

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE ET PHARMACIE

**ROLE DE L'ONCOSTATINE M DANS LA BIOLOGIE
DE L'OS ET DES OSTEOSARCOMES**

THESE DE DOCTORAT

**Ecole Doctorale de CHIMIE BIOLOGIE
Biologie – Médecine – Santé
Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie**

*présentée
et soutenue publiquement par*

Céline CHIPOY

le 9 mars 2007, devant le jury ci-dessous

Président du jury

Mr. GOUIN François

Professeur-Praticien Hospitalier, Faculté de Médecine de Nantes

Rapporteurs

Mr. MALAVAL Luc

Chargé de Recherche INSERM, Faculté de Médecine de Saint-Etienne

Mr. GASCAN Hugues

Directeur de Recherche CNRS, Université d'Angers

Examineurs

Mr. BONAVENTURE Jacky

Directeur de Recherche CNRS, Institut Curie, Orsay

Mr. JUIN Philippe

Chargé de Recherche INSERM, Université de Nantes

Directeur de thèse

Mr. BLANCHARD Frédéric

Chargé de Recherche INSERM, Faculté de Médecine de Nantes.

Table des Matières

Liste des abréviations	4
INTRODUCTION	6
I. Le Tissu Osseux	7
A/ L' ostéoblaste	8
B/ L'ostéoclaste	15
C/ Le remodelage osseux	15
D/ L'ostéosarcome : une pathologie osseuse tumorale	19
II. L'Oncostatine M : une cytokine multifonctionnelle	22
A/ Découverte et clonage de l'Oncostatine M	23
B/ Le récepteur à l'OSM	25
C/ Les voies de signalisation activées par l'OSM	28
D/ Les effets biologiques de l'OSM	33
III. Objectifs de la thèse	42
PARTIE I	44
Etude in vitro des effets de l'OSM sur la biologie des ostéosarcomes	44
I/ OSM et Différenciation Ostéoblastique	45
Introduction	45
Article I	47
Complément de discussion à l'article I	49
II/ OSM et Viabilité Cellulaire	55
Introduction	55
Article II	57

Complément de discussion à l'article II	58
III/ p53 et différenciation ostéoblastique	62
IV/ Les inhibiteurs des histones déacétylases	67
Introduction	67
Revue I	69
Complément de discussion à la revue I	70
PARTIE II	73
Etude in vivo des effets de l'OSM sur l'os et les ostéosarcomes	73
I/ Effets de l'OSM seul ou associé avec le PKC412 dans un modèle d'ostéosarcome de rat	74
Introduction	74
Matériel et Méthodes	76
Résultats	79
Conclusion / Discussion	87
II/ L'ostéolyse associée aux tumeurs osseuses : rôle de la triade moléculaire OPG/RANK/RANKL	90
Introduction	90
Revue II	91
CONCLUSION GENERALE	93
BIBLIOGRAPHIE	100

Liste des abréviations

ADN: acide désoxyribonucléique	IRS-1: insulin receptor substrate-1
Apaf-1: Apoptotic-protease-activating-factor 1	JAK: janus kinase
ARN: acide ribonucléique	LIF: leukaemia inhibitory factor
APP: acute phase protein	LIFR β : LIF récepteur β
Bad: Bcl-xL/bcl-2 associated death promoter homolog	MAPK: mitogen activated protein kinase
Bax: Bcl-2 associated X protein	Mcl-1: myeloid cell lymphoma 1
Bcl-2: B-cell lymphoma 2	Mdm2: mouse double minute 2
Bcl-xL: B-cell lymphoma like X long	MMPs: matrix metalloproteinases
BMP: bone morphogenetic protein	OC: ostéocalcine
BSP: bone sialoprotein	OP: ostéopontine
BS/BV: bone surface / bone volume	OPG: ostéoprotégérine
BV/TV: bone volume / total volume	OSM: oncostatine M
Cdk: cyclin dependant kinase	OSMR β : OSM récepteur β
CLC: cardiotrophin-like cytokine	PAL: phosphatase alcaline
CNTF: ciliary neurotrophic factor	PI3K: phosphatidylinositol-3 kinase
Coll I: collagène de type I	PKC δ : protéine kinase C δ
CT-1: cardiotrophine-1	PTH: parathormone
DMP1: dentin matrix protein 1	PUMA: p53-Upregulated Modulator of Apoptosis
ERK1/2: extra-cellular regulated kinase	RANK: receptor activator of nuclear factor κ B
FGF: fibroblast growth factor	RANKL: RANK ligand
GFAP: glial fibrillary acidic protein	Rb: retinoblastoma susceptibility tumor-suppressor
GFP: green fluorescent protein	Shc: SH2 and collagen-homology-domain containing protein
gp130: glycoprotéine 130	SOCS: suppressor of cytokine signaling
Grb2: growth-factor-receptor-bound protein 2	SOS: son of sevenless
HAT: histone acétyl-transférase	STAT: signal transducer and activator of transcription
HDAC: histone déacétylase	Sts: staurosporine
IFN γ : interferon γ	
IL-: interleukine	

