti, T. D'Antuono, E. Ognio, M. Watanabe, D. Ribatti and V. Pistoia (2007). "Endogenous IL-12 triggers an antiangiogenic program in melanoma cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(10): 3996-4001.
- Ameglio, F., C. Bonifati, M. Fazio, A. Mussi, E. Trento, P. Cordial Fei, P. Donati, F. Pimpinelli, L. D'Auria and M. Carducci (1997). "Interleukin-11 production is increased in organ cultures of lesional skin of patients with active plaque-type psoriasis as compared with nonlesional and normal skin. Similarity to interleukin-1 beta, interleukin-6 and interleukin-8." *Arch Dermatol Res* 289(7): 399-403.
- Atkins, M. B. (2006). "Cytokine-based therapy and biochemotherapy for advanced melanoma." *Clin Cancer Res* 12(7 Pt 2): 2353s-2358s.
- Auguste, P., C. Guillet, M. Fourcin, C. Olivier, J. Veziers, A. Pouplard-Barthelaix and H. Gascan (1997). "Signaling of type II oncostatin M receptor." *J Biol Chem* 272(25): 15760-4.
- Balch, C. M., A. C. Buzaid, S. J. Soong, M. B. Atkins, N. Cascinelli, D. G. Coit, I. D. Fleming, J. E. Gershenwald, A. Houghton, Jr., J. M. Kirkwood, K. M. McMasters, M. F. Mihm, D. L. Morton, D. S. Reintgen, M. I. Ross, A. Sober, J. A. Thompson and J. F. Thompson (2001). "Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma." *J Clin Oncol* 19(16): 3635-48.
- Bani, M. R., J. Rak, D. Adachi, R. Wiltshire, J. M. Trent, R. S. Kerbel and Y. Ben-David (1996). "Multiple features of advanced melanoma recapitulated in tumorigenic variants of early stage (radial growth phase) human melanoma cell lines: evidence for a dominant phenotype." *Cancer Res* 56(13): 3075-86.
- Benlalam, H., V. Vignard, A. Khammari, A. Bonnin, Y. Godet, M. C. Pandolfino, F. Jotereau, B. Dreno and N. Labarriere (2007). "Infusion of Melan-A/Mart-1 specific tumor-infiltrating lymphocytes enhanced relapse-free survival of melanoma patients." *Cancer Immunol Immunother* 56(4): 515-26.
- Blais, M. E., I. Louis and C. Perreault (2006). "T-cell development: an extrathymic perspective." *Immunol Rev* 209: 103-14.
- Blanchard, F. and C. Chipoy (2005). "Histone deacetylase inhibitors: new drugs for the treatment of inflammatory diseases?" *Drug Discov Today* 10(3): 197-204.
- Blanchard, F., E. Kinzie, Y. Wang, L. Duplomb, A. Godard, W. A. Held, B. B. Asch and H. Baumann (2002). "FR901228, an inhibitor of histone deacetylases, increases the cellular responsiveness to IL-6 type cytokines by enhancing the expression of receptor proteins." *Oncogene* 21(41): 6264-77.
- Blanchard, F., V. Pitard, J. L. Taupin, S. Raher, M. M. Hallet, J. F. Moreau, A. Godard and Y. Jacques (1997). "Epitope-function relationships of human leukemia inhibitory factor receptors using a novel set of anti-gp190 mAB." *Int Immunol* 9(12): 1775-84.
- Blanchard, F., E. Tracy, J. Smith, S. Chattopadhyay, Y. Wang, W. A. Held and H. Baumann (2003). "DNA methylation controls the responsiveness of hepatoma cells to leukemia inhibitory factor." *Hepatology* 38(6): 1516-28.
- Bohm, M., U. Schulte, J. O. Funk, M. Raghunath, I. Behrmann, M. Kortylewski, P. C. Heinrich, T. Kues, T. A. Luger and T. Schwarz (2001). "Interleukin-6-resistant melanoma cells exhibit reduced activation of STAT3 and lack of inhibition of cyclin E-associated kinase activity." *J Invest Dermatol* 117(1): 132-40.

- Boing, I., C. Stross, S. Radtke, B. E. Lippok, P. C. Heinrich and H. M. Hermanns (2006). "Oncostatin M-induced activation of stress-activated MAP kinases depends on tyrosine 861 in the OSM receptor and requires Jak1 but not Src kinases." *Cell Signal* 18(1): 50-61.
- Boniface, K., C. Diveu, F. Morel, N. Pedretti, J. Froger, E. Ravon, M. Garcia, E. Venereau, L. Preisser, E. Guignouard, G. Guillet, G. Dagregorio, J. Pene, J. P. Moles, H. Yssel, S. Chevalier, F. X. Bernard, H. Gascan and J. C. Lecron (2007). "Oncostatin M secreted by skin infiltrating T lymphocytes is a potent keratinocyte activator involved in skin inflammation." *J Immunol* 178(7): 4615-22.
- Bonifati, C., A. Mussi, L. D'Auria, M. Carducci, E. Trento, P. Cordiali-Fei and F. Ameglio (1998). "Spontaneous release of leukemia inhibitory factor and oncostatin-M is increased in supernatants of short-term organ cultures from lesional psoriatic skin." *Arch Dermatol Res* 290(1-2): 9-13.
- Boudny, V., L. Dusek, L. Adamkova, J. Chumchalova, I. Kocak, V. Fait, L. Lauerova, E. Krejci and J. Kovarik (2005). "Lack of STAT 1 phosphorylation at TYR 701 by IFN γ correlates with disease outcome in melanoma patients." *Neoplasma* 52(4): 330-7.
- Boyle, G. M., A. C. Martyn and P. G. Parsons (2005). "Histone deacetylase inhibitors and malignant melanoma." *Pigment Cell Res* 18(3): 160-6.
- Bromberg, J. and J. E. Darnell, Jr. (2000). "The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function." *Oncogene* 19(21): 2468-73.
- Brounais, B., C. Chipoy, K. Mori, C. Charrier, S. Battaglia, P. Pilet, C. D. Richards, D. Heymann, F. R  dini and F. Blanchard "Oncostatin M induces bone loss and sensitizes rat osteosarcoma to the anti-tumor effect of Midostaurin in vivo." *Clin Cancer Res* (in press).
- Brown, T. J., M. N. Liubin and H. Marquardt (1987). "Purification and characterization of cytostatic lymphokines produced by activated human T lymphocytes. Synergistic antiproliferative activity of transforming growth factor beta 1, interferon-gamma, and oncostatin M for human melanoma cells." *J Immunol* 139(9): 2977-83.
- Brown, T. J., J. M. Rowe, J. W. Liu and M. Shoyab (1991). "Regulation of IL-6 expression by oncostatin M." *J Immunol* 147(7): 2175-80.
- Brunet, A., A. Bonni, M. J. Zigmund, M. Z. Lin, P. Juo, L. S. Hu, M. J. Anderson, K. C. Arden, J. Blenis and M. E. Greenberg (1999). "Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor." *Cell* 96(6): 857-68.
- Chambers, A. E., S. Banerjee, T. Chaplin, J. Dunne, S. Debernardi, S. P. Joel and B. D. Young (2003). "Histone acetylation-mediated regulation of genes in leukaemic cells." *Eur J Cancer* 39(8): 1165-75.
- Chen, S. H. and E. N. Benveniste (2004). "Oncostatin M: a pleiotropic cytokine in the central nervous system." *Cytokine Growth Factor Rev* 15(5): 379-91.
- Chin, L., L. A. Garraway and D. E. Fisher (2006). "Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era." *Genes Dev* 20(16): 2149-82.
- Chipoy, C., M. Berreur, S. Couillaud, G. Pradal, F. Vallette, C. Colombeix, F. Redini, D. Heymann and F. Blanchard (2004). "Downregulation of osteoblast markers and induction of the glial fibrillary acidic protein by oncostatin M in osteosarcoma cells require PKC δ and STAT3." *J Bone Miner Res* 19(11): 1850-61.
- Chudnovsky, Y., P. A. Khavari and A. E. Adams (2005). "Melanoma genetics and the development of rational therapeutics." *J Clin Invest* 115(4): 813-24.

- Cichy, J., J. Potempa, R. K. Chawla and J. Travis (1995). "Stimulatory effect of inflammatory cytokines on alpha 1-antichymotrypsin expression in human lung-derived epithelial cells." *J Clin Invest* 95(6): 2729-33.
- Cichy, J., S. Rose-John and J. Travis (1998). "Oncostatin M, leukaemia-inhibitory factor and interleukin 6 trigger different effects on alpha1-proteinase inhibitor synthesis in human lung-derived epithelial cells." *Biochem J* 329 (Pt 2): 335-9.
- Clegg, C. H., H. S. Haugen, J. T. Rulffes, S. L. Friend and A. G. Farr (1999). "Oncostatin M transforms lymphoid tissue function in transgenic mice by stimulating lymph node T-cell development and thymus autoantibody production." *Exp Hematol* 27(4): 712-25.
- Clegg, C. H., J. T. Rulffes, P. M. Wallace and H. S. Haugen (1996). "Regulation of an extrathymic T-cell development pathway by oncostatin M." *Nature* 384(6606): 261-3.
- Dagoneau, N., D. Scheffer, C. Huber, L. I. Al-Gazali, M. Di Rocco, A. Godard, J. Martinovic, A. Raas-Rothschild, S. Sigaudy, S. Unger, S. Nicole, B. Fontaine, J. L. Taupin, J. F. Moreau, A. Superti-Furga, M. Le Merrer, J. Bonaventure, A. Munnich, L. Legeai-Mallet and V. Cormier-Daire (2004). "Null leukemia inhibitory factor receptor (LIFR) mutations in Stuve-Wiedemann/Schwartz-Jampel type 2 syndrome." *Am J Hum Genet* 74(2): 298-305.
- Daniotti, M., M. Oggionni, T. Ranzani, V. Vallacchi, V. Campi, D. Di Stasi, G. D. Torre, F. Perrone, C. Luoni, S. Suardi, M. Frattini, S. Pilotti, A. Anichini, G. Tragni, G. Parmiani, M. A. Pierotti and M. Rodolfo (2004). "BRAF alterations are associated with complex mutational profiles in malignant melanoma." *Oncogene* 23(35): 5968-77.
- Darnell, J. E., Jr. (2002). "Transcription factors as targets for cancer therapy." *Nat Rev Cancer* 2(10): 740-9.
- de Hooge, A. S., F. A. van de Loo, M. B. Bennink, D. S. de Jong, O. J. Arntz, E. Lubberts, C. D. Richards and W. B. van den Berg (2002). "Adenoviral transfer of murine oncostatin M elicits periosteal bone apposition in knee joints of mice, despite synovial inflammation and up-regulated expression of interleukin-6 and receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand." *Am J Pathol* 160(5): 1733-43.
- Derouet, D., F. Rousseau, F. Alfonsi, J. Froger, J. Hermann, F. Barbier, D. Perret, C. Diveu, C. Guillet, L. Preisser, A. Dumont, M. Barbado, A. Morel, O. deLapeyriere, H. Gascan and S. Chevalier (2004). "Neuropoietin, a new IL-6-related cytokine signaling through the ciliary neurotrophic factor receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(14): 4827-32.
- Dillon, S. R., C. Sprecher, A. Hammond, J. Bilsborough, M. Rosenfeld-Franklin, S. R. Presnell, H. S. Haugen, M. Maurer, B. Harder, J. Johnston, S. Bort, S. Mudri, J. L. Kuijper, T. Bukowski, P. Shea, D. L. Dong, M. Dasovich, F. J. Grant, L. Lockwood, S. D. Levin, C. LeCiel, K. Waggle, H. Day, S. Topouzis, J. Kramer, R. Kuestner, Z. Chen, D. Foster, J. Parrish-Novak and J. A. Gross (2004). "Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice." *Nat Immunol* 5(7): 752-60.
- Diveu, C., E. Venereau, J. Froger, E. Ravon, L. Grimaud, F. Rousseau, S. Chevalier and H. Gascan (2006). "Molecular and functional characterization of a soluble form of oncostatin M/interleukin-31 shared receptor." *J Biol Chem* 281(48): 36673-82.
- Downward, J. (1999). "How BAD phosphorylation is good for survival." *Nat Cell Biol* 1(2): E33-5.
- Dreno, B., J. M. Nguyen, A. Khammari, M. C. Pandolfino, M. H. Tessier, S. Bercegeay, A. Cassidanius, P. Lemarre, S. Billaudel, N. Labarriere and F. Jotereau (2002).

- "Randomized trial of adoptive transfer of melanoma tumor-infiltrating lymphocytes as adjuvant therapy for stage III melanoma." *Cancer Immunol Immunother* 51(10): 539-46.
- Dudley, M. E., J. R. Wunderlich, P. F. Robbins, J. C. Yang, P. Hwu, D. J. Schwartzentruber, S. L. Topalian, R. Sherry, N. P. Restifo, A. M. Hubicki, M. R. Robinson, M. Raffeld, P. Duray, C. A. Seipp, L. Rogers-Freezer, K. E. Morton, S. A. Mavroukakis, D. E. White and S. A. Rosenberg (2002). "Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes." *Science* 298(5594): 850-4.
- Dudley, M. E., J. R. Wunderlich, J. C. Yang, R. M. Sherry, S. L. Topalian, N. P. Restifo, R. E. Royal, U. Kammula, D. E. White, S. A. Mavroukakis, L. J. Rogers, G. J. Gracia, S. A. Jones, D. P. Mangiameli, M. M. Pelletier, J. Gea-Banacloche, M. R. Robinson, D. M. Berman, A. C. Filie, A. Abati and S. A. Rosenberg (2005). "Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma." *J Clin Oncol* 23(10): 2346-57.
- Duncan, M. R., A. Hasan and B. Berman (1995). "Oncostatin M stimulates collagen and glycosaminoglycan production by cultured normal dermal fibroblasts: insensitivity of sclerodermal and keloidal fibroblasts." *J Invest Dermatol* 104(1): 128-33.
- Fecher, L. A., S. D. Cummings, M. J. Keefe and R. M. Alani (2007). "Toward a molecular classification of melanoma." *J Clin Oncol* 25(12): 1606-20.
- Fisher, P. B., D. Sarkar, I. V. Lebedeva, L. Emdad, P. Gupta, M. Sauane, Z. Z. Su, S. Grant, P. Dent, D. T. Curiel, N. Senzer and J. Nemunaitis (2006). "Melanoma differentiation associated gene-7/interleukin-24 (mda-7/IL-24): Novel gene therapeutic for metastatic melanoma." *Toxicol Appl Pharmacol*.
- Fisher, P. B., D. Sarkar, I. V. Lebedeva, L. Emdad, P. Gupta, M. Sauane, Z. Z. Su, S. Grant, P. Dent, D. T. Curiel, N. Senzer and J. Nemunaitis (2007). "Melanoma differentiation associated gene-7/interleukin-24 (mda-7/IL-24): novel gene therapeutic for metastatic melanoma." *Toxicol Appl Pharmacol* 224(3): 300-7.
- Flaherty, K. T. (2006). "Chemotherapy and targeted therapy combinations in advanced melanoma." *Clin Cancer Res* 12(7 Pt 2): 2366s-2370s.
- Florenes, V. A., C. Lu, N. Bhattacharya, J. Rak, C. Sheehan, J. M. Slingerland and R. S. Kerbel (1999). "Interleukin-6 dependent induction of the cyclin dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 is lost during progression of human malignant melanoma." *Oncogene* 18(4): 1023-32.
- Friedrich, M., N. Hoss, F. Stogbauer, V. Senner, W. Paulus, E. B. Ringelstein and H. Halfter (2001). "Complete inhibition of in vivo glioma growth by oncostatin M." *J Neurochem* 76(5): 1589-92.
- Gallucci, R. M., P. P. Simeonova, J. M. Matheson, C. Kommineni, J. L. Guriel, T. Sugawara and M. I. Luster (2000). "Impaired cutaneous wound healing in interleukin-6-deficient and immunosuppressed mice." *Faseb J* 14(15): 2525-31.
- Gearing, D. P., M. R. Comeau, D. J. Friend, S. D. Gimpel, C. J. Thut, J. McGourty, K. K. Brasher, J. A. King, S. Gillis, B. Mosley and et al. (1992). "The IL-6 signal transducer, gp130: an oncostatin M receptor and affinity converter for the LIF receptor." *Science* 255(5050): 1434-7.
- Gervois, N., F. Heuze, E. Diez and F. Jotereau (1990). "Selective expansion of a specific anti-tumor CD8+ cytotoxic T lymphocyte clone in the bulk culture of tumor-infiltrating lymphocytes from a melanoma patient: cytotoxic activity and T cell receptor gene rearrangements." *Eur J Immunol* 20(4): 825-31.