TGF β : transforming growth factor β

TIMPs: tissue inhibitors of matrix metallo-proteinases

TNF α : tumor necrosis factor α

TRAP: tartrate resistant acidic protein

TSA: trichostatine A

VEGF: vascular endothelial growth factor

Zol: zolédronate

INTRODUCTION

I. Le Tissu Osseux

Le tissu osseux est un tissu conjonctif spécialisé composé d'une fraction organique et d'une fraction minérale qui lui confèrent ses propriétés de rigidité et d'élasticité. C'est un des tissus les plus résistants de l'organisme, capable de supporter de fortes contraintes mécaniques, donnant au squelette son rôle de soutien du corps et de protection des organes vitaux. Ainsi, la cage thoracique entoure le cœur et les poumons, alors que le système nerveux central est protégé par les os du crâne et le rachis vertébral. Principale réserve d'ions minéraux de l'organisme (en particulier calcium et phosphore), le tissu osseux est un tissu dynamique, constamment remodelé, entraînant la libération ou le stockage de sels minéraux, et assurant ainsi dans une large mesure le contrôle du métabolisme phosphocalcique. De plus, les os renferment dans leurs espaces médullaires le siège de l'hématopoïèse : la moelle osseuse.

La fraction organique du tissu osseux est constituée de cellules spécialisées (ostéoblastes, ostéoclastes, ostéocytes et cellules bordantes) et d'une matrice extracellulaire composée essentiellement de fibres de collagène de type I entourées d'une substance interfibrillaire. Celle-ci contient des glycoprotéines (ostéopontine, sialoprotéine osseuse), des protéines contenant des résidus d'acide glutamique carboxylé (ostéocalcine), des protéoglycanes, des cytokines et des facteurs de croissance.

La phase minérale de la matrice osseuse est, quant à elle, composée de phosphate de calcium cristallisé sous forme de cristaux d'hydroxyapatite. Environ 99% du calcium de l'organisme, 85% du phosphore et entre 40 et 60% du sodium et du magnésium sont incorporés dans les cristaux qui constituent la substance minérale osseuse.

Tout au long de la vie, le squelette subit d'importants remaniements : il est le siège chez l'adulte d'un remodelage permanent qui fait suite au modelage osseux qui se déroule jusqu'à la fin de la croissance. Le remodelage osseux est un processus complexe qui permet de préserver les propriétés biomécaniques du squelette et d'assurer l'homéostasie minérale. Il fait intervenir deux types cellulaires : les ostéoclastes, responsables de la dégradation ou résorption osseuse, et les ostéoblastes qui permettent la production de matrice minéralisée (apposition osseuse).

A/ L' ostéoblaste

1 - Origine et différenciation des ostéoblastes

Les ostéoblastes sont les cellules sécrétrices des constituants de la matrice organique osseuse. D'origine mésodermique, les progéniteurs ostéoblastiques sont des cellules mésenchymateuses (Owen, 1988), essentiellement présentes chez l'adulte dans le périoste et le stroma de la moelle osseuse. Ces cellules souches pluripotentes sont communes aux ostéoblastes, chondrocytes, myocytes et adipocytes. La différenciation vers l'une ou l'autre voie implique l'expression de facteurs de transcription spécifiques. Ainsi, l'expression de Sox-9 induit la voie chondroblastique, celle de Myo-D la voie myoblastique et celle de PPAR γ 2 la voie adipocytaire (Pittenger et al., 1999). Une série complexe d'étapes de prolifération et de différenciation conduisent aux ostéoblastes matures depuis les cellules souches mésenchymateuses (Figure 1).