- Gogas, H., J. Ioannovich, U. Dafni, C. Stavropoulou-Giokas, K. Frangia, D. Tsoutsos, P. Panagiotou, A. Polyzos, O. Papadopoulos, A. Stratigos, C. Markopoulos, D. Bafaloukos, D. Pectasides, G. Fountzilias and J. M. Kirkwood (2006). "Prognostic significance of autoimmunity during treatment of melanoma with interferon." *N Engl J Med* 354(7): 709-18.
- Goren, I., H. Kampf, E. Muller, D. Schiefelbein, J. Pfeilschifter and S. Frank (2006). "Oncostatin M expression is functionally connected to neutrophils in the early inflammatory phase of skin repair: implications for normal and diabetes-impaired wounds." *J Invest Dermatol* 126(3): 628-37.
- Grant, S. L. and C. G. Begley (1999). "The oncostatin M signalling pathway: reversing the neoplastic phenotype?" *Mol Med Today* 5(9): 406-12.
- Grant, S. L. and C. G. Begley (1999). "The oncostatin M signalling pathway: reversing the neoplastic phenotype?" *Mol Med Today* 5(9): 406-12.
- Grant, S. L., A. M. Douglas, G. A. Goss and C. G. Begley (2001). "Oncostatin M and leukemia inhibitory factor regulate the growth of normal human breast epithelial cells." *Growth Factors* 19(3): 153-62.
- Gray-Schopfer, V., C. Wellbrock and R. Marais (2007). "Melanoma biology and new targeted therapy." *Nature* 445(7130): 851-7.
- Gray-Schopfer, V. C., S. da Rocha Dias and R. Marais (2005). "The role of B-RAF in melanoma." *Cancer Metastasis Rev* 24(1): 165-83.
- Grenier, A., M. Dehoux, A. Boutten, M. Arce-Vicioso, G. Durand, M. A. Gougerot-Pocidalo and S. Chollet-Martin (1999). "Oncostatin M production and regulation by human polymorphonuclear neutrophils." *Blood* 93(4): 1413-21.
- Haan, S., M. Kortylewski, I. Behrmann, W. Muller-Esterl, P. C. Heinrich and F. Schaper (2000). "Cytoplasmic STAT proteins associate prior to activation." *Biochem J* 345 Pt 3: 417-21.
- Heinrich, P. C., I. Behrmann, S. Haan, H. M. Hermanns, G. Muller-Newen and F. Schaper (2003). "Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation." *Biochem J* 374(Pt 1): 1-20.
- Heinrich, P. C., I. Behrmann, G. Muller-Newen, F. Schaper and L. Graeve (1998). "Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway." *Biochem J* 334 (Pt 2): 297-314.
- Hermanns, H. M., S. Radtke, F. Schaper, P. C. Heinrich and I. Behrmann (2000). "Non-redundant signal transduction of interleukin-6-type cytokines. The adapter protein Shc is specifically recruited to the oncostatin M receptor." *J Biol Chem* 275(52): 40742-8.
- Hersey, P. (2006). "Apoptosis and melanoma: how new insights are effecting the development of new therapies for melanoma." *Curr Opin Oncol* 18(2): 189-96.
- Heymann, D., F. Blanchard, S. Raher, D. De Groote and A. Godard (1995). "Modulation of LIF expression in human melanoma cells by oncostatin M." *Immunol Lett* 46(3): 245-51.
- Hofbauer, G. F., A. Burkhart, G. Schuler, R. Dummer, G. Burg and F. O. Nestle (2004). "High frequency of melanoma-associated antigen or HLA class I loss does not correlate with survival in primary melanoma." *J Immunother* (1997) 27(1): 73-8.
- Holgado-Madruga, M., D. R. Emlet, D. K. Moscatello, A. K. Godwin and A. J. Wong (1996). "A Grb2-associated docking protein in EGF- and insulin-receptor signalling." *Nature* 379(6565): 560-4.
- Homsy, J., C. Cubitt and A. Daud (2007). "The Src signaling pathway: a potential target in melanoma and other malignancies." *Expert Opin Ther Targets* 11(1): 91-100.

- Horvai, A. E., L. Xu, E. Korzus, G. Brard, D. Kalafus, T. M. Mullen, D. W. Rose, M. G. Rosenfeld and C. K. Glass (1997). "Nuclear integration of JAK/STAT and Ras/AP-1 signaling by CBP and p300." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(4): 1074-9.
- Hsu, J. H., Y. Shi, P. Frost, H. Yan, B. Hoang, S. Sharma, J. Gera and A. Lichtenstein (2004). "Interleukin-6 activates phosphoinositol-3' kinase in multiple myeloma tumor cells by signaling through RAS-dependent and, separately, through p85-dependent pathways." *Oncogene* 23(19): 3368-75.
- Ivanov, V. N., A. Bhoomik and Z. Ronai (2003). "Death receptors and melanoma resistance to apoptosis." *Oncogene* 22(20): 3152-61.
- Jacinto, E., V. Facchinetti, D. Liu, N. Soto, S. Wei, S. Y. Jung, Q. Huang, J. Qin and B. Su (2006). "SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity." *Cell* 127(1): 125-37.
- Jaenisch, R. and A. Bird (2003). "Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals." *Nat Genet* 33 Suppl: 245-54.
- Jain, N., T. Zhang, W. H. Kee, W. Li and X. Cao (1999). "Protein kinase C delta associates with and phosphorylates Stat3 in an interleukin-6-dependent manner." *J Biol Chem* 274(34): 24392-400.
- Jarry, A., D. Masson, E. Cassagnau, S. Parois, C. Laboisie and M. G. Denis (2004). "Real-time allele-specific amplification for sensitive detection of the BRAF mutation V600E." *Mol Cell Probes* 18(5): 349-52.
- Kamaraju, A. K., C. Bertolotto, J. Chebath and M. Revel (2002). "Pax3 down-regulation and shut-off of melanogenesis in melanoma B16/F10.9 by interleukin-6 receptor signaling." *J Biol Chem* 277(17): 15132-41.
- Karst, A. M., D. L. Dai, M. Martinka and G. Li (2005). "PUMA expression is significantly reduced in human cutaneous melanomas." *Oncogene* 24(6): 1111-6.
- Kawakami, Y., S. Eliyahu, C. Jennings, K. Sakaguchi, X. Kang, S. Southwood, P. F. Robbins, A. Sette, E. Appella and S. A. Rosenberg (1995). "Recognition of multiple epitopes in the human melanoma antigen gp100 by tumor-infiltrating T lymphocytes associated with in vivo tumor regression." *J Immunol* 154(8): 3961-8.
- Kawakami, Y., H. Nishimoto, J. Kitaura, M. Maeda-Yamamoto, R. M. Kato, D. R. Littman, M. Leitges, D. J. Rawlings and T. Kawakami (2004). "Protein kinase C betaII regulates Akt phosphorylation on Ser-473 in a cell type- and stimulus-specific fashion." *J Biol Chem* 279(46): 47720-5.
- Kerr, C., C. Langdon, F. Graham, J. Gauldie, T. Hara and C. D. Richards (1999). "Adenovirus vector expressing mouse oncostatin M induces acute-phase proteins and TIMP-1 expression in vivo in mice." *J Interferon Cytokine Res* 19(10): 1195-205.
- Khammari, A., J. M. Nguyen, M. C. Pandolfino, G. Quereux, A. Brocard, S. Bercegeay, A. Cassidanius, P. Lemarre, C. Volteau, N. Labarriere, F. Jotereau and B. Dreno (2007). "Long-term follow-up of patients treated by adoptive transfer of melanoma tumor-infiltrating lymphocytes as adjuvant therapy for stage III melanoma." *Cancer Immunol Immunother* 56(11): 1853-60.
- Kim, H. and H. Baumann (1997). "The carboxyl-terminal region of STAT3 controls gene induction by the mouse haptoglobin promoter." *J Biol Chem* 272(23): 14571-9.
- Kim, H. and H. Baumann (1999). "Dual signaling role of the protein tyrosine phosphatase SHP-2 in regulating expression of acute-phase plasma proteins by interleukin-6 cytokine receptors in hepatic cells." *Mol Cell Biol* 19(8): 5326-38.

- King, D. M., M. R. Albertini, H. Schalch, J. A. Hank, J. Gan, J. Surfus, D. Mahvi, J. H. Schiller, T. Warner, K. Kim, J. Eickhoff, K. Kendra, R. Reisfeld, S. D. Gillies and P. Sondel (2004). "Phase I clinical trial of the immunocytokine EMD 273063 in melanoma patients." *J Clin Oncol* 22(22): 4463-73.
- Kirkwood, J. M., S. Moschos and W. Wang (2006). "Strategies for the development of more effective adjuvant therapy of melanoma: current and future explorations of antibodies, cytokines, vaccines, and combinations." *Clin Cancer Res* 12(7 Pt 2): 2331s-2336s.
- Klausen, P., L. Pedersen, J. Jurlander and H. Baumann (2000). "Oncostatin M and interleukin 6 inhibit cell cycle progression by prevention of p27kip1 degradation in HepG2 cells." *Oncogene* 19(32): 3675-83.
- Koivunen, J., V. Aaltonen and J. Peltonen (2006). "Protein kinase C (PKC) family in cancer progression." *Cancer Lett* 235(1): 1-10.
- Kojima, H., T. Sasaki, T. Ishitani, S. Iemura, H. Zhao, S. Kaneko, H. Kunimoto, T. Natsume, K. Matsumoto and K. Nakajima (2005). "STAT3 regulates Nemo-like kinase by mediating its interaction with IL-6-stimulated TGFbeta-activated kinase 1 for STAT3 Ser-727 phosphorylation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(12): 4524-9.
- Komyod, W., M. Bohm, D. Metze, P. C. Heinrich and I. Behrmann (2007). "Constitutive suppressor of cytokine signaling 3 expression confers a growth advantage to a human melanoma cell line." *Mol Cancer Res* 5(3): 271-81.
- Kopf, M., H. Baumann, G. Freer, M. Freudenberg, M. Lamers, T. Kishimoto, R. Zinkernagel, H. Bluethmann and G. Kohler (1994). "Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice." *Nature* 368(6469): 339-42.
- Kortylewski, M., P. C. Heinrich, A. Mackiewicz, U. Schniertshauer, U. Klingmuller, K. Nakajima, T. Hirano, F. Horn and I. Behrmann (1999). "Interleukin-6 and oncostatin M-induced growth inhibition of human A375 melanoma cells is STAT-dependent and involves upregulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27/Kip1." *Oncogene* 18(25): 3742-53.
- Kortylewski, M., R. Jove and H. Yu (2005). "Targeting STAT3 affects melanoma on multiple fronts." *Cancer Metastasis Rev* 24(2): 315-27.
- Korzus, E., H. Nagase, R. Rydell and J. Travis (1997). "The mitogen-activated protein kinase and JAK-STAT signaling pathways are required for an oncostatin M-responsive element-mediated activation of matrix metalloproteinase 1 gene expression." *J Biol Chem* 272(2): 1188-96.
- Krepler, C., U. Certa, V. Wacheck, B. Jansen, K. Wolff and H. Pehamberger (2004). "Pegylated and conventional interferon-alpha induce comparable transcriptional responses and inhibition of tumor growth in a human melanoma SCID mouse xenotransplantation model." *J Invest Dermatol* 123(4): 664-9.
- La Porta, C. A., D. Porro and R. Comolli (2002). "Higher levels of melanin and inhibition of cdk2 activity in primary human melanoma cells WM115 overexpressing nPKCdelta." *Melanoma Res* 12(4): 297-307.
- Labarriere, N., M. C. Pandolfino, N. Gervois, A. Khammari, M. H. Tessier, B. Dreno and F. Jotereau (2002). "Therapeutic efficacy of melanoma-reactive TIL injected in stage III melanoma patients." *Cancer Immunol Immunother* 51(10): 532-8.
- Lacrousette, A., A. Lartigue, J. M. Nguyen, I. Barbieux, M. C. Pandolfino, A. Khammari, B. Dréno, Y. Jacques, F. Blanchard and A. Godard (2008b). "Responsiveness of cancer cells to Oncostatin M and/or IL-6 correlates with relapse-free survival of stage III melanoma patients treated with tumor-infiltrating lymphocytes." *Am J Pathol* (submitted).

- Lacrousette, A., I. Barbieux, J.M. Nguyen, M.C. Pandolfino, B. Dréno, Y. Jacques, A. Godard and F. Blanchard (2008a). "Oncostatin M resistance in metastatic melanoma cells and the respective role of STAT3, PKC and Akt isoforms." *Cancer Res* (in revision).
- Lacrousette, A., J. M. Nguyen, M. C. Pandolfino, A. Khammari, B. Dreno, Y. Jacques, A. Godard and F. Blanchard (2007). "Loss of oncostatin M receptor beta in metastatic melanoma cells." *Oncogene* 26(6): 881-92.
- Langdon, C., C. Kerr, M. Hassen, T. Hara, A. L. Arsenault and C. D. Richards (2000). "Murine oncostatin M stimulates mouse synovial fibroblasts in vitro and induces inflammation and destruction in mouse joints in vivo." *Am J Pathol* 157(4): 1187-96.
- Le Good, J. A., W. H. Ziegler, D. B. Parekh, D. R. Alessi, P. Cohen and P. J. Parker (1998). "Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1." *Science* 281(5385): 2042-5.
- Lesinski, G. B., D. Valentino, E. M. Hade, S. Jones, C. Magro, A. R. Chaudhury, M. J. Walker and W. E. Carson, 3rd (2005). "Expression of STAT1 and STAT2 in malignant melanoma does not correlate with response to interferon-alpha adjuvant therapy." *Cancer Immunol Immunother* 54(9): 815-25.
- Li, W. Q., F. Dehnade and M. Zafarullah (2001). "Oncostatin M-induced matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 genes expression in chondrocytes requires Janus kinase/STAT signaling pathway." *J Immunol* 166(5): 3491-8.
- Li, Z., D. Metze, D. Nashan, C. Muller-Tidow, H. L. Serve, C. Poremba, T. A. Luger and M. Bohm (2004). "Expression of SOCS-1, suppressor of cytokine signalling-1, in human melanoma." *J Invest Dermatol* 123(4): 737-45.
- Liang, J., J. Zubovitz, T. Petrocelli, R. Kotchetkov, M. K. Connor, K. Han, J. H. Lee, S. Ciarallo, C. Catzavelos, R. Beniston, E. Franssen and J. M. Slingerland (2002). "PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest." *Nat Med* 8(10): 1153-60.
- Lin, Z. Q., T. Kondo, Y. Ishida, T. Takayasu and N. Mukaida (2003). "Essential involvement of IL-6 in the skin wound-healing process as evidenced by delayed wound healing in IL-6-deficient mice." *J Leukoc Biol* 73(6): 713-21.
- Linsley, P. S., J. Kallestad, V. Ochs and M. Neubauer (1990). "Cleavage of a hydrophilic C-terminal domain increases growth-inhibitory activity of oncostatin M." *Mol Cell Biol* 10(5): 1882-90.
- Loy, J. K., T. J. Davidson, K. K. Berry, J. F. Macmaster, B. Danle and S. K. Durham (1999). "Oncostatin M: development of a pleiotropic cytokine." *Toxicol Pathol* 27(2): 151-5.
- Lu, C., J. W. Rak, H. Kobayashi and R. S. Kerbel (1993). "Increased resistance to oncostatin M-induced growth inhibition of human melanoma cell lines derived from advanced-stage lesions." *Cancer Res* 53(12): 2708-11.
- Lu, C., C. Sheehan, J. W. Rak, C. A. Chambers, N. Hozumi and R. S. Kerbel (1996). "Endogenous interleukin 6 can function as an in vivo growth- stimulatory factor for advanced-stage human melanoma cells." *Clin Cancer Res* 2(8): 1417-25.
- Lufei, C., T. H. Koh, T. Uchida and X. Cao (2007). "Pin1 is required for the Ser727 phosphorylation-dependent Stat3 activity." *Oncogene*.
- Malaval, L., F. Liu, A. B. Vernallis and J. E. Aubin (2005). "GP130/OSMR is the only LIF/IL-6 family receptor complex to promote osteoblast differentiation of calvaria progenitors." *J Cell Physiol* 204(2): 585-93.