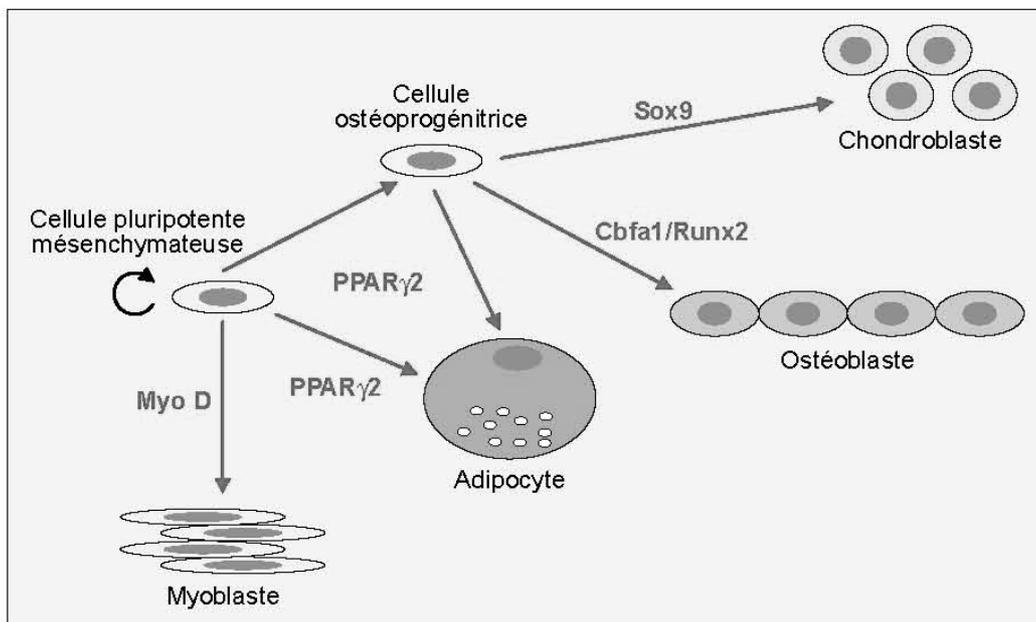


Figure 1 : Les ostéoblastes proviennent de la différenciation de cellules souches mésenchymateuses (D'après Marie P.J, Médecine/Sciences 2001)

L'engagement des cellules précurseurs vers la voie ostéoblastique implique de nombreux facteurs de transcription. Ainsi, l'importance du complexe AP-1 (constitué d'homo ou hétérodimères de facteurs de transcription de la famille Jun/Fos) dans le développement du tissu osseux a été mise en évidence dans des souris présentant une surexpression de c-Fos, caractérisées par la transformation des ostéoblastes et l'apparition d'ostéosarcomes (Grigoriadis et al., 1993; Wagner, 2002). Au contraire, des souris fos -/- présentent un retard de croissance, une ostéopétrose, des défauts dans le remodelage osseux et une hématopoïèse altérée (Wang et al., 1992). L'activité de ce complexe AP-1, très intense dans les ostéoblastes proliférants, diminue fortement lors de la différenciation terminale en ostéoblastes. Ainsi, alors que toutes les protéines Fos et Jun sont très fortement exprimées dans les cellules précurseurs, seules Fra-2 et JunD composent le complexe AP1 dans les ostéoblastes matures (McCabe et al., 1996).

De même, Runx2 (également appelé Cbfa1 ou AML3) est un facteur de transcription essentiel à la différenciation ostéoblastique, puisqu'il permet l'activation de nombreux gènes exprimés par les ostéoblastes matures. Ce facteur se lie à un site consensus présent dans le promoteur de nombreux gènes dont la chaîne $\alpha 1$ du collagène de type I, la sialoprotéine osseuse, l'ostéocalcine et l'ostéopontine. Cbfa1 est nécessaire à l'ostéoformation in vivo et au maintien de la fonction ostéoblastique lors de la croissance. Son rôle essentiel a été démontré chez la souris par son extinction génique qui entraîne l'absence totale d'ostéoblastes, et donc d'ostéoformation (Komori et al., 1997; Otto et al., 1997).

Plus récemment, un facteur de transcription nommé Ostérix (Osx) a été identifié comme étant impliqué dans la différenciation ostéoblastique et donc dans la formation osseuse (Nakashima et al., 2002). Ostérix intervient en aval de Runx 2 et permet la différenciation de préostéoblastes en ostéoblastes matures fonctionnels. Sa surexpression dans des cellules souches embryonnaires murines est suffisante pour orienter leur différenciation vers la lignée ostéoblastique in vitro (Tai et al., 2004).

2 - Les étapes de la différenciation ostéoblastique

On peut alors définir plusieurs stades dans la différenciation ostéoblastique.

Les **préostéoblastes**, cellules précurseurs déjà engagées dans la voie ostéoblastique, sont généralement situés près des surfaces de formation osseuse où les ostéoblastes actifs produisent de l'os. Ces cellules, allongées, ont la capacité de se diviser mais ne synthétisent

pas de matrice. Elles produisent néanmoins des précurseurs des molécules de collagène de type I et expriment quelques marqueurs précoces du tissu osseux, tels que la phosphatase alcaline (PAL), ou l'ostéonectine (Franz-Odendaal et al., 2006).

Les **ostéoblastes matures**, qui ne se divisent plus, sont des cellules cuboïdales alignées le long de la matrice osseuse. Elles présentent un large noyau excentré avec un à trois nucléoles. Leur cytoplasme, basophile, est riche en réticulum endoplasmique granulaire, en mitochondries et présente un appareil de Golgi très développé, démontrant une activité de synthèse très importante (Chavassieux, 2003). La fonction principale des ostéoblastes actifs est en effet la production de la matrice osseuse organique.