- Malik, N., J. C. Kallestad, N. L. Gunderson, S. D. Austin, M. G. Neubauer, V. Ochs, H. Marquardt, J. M. Zarling, M. Shoyab, C. M. Wei and et al. (1989). "Molecular cloning, sequence analysis, and functional expression of a novel growth regulator, oncostatin M." *Mol Cell Biol* 9(7): 2847-53.
- Manning, B. D., A. R. Tee, M. N. Logsdon, J. Blenis and L. C. Cantley (2002). "Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway." *Mol Cell* 10(1): 151-62.
- Maritano, D., M. L. Sugrue, S. Tininini, S. Dewilde, B. Strobl, X. Fu, V. Murray-Tait, R. Chiarle and V. Poli (2004). "The STAT3 isoforms alpha and beta have unique and specific functions." *Nat Immunol* 5(4): 401-9.
- Marks, P. A., V. M. Richon, T. Miller and W. K. Kelly (2004). "Histone deacetylase inhibitors." *Adv Cancer Res* 91: 137-68.
- Merighi, S., A. Benini, P. Mirandola, S. Gessi, K. Varani, E. Leung, S. MacLennan and P. A. Borea (2005). "A3 adenosine receptor activation inhibits cell proliferation via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent inhibition of the extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation in A375 human melanoma cells." *J Biol Chem* 280(20): 19516-26.
- Meyer, T., K. Gavenis and U. Vinkemeier (2002). "Cell type-specific and tyrosine phosphorylation-independent nuclear presence of STAT1 and STAT3." *Exp Cell Res* 272(1): 45-55.
- Miles, S. A., O. Martinez-Maza, A. Rezai, L. Magpantay, T. Kishimoto, S. Nakamura, S. F. Radka and P. S. Linsley (1992). "Oncostatin M as a potent mitogen for AIDS-Kaposi's sarcoma-derived cells." *Science* 255(5050): 1432-4.
- Miller, A. J. and M. C. Mihm, Jr. (2006). "Melanoma." *N Engl J Med* 355(1): 51-65.
- Miyajima, A., T. Kinoshita, M. Tanaka, A. Kamiya, Y. Mukouyama and T. Hara (2000). "Role of Oncostatin M in hematopoiesis and liver development." *Cytokine Growth Factor Rev* 11(3): 177-83.
- Modur, V., M. J. Feldhaus, A. S. Weyrich, D. L. Jicha, S. M. Prescott, G. A. Zimmerman and T. M. McIntyre (1997). "Oncostatin M is a proinflammatory mediator. In vivo effects correlate with endothelial cell expression of inflammatory cytokines and adhesion molecules." *J Clin Invest* 100(1): 158-68.
- Montero-Julian, F. A., H. Brailly, C. Sautes, I. Joyeux, T. Dorval, V. Mosseri, K. Yasukawa, J. Wijdenes, A. Adler, I. Gorin, W. H. Fridman and E. Tartour (1997). "Characterization of soluble gp130 released by melanoma cell lines: A polyvalent antagonist of cytokines from the interleukin 6 family." *Clin Cancer Res* 3(8): 1443-51.
- Mori, T., S. J. O'Day, N. Umetani, S. R. Martinez, M. Kitago, K. Koyanagi, C. Kuo, T. L. Takeshima, R. Milford, H. J. Wang, V. D. Vu, S. L. Nguyen and D. S. Hoon (2005). "Predictive utility of circulating methylated DNA in serum of melanoma patients receiving biochemotherapy." *J Clin Oncol* 23(36): 9351-8.
- Morikawa, Y., S. Tamura, K. Minehata, P. J. Donovan, A. Miyajima and E. Senba (2004). "Essential function of oncostatin m in nociceptive neurons of dorsal root ganglia." *J Neurosci* 24(8): 1941-7.
- Mosley, B., C. De Imus, D. Friend, N. Boiani, B. Thoma, L. S. Park and D. Cosman (1996). "Dual oncostatin M (OSM) receptors. Cloning and characterization of an alternative signaling subunit conferring OSM-specific receptor activation." *J Biol Chem* 271(51): 32635-43.
- Mouawad, R., D. Khayat, S. Merle, E. C. Antoine, M. Gil-Delgado and C. Soubrane (1999). "Is there any relationship between interleukin-6/interleukin-6 receptor

- modulation and endogenous interleukin-6 release in metastatic malignant melanoma patients treated by biochemotherapy?" *Melanoma Res* 9(2): 181-8.
- Mukouyama, Y., T. Hara, M. Xu, K. Tamura, P. J. Donovan, H. Kim, H. Kogo, K. Tsuji, T. Nakahata and A. Miyajima (1998). "In vitro expansion of murine multipotential hematopoietic progenitors from the embryonic aorta-gonad-mesonephros region." *Immunity* 8(1): 105-14.
- Mule, J. J., J. K. McIntosh, D. M. Jablons and S. A. Rosenberg (1990). "Antitumor activity of recombinant interleukin 6 in mice." *J Exp Med* 171(3): 629-36.
- Murakami, M., D. Kamimura and T. Hirano (2004). "New IL-6 (gp130) family cytokine members, CLC/NNT1/BSF3 and IL-27." *Growth Factors* 22(2): 75-7.
- Nair, B. C., A. L. DeVico, S. Nakamura, T. D. Copeland, Y. Chen, A. Patel, T. O'Neil, S. Oroszlan, R. C. Gallo and M. G. Sarngadharan (1992). "Identification of a major growth factor for AIDS-Kaposi's sarcoma cells as oncostatin M." *Science* 255(5050): 1430-2.
- Nakamura, K., H. Nonaka, H. Saito, M. Tanaka and A. Miyajima (2004). "Hepatocyte proliferation and tissue remodeling is impaired after liver injury in oncostatin M receptor knockout mice." *Hepatology* 39(3): 635-44.
- Nawrocki, S., P. Murawa, J. Malicki, M. Kapcinska, K. Gryska, D. Izycki, A. Kaczmarek, M. Laciak, A. Czapczyk, A. Karczewska, S. Rose-John and A. Mackiewicz (2000). "Genetically modified tumour vaccines (GMTV) in melanoma clinical trials." *Immunol Lett* 74(1): 81-6.
- Ndubuisi, M. I., G. G. Guo, V. A. Fried, J. D. Etlinger and P. B. Sehgal (1999). "Cellular physiology of STAT3: Where's the cytoplasmic monomer?" *J Biol Chem* 274(36): 25499-509.
- Neis, M. M., B. Peters, A. Dreuw, J. Wenzel, T. Bieber, C. Mauch, T. Krieg, S. Stanzel, P. C. Heinrich, H. F. Merk, A. Bosio, J. M. Baron and H. M. Hermanns (2006). "Enhanced expression levels of IL-31 correlate with IL-4 and IL-13 in atopic and allergic contact dermatitis." *J Allergy Clin Immunol* 118(4): 930-7.
- Neuner, P., A. Urbanski, F. Trautinger, A. Moller, R. Kirnbauer, A. Kapp, E. Schopf, T. Schwarz and T. A. Luger (1991). "Increased IL-6 production by monocytes and keratinocytes in patients with psoriasis." *J Invest Dermatol* 97(1): 27-33.
- Ng, G., D. Winder, B. Muralidhar, E. Gooding, I. Roberts, M. Pett, G. Mukherjee, J. Huang and N. Coleman (2007). "Gain and overexpression of the oncostatin M receptor occur frequently in cervical squamous cell carcinoma and are associated with adverse clinical outcome." *J Pathol* 212(3): 325-34.
- Nishimoto, N., A. Ogata, Y. Shima, Y. Tani, H. Ogawa, M. Nakagawa, H. Sugiyama, K. Yoshizaki and T. Kishimoto (1994). "Oncostatin M, leukemia inhibitory factor, and interleukin 6 induce the proliferation of human plasmacytoma cells via the common signal transducer, gp130." *J Exp Med* 179(4): 1343-7.
- Niu, G., T. Bowman, M. Huang, S. Shivers, D. Reintgen, A. Daud, A. Chang, A. Kraker, R. Jove and H. Yu (2002). "Roles of activated Src and Stat3 signaling in melanoma tumor cell growth." *Oncogene* 21(46): 7001-10.
- Oka, M. and U. Kikkawa (2005). "Protein kinase C in melanoma." *Cancer Metastasis Rev* 24(2): 287-300.
- Olencki, T., J. Finke, R. Tubbs, P. Elson, D. McLain, P. Herzog, G. T. Budd, H. Gunn and R. M. Bukowski (2000). "Phase 1 trial of subcutaneous IL-6 in patients with refractory cancer: clinical and biologic effects." *J Immunother* (1997) 23(5): 549-56.

- Ouyang, L., L. Y. Shen, T. Li and J. Liu (2006). "Inhibition effect of Oncostatin M on metastatic human lung cancer cells 95-D in vitro and on murine melanoma cells B16BL6 in vivo." *Biomed Res* 27(4): 197-202.
- Ozbek, S., M. Peters, K. Breuhahn, A. Mann, M. Blessing, M. Fischer, P. Schirmacher, A. Mackiewicz and S. Rose-John (2001). "The designer cytokine hyper-IL-6 mediates growth inhibition and GM-CSF-dependent rejection of B16 melanoma cells." *Oncogene* 20(8): 972-9.
- Paglia, D., A. Oran, C. Lu, R. S. Kerbel, D. N. Sauder and R. C. McKenzie (1995). "Expression of leukemia inhibitory factor and interleukin-11 by human melanoma cell lines: LIF, IL-6, and IL-11 are not coregulated." *J Interferon Cytokine Res* 15(5): 455-60.
- Palmqvist, P., E. Persson, H. H. Conaway and U. H. Lerner (2002). "IL-6, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M stimulate bone resorption and regulate the expression of receptor activator of NF-kappa B ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF-kappa B in mouse calvariae." *J Immunol* 169(6): 3353-62.
- Pandolfino, M. C., N. Labarriere, M. H. Tessier, A. Cassidanius, S. Bercegeay, P. Lemarre, F. Dehaut, B. Dreno and F. Jotereau (2001). "High-scale expansion of melanoma-reactive TIL by a polyclonal stimulus: predictability and relation with disease advancement." *Cancer Immunol Immunother* 50(3): 134-40.
- Pansky, A., P. Hildebrand, E. Fasler-Kan, L. Baselgia, S. Ketterer, C. Beglinger and M. H. Heim (2000). "Defective Jak-STAT signal transduction pathway in melanoma cells resistant to growth inhibition by interferon-alpha." *Int J Cancer* 85(5): 720-5.
- Park, Y. J., E. S. Park, M. S. Kim, T. Y. Kim, H. S. Lee, S. Lee, I. S. Jang, M. Shong, D. J. Park and B. Y. Cho (2002). "Involvement of the protein kinase C pathway in thyrotropin-induced STAT3 activation in FRTL-5 thyroid cells." *Mol Cell Endocrinol* 194(1-2): 77-84.
- Parmiani, G., C. Castelli, M. Santinami and L. Rivoltini (2007). "Melanoma immunology: past, present and future." *Curr Opin Oncol* 19(2): 121-7.
- Partovian, C. and M. Simons (2004). "Regulation of protein kinase B/Akt activity and Ser473 phosphorylation by protein kinase Calpha in endothelial cells." *Cell Signal* 16(8): 951-7.
- Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." *Nucleic Acids Res* 29(9): e45.
- Pfaffl, M. W., A. Tichopad, C. Prgomet and T. P. Neuvians (2004). "Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations." *Biotechnol Lett* 26(6): 509-15.
- Quereux, G., M. C. Pandolfino, A. C. Knol, A. Khammari, C. Volteau, J. M. Nguyen and B. Dreno (2007). "Tissue prognostic markers for adoptive immunotherapy in melanoma." *Eur J Dermatol* 17(4): 295-301.
- Radtke, S., H. M. Hermanns, C. Haan, H. Schmitz-Van De Leur, H. Gascan, P. C. Heinrich and I. Behrmann (2002). "Novel role of Janus kinase 1 in the regulation of oncostatin M receptor surface expression." *J Biol Chem* 277(13): 11297-305.
- Ribas, A. (2006). "Update on immunotherapy for melanoma." *J Natl Compr Canc Netw* 4(7): 687-94.
- Ribas, A., L. H. Camacho, G. Lopez-Berestein, D. Pavlov, C. A. Bulanhagui, R. Millham, B. Comin-Anduix, J. M. Reuben, E. Seja, C. A. Parker, A. Sharma, J. A. Glaspy and J. Gomez-Navarro (2005). "Antitumor activity in melanoma and anti-self

- responses in a phase I trial with the anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 monoclonal antibody CP-675,206." *J Clin Oncol* 23(35): 8968-77.
- Richards, C. D., T. J. Brown, M. Shoyab, H. Baumann and J. Gauldie (1992). "Recombinant oncostatin M stimulates the production of acute phase proteins in HepG2 cells and rat primary hepatocytes in vitro." *J Immunol* 148(6): 1731-6.
- Richards, C. D., M. Shoyab, T. J. Brown and J. Gauldie (1993). "Selective regulation of metalloproteinase inhibitor (TIMP-1) by oncostatin M in fibroblasts in culture." *J Immunol* 150(12): 5596-603.
- Robbins, P. F., M. E. Dudley, J. Wunderlich, M. El-Gamil, Y. F. Li, J. Zhou, J. Huang, D. J. Powell, Jr. and S. A. Rosenberg (2004). "Cutting edge: persistence of transferred lymphocyte clonotypes correlates with cancer regression in patients receiving cell transfer therapy." *J Immunol* 173(12): 7125-30.
- Robertson, G. P. (2005). "Functional and therapeutic significance of Akt deregulation in malignant melanoma." *Cancer Metastasis Rev* 24(2): 273-85.
- Rodriguez, T., R. Mendez, A. Del Campo, P. Jimenez, N. Aptsiauri, F. Garrido and F. Ruiz-Cabello (2007). "Distinct mechanisms of loss of IFN-gamma mediated HLA class I inducibility in two melanoma cell lines." *BMC Cancer* 7: 34.
- Ross, M. I. (2006). "New American Joint Commission on Cancer staging system for melanoma: prognostic impact and future directions." *Surg Oncol Clin N Am* 15(2): 341-52.
- Rothhammer, T. and A. K. Bosserhoff (2007). "Epigenetic events in malignant melanoma." *Pigment Cell Res* 20(2): 92-111.
- Sandor, V., S. Bakke, R. W. Robey, M. H. Kang, M. V. Blagosklonny, J. Bender, R. Brooks, R. L. Piekarz, E. Tucker, W. D. Figg, K. K. Chan, B. Goldspiel, A. T. Fojo, S. P. Balcerzak and S. E. Bates (2002). "Phase I trial of the histone deacetylase inhibitor, depsipeptide (FR901228, NSC 630176), in patients with refractory neoplasms." *Clin Cancer Res* 8(3): 718-28.
- Sato, A., M. Ohtsuki, M. Hata, E. Kobayashi and T. Murakami (2006). "Antitumor activity of IFN-lambda in murine tumor models." *J Immunol* 176(12): 7686-94.
- Sawamura, D., X. Meng, S. Ina, M. Sato, K. Tamai, K. Hanada and I. Hashimoto (1998). "Induction of keratinocyte proliferation and lymphocytic infiltration by in vivo introduction of the IL-6 gene into keratinocytes and possibility of keratinocyte gene therapy for inflammatory skin diseases using IL-6 mutant genes." *J Immunol* 161(10): 5633-9.
- Schuringa, J. J., H. Schepers, E. Vellenga and W. Kruijer (2001). "Ser727-dependent transcriptional activation by association of p300 with STAT3 upon IL-6 stimulation." *FEBS Lett* 495(1-2): 71-6.
- Sharma, R., S. Samantaray, N. K. Shukla and R. Ralhan (2003). "Transcriptional gene expression profile of human esophageal squamous cell carcinoma." *Genomics* 81(5): 481-8.
- Shen, X., J. Zhou, K. S. Hathcock, P. Robbins, D. J. Powell, Jr., S. A. Rosenberg and R. J. Hodes (2007). "Persistence of tumor infiltrating lymphocytes in adoptive immunotherapy correlates with telomere length." *J Immunother* (1997) 30(1): 123-9.
- Soengas, M. S. and S. W. Lowe (2003). "Apoptosis and melanoma chemoresistance." *Oncogene* 22(20): 3138-51.
- Sonkoly, E., A. Muller, A. I. Lauerma, A. Pivarsci, H. Soto, L. Kemeny, H. Alenius, M. C. Dieu-Nosjean, S. Meller, J. Rieker, M. Steinhoff, T. K. Hoffmann, T. Ruzicka, A. Zlotnik and B. Homey (2006). "IL-31: a new link between T cells and pruritus in atopic skin inflammation." *J Allergy Clin Immunol* 117(2): 411-7.