Les ostéoblastes matures synthétisent et expriment alors de nombreux marqueurs (Figure 2):

- la phosphatase alcaline, enzyme localisée dans la membrane plasmique dont l'activité se traduit par l'hydrolyse des pyrophosphates inorganiques, qui sont des inhibiteurs de la calcification. Elle contribue alors au processus de minéralisation de la matrice (Wennberg et al., 2000).
- le collagène de type I, qui représente 90% de la matrice organique de l'os. Cette molécule est constituée d'une triple hélice de trois chaînes polypeptidiques alpha, deux chaînes $\alpha 1$ et une chaîne $\alpha 2$. Ces chaînes sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique de l'ostéoblaste puis sécrétées dans la matrice extracellulaire où elles subissent des modifications avec clivage des propeptides C- et N- terminaux et association des molécules en fibres. La stabilité et l'organisation des fibrilles de collagène assurent la rigidité nécessaire au tissu osseux tout en assurant une certaine élasticité. Un rôle important de la trame collagénique osseuse est de se lier aux protéines non collagéniques et aux facteurs de croissance produits par l'ostéoblaste (Manolagas, 2000).
- la sialoprotéine osseuse et l'ostéopontine, protéines adhésives possédant une séquence peptidique RGD qui, en se fixant à des récepteurs membranaires de type intégrine, permet l'adhésion des cellules à la matrice osseuse.
- l'ostéocalcine, protéine spécifique du tissu osseux. Elle y est exprimée en grande quantité, représentant 15 à 25 % des protéines non collagéniques de l'os. Elle contient des résidus acides carboxyglutamiques (gla) dont la carboxylation est dépendante de la vitamine K. Cette protéine, exprimée tardivement par l'ostéoblaste mature, semble jouer un rôle clé dans la résorption osseuse en stimulant la différenciation ostéoclastique (Liggett et al., 1994).

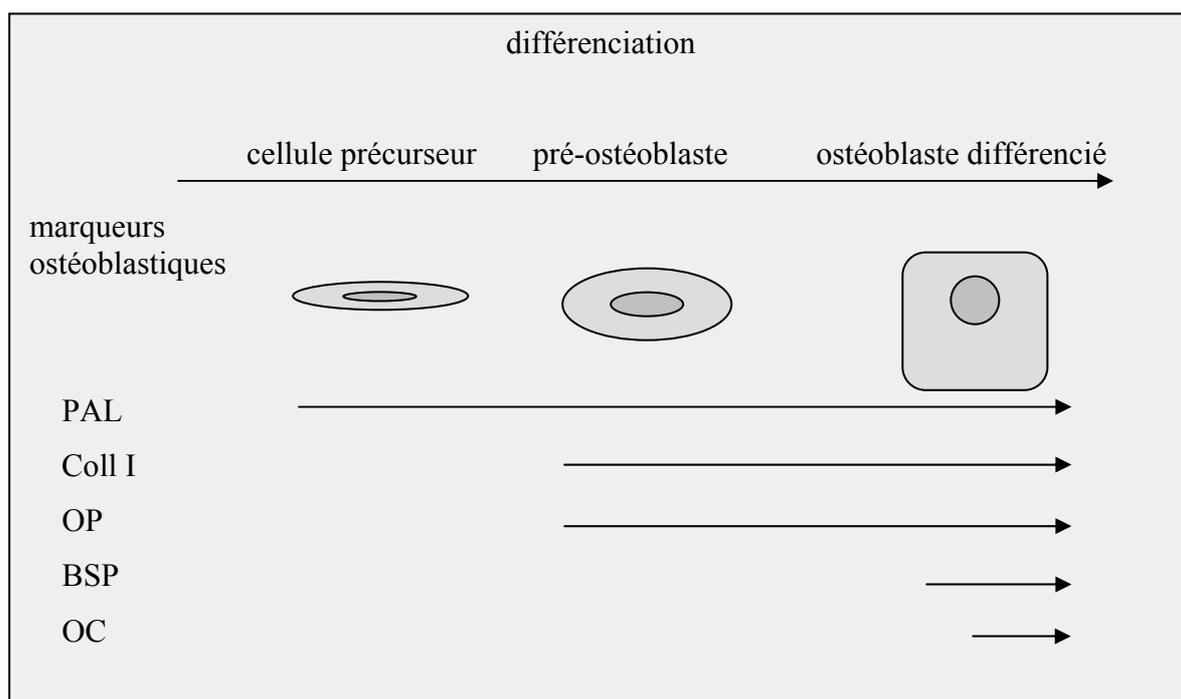


Figure 2 : Les principaux marqueurs exprimés au cours de la différenciation ostéoblastique

(D'après Marie P.J, Médecine/Sciences 2001)

Il existe