- Staunton, D., K. R. Hudson and J. K. Heath (1998). "The interactions of the cytokine-binding homology region and immunoglobulin-like domains of gp130 with oncostatin M: implications for receptor complex formation." *Protein Eng* 11(11): 1093-102.
- Stephens, L., K. Anderson, D. Stokoe, H. Erdjument-Bromage, G. F. Painter, A. B. Holmes, P. R. Gaffney, C. B. Reese, F. McCormick, P. Tempst, J. Coadwell and P. T. Hawkins (1998). "Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B." *Science* 279(5351): 710-4.
- Suda, T., K. Chida, A. Todate, K. Ide, K. Asada, Y. Nakamura, K. Suzuki, H. Kuwata and H. Nakamura (2002). "Oncostatin M production by human dendritic cells in response to bacterial products." *Cytokine* 17(6): 335-40.
- Sugaya, M., L. Fang, A. R. Cardones, T. Kakinuma, S. H. Jaber, A. Blauvelt and S. T. Hwang (2006). "Oncostatin M enhances CCL21 expression by microvascular endothelial cells and increases the efficiency of dendritic cell trafficking to lymph nodes." *J Immunol* 177(11): 7665-72.
- Sun, W., M. Snyder, D. E. Levy and J. J. Zhang (2006). "Regulation of Stat3 transcriptional activity by the conserved LPMSP motif for OSM and IL-6 signaling." *FEBS Lett* 580(25): 5880-4.
- Takeuchi, H., D. L. Morton, D. Elashoff and D. S. Hoon (2005). "Survivin expression by metastatic melanoma predicts poor disease outcome in patients receiving adjuvant polyvalent vaccine." *Int J Cancer* 117(6): 1032-8.
- Tanaka, M., Y. Hirabayashi, T. Sekiguchi, T. Inoue, M. Katsuki and A. Miyajima (2003). "Targeted disruption of oncostatin M receptor results in altered hematopoiesis." *Blood* 102(9): 3154-62.
- Tanaka, M. and A. Miyajima (2003). "Oncostatin M, a multifunctional cytokine." *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 149: 39-52.
- Tanaka, T. and N. Umesaki (2003). "Oncostatin M inhibits decidualization of normal human endometrial stromal cells." *Int J Mol Med* 11(5): 627-30.
- Tarhini, A. A. and J. M. Kirkwood (2007). "Oblimersen in the treatment of metastatic melanoma." *Future Oncol* 3(3): 263-71.
- Tartour, E., T. Dorval, V. Mosseri, L. Deneux, C. Mathiot, H. Brailly, F. Montero, I. Joyeux, P. Pouillart and W. H. Fridman (1994). "Serum interleukin 6 and C-reactive protein levels correlate with resistance to IL-2 therapy and poor survival in melanoma patients." *Br J Cancer* 69(5): 911-3.
- Tas, F., H. Oguz, A. Argon, D. Duranyildiz, H. Camlica, V. Yasasever and E. Topuz (2005). "The value of serum levels of IL-6, TNF-alpha, and erythropoietin in metastatic malignant melanoma: serum IL-6 level is a valuable prognostic factor at least as serum LDH in advanced melanoma." *Med Oncol* 22(3): 241-6.
- Thyrell, L., L. Hjortsberg, V. Arulampalam, T. Panaretakis, S. Uhles, M. Dagnell, B. Zhivotovsky, I. Leibiger, D. Grander and K. Pokrovskaja (2004). "Interferon alpha-induced apoptosis in tumor cells is mediated through the phosphoinositide 3-kinase/mammalian target of rapamycin signaling pathway." *J Biol Chem* 279(23): 24152-62.
- Tokita, T., C. Maesawa, T. Kimura, K. Kotani, K. Takahashi, T. Akasaka and T. Masuda (2007). "Methylation status of the SOCS3 gene in human malignant melanomas." *Int J Oncol* 30(3): 689-94.
- van Horssen, R., J. A. Rens, F. Brunstein, V. Guns, M. van Gils, T. L. Hagen and A. M. Eggermont (2006). "Intratumoural expression of TNF-R1 and EMAP-II in

- relation to response of patients treated with TNF-based isolated limb perfusion." *Int J Cancer* 119(6): 1481-90.
- van Houdt, I. S., J. J. Oudejans, A. J. van den Eertwegh, A. Baars, W. Vos, B. A. Bladergroen, D. Rimoldi, J. J. Muris, E. Hooijberg, C. M. Gundy, C. J. Meijer and J. A. Kummer (2005). "Expression of the apoptosis inhibitor protease inhibitor 9 predicts clinical outcome in vaccinated patients with stage III and IV melanoma." *Clin Cancer Res* 11(17): 6400-7.
- Viglietto, G., M. L. Motti, P. Bruni, R. M. Melillo, A. D'Alessio, D. Califano, F. Vinci, G. Chiappetta, P. Tschlis, A. Bellacosa, A. Fusco and M. Santoro (2002). "Cytoplasmic relocalization and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer." *Nat Med* 8(10): 1136-44.
- Wachulska, M., K. Kozłowska and M. Cichorek (2005). "The DNA ploidy and proliferative activity of transplantable melanoma cells in regard to their secretory function." *Neoplasma* 52(4): 280-6.
- Wallace, P. M., J. F. Macmaster, J. R. Rillema, K. A. Rouleau, M. B. Hanson, S. A. Burstein and M. Shoyab (1995). "In vivo properties of oncostatin M." *Ann N Y Acad Sci* 762: 42-54.
- Wang, W., H. D. Edington, U. N. Rao, D. M. Jukic, S. R. Land, S. Ferrone and J. M. Kirkwood (2007). "Modulation of signal transducers and activators of transcription 1 and 3 signaling in melanoma by high-dose IFN α 2b." *Clin Cancer Res* 13(5): 1523-31.
- Wang, W. D., Z. T. Chen, D. Z. Li, Y. Z. Duan, Z. X. Wang and Z. H. Cao (2004). "[Oncostatin M gene therapy in mice bearing lung adenocarcinoma xenograft using a hypoxia/radiation dual-sensitive promoter]." *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 27(4): 240-3.
- Wellbrock, C., C. Weissner, J. C. Hassel, P. Fischer, J. Becker, C. S. Vetter, I. Behrmann, M. Kortylewski, P. C. Heinrich and M. Scharf (2005). "STAT5 contributes to interferon resistance of melanoma cells." *Curr Biol* 15(18): 1629-39.
- Wolchok, J. D. and Y. M. Saenger (2007). "Current topics in melanoma." *Curr Opin Oncol* 19(2): 116-20.
- Wong, L. H., K. G. Krauer, I. Hatzinisiriou, M. J. Estcourt, P. Hersey, N. D. Tam, S. Edmondson, R. J. Devenish and S. J. Ralph (1997). "Interferon-resistant human melanoma cells are deficient in ISGF3 components, STAT1, STAT2, and p48-ISGF3 γ ." *J Biol Chem* 272(45): 28779-85.
- Wrzesinski, C. and N. P. Restifo (2005). "Less is more: lymphodepletion followed by hematopoietic stem cell transplant augments adoptive T-cell-based anti-tumor immunotherapy." *Curr Opin Immunol* 17(2): 195-201.
- Xia, S., L. W. Forman and D. V. Faller (2007). "Protein kinase C δ is required for survival of cells expressing activated p21RAS." *J Biol Chem* 282(18): 13199-210.
- Yannelli, J. R. and J. M. Wroblewski (2004). "On the road to a tumor cell vaccine: 20 years of cellular immunotherapy." *Vaccine* 23(1): 97-113.
- Yao, L., J. Pan, H. Setiadi, K. D. Patel and R. P. McEver (1996). "Interleukin 4 or oncostatin M induces a prolonged increase in P-selectin mRNA and protein in human endothelial cells." *J Exp Med* 184(1): 81-92.
- Yoshida, M., R. Furumai, M. Nishiyama, Y. Komatsu, N. Nishino and S. Horinouchi (2001). "Histone deacetylase as a new target for cancer chemotherapy." *Cancer Chemother Pharmacol* 48 Suppl 1: S20-6.
- Yoshimura, A., M. Ichihara, I. Kinjyo, M. Moriyama, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins, T. Hara and A. Miyajima (1996). "Mouse oncostatin M: an

- immediate early gene induced by multiple cytokines through the JAK-STAT5 pathway." *Embo J* 15(5): 1055-63.
- Yu, D. and A. Thomas-Tikhonenko (2001). "Intratumoral delivery of an interferon gamma retrovirus-producing cells inhibits growth of a murine melanoma by a non-immune mechanism." *Cancer Lett* 173(2): 145-54.
- Yuan, Z. L., Y. J. Guan, D. Chatterjee and Y. E. Chin (2005). "Stat3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue." *Science* 307(5707): 269-73.
- Zarling, J. M., M. Shoyab, H. Marquardt, M. B. Hanson, M. N. Lioubin and G. J. Todaro (1986). "Oncostatin M: a growth regulator produced by differentiated histiocytic lymphoma cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(24): 9739-43.
- Zarling, J. M., M. Shoyab, H. Marquardt, M. B. Hanson, M. N. Lioubin and G. J. Todaro (1986). "Oncostatin M: a growth regulator produced by differentiated histiocytic lymphoma cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(24): 9739-43.
- Zeng, R., Y. Aoki, M. Yoshida, K. Arai and S. Watanabe (2002). "Stat5B shuttles between cytoplasm and nucleus in a cytokine-dependent and -independent manner." *J Immunol* 168(9): 4567-75.
- Zhang, J. J., U. Vinkemeier, W. Gu, D. Chakravarti, C. M. Horvath and J. E. Darnell, Jr. (1996). "Two contact regions between Stat1 and CBP/p300 in interferon gamma signaling." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(26): 15092-6.
- Zhang, X. G., J. J. Gu, Z. Y. Lu, K. Yasukawa, G. D. Yancopoulos, K. Turner, M. Shoyab, T. Taga, T. Kishimoto, R. Bataille and et al. (1994). "Ciliary neurotropic factor, interleukin 11, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M are growth factors for human myeloma cell lines using the interleukin 6 signal transducer gp130." *J Exp Med* 179(4): 1337-42.
- Zhou, B. P., Y. Liao, W. Xia, B. Spohn, M. H. Lee and M. C. Hung (2001). "Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells." *Nat Cell Biol* 3(3): 245-52.
- Zhou, B. P., Y. Liao, W. Xia, Y. Zou, B. Spohn and M. C. Hung (2001). "HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation." *Nat Cell Biol* 3(11): 973-82.

Rôle de l'Oncostatine M sur les mélanomes métastatiques et étude des mécanismes de résistance à cette cytokine

Oncostatine M, Interleukine-6, OSMR β , Acétylation des Histones, Mélanome de Grade III, STAT3, PKC, Akt, Lymphocytes Infiltrant les Tumeurs, Souris Nude.

Les mélanomes de grade III (métastases ganglionnaires) montrent une résistance aux thérapies classiques ainsi qu'aux effets anti-prolifératifs des cytokines *in vitro*. L'objectif de cette étude était de mieux comprendre le rôle de l'Oncostatine M (OSM), une cytokine de la famille de l'Interleukine (IL)-6, dans le développement des mélanomes métastatiques. Nous avons ainsi analysé les lignées cellulaires issues de 33 patients atteints de mélanome de grade III et montré que pour 30% des lignées, la résistance aux effets anti-prolifératifs de l'OSM est due à la répression épigénétique de l'expression de son récepteur : l'OSMR β ; pour 18% des lignées, la résistance à l'OSM est due à un défaut d'activation de la voie de transduction PKC/STAT3; et pour 21% d'entre elles, la résistance à l'OSM est associée à un défaut d'activation de la kinase Akt. Nous avons ensuite analysé rétrospectivement l'impact de ces résistances aux cytokines, sur la survie de 24 patients traités par des lymphocytes infiltrant les tumeurs (TIL). La survie sans rechute corrèle significativement avec la sensibilité à l'OSM et/ou à l'IL-6, mais pas à l'IFN γ ou au TNF α . De plus, les TIL produisent l'OSM et l'IL-6 juste avant leur injection aux patients. Chez la souris, l'OSM ralentit également la croissance tumorale de xénogreffes de mélanomes humains, par une inhibition directe de la prolifération.

Ainsi, l'OSM apparaît avoir un rôle majeur dans le contrôle de la prolifération des mélanomes. Cependant, la résistance à l'OSM/IL-6 permet aux cellules de mélanome métastatique d'échapper au système immunitaire, notamment lors d'un traitement par des TIL, et représente donc un nouveau facteur pronostique indépendant pour les patients atteints de mélanomes de grade III. Pour les patients réfractaires aux immunothérapies, il serait intéressant de rétablir la sensibilité des cellules de mélanome à l'OSM/IL-6 par la réexpression de l'OSMR β ou le rétablissement des voies de signalisation de ces cytokines.

Role of Oncostatin M on metastatic melanoma and study of the mechanisms of resistance to this cytokine

Oncostatin M, Interleukin-6, OSMR β , Histone Acetylation, Stage III Melanoma, STAT3, PKC, Akt, Tumour Infiltrating Lymphocytes, Nude Mice.

Stage III melanoma (lymph nodes metastases) shows resistance to common therapies and to anti-proliferative cytokines *in vitro*. The goal of this study was to better describe the role of Oncostatin M (OSM), a cytokine of the Interleukin (IL)-6 family, in the development of metastatic melanoma. We analyzed the cell lines of 33 patients with stage III melanoma and demonstrated that for 30% of these cell lines, resistance to the anti-proliferative effects of OSM is due to the epigenetic repression of its receptor expression: OSMR β ; for 18% of the cell lines, OSM resistance is due to a defect in the activation of the PKC/STAT3 signaling pathway; and for 21% of the cell lines, OSM resistance is associated with a defect in the activation of the Akt kinase. We then analysed retrospectively the impact of these cytokine resistances on the survival of 24 patients treated with tumour-infiltrating lymphocytes (TIL). Patient relapse-free survival significantly correlates with OSM and/or IL-6 sensitivity, and not to IFN γ or TNF α . In addition, TIL produce OSM and IL-6 just before their injection to patients. In mice, OSM also reduces tumour growth of human melanoma xenografts, by a direct inhibition of proliferation.

Thus, OSM appears to have a major role in the control of melanoma proliferation. However, resistance to OSM/IL-6 allows metastatic melanoma cells to escape the immune system, notably during a treatment with TIL, and therefore represents a new independent prognosis factor for stage III melanoma patients. For the patients non-responsive to immunotherapy, it would be interesting to reinstate the OSM/IL-6 sensitivity of melanoma cells by the re-establishment of OSMR β or of specific signal transduction pathways.

LACREUSETTE Aline

INSERM U601

Centre de Recherche en Cancérologie de Nantes

Institut de Biologie - 9, quai Moncousu, 44035 Nantes cedex 01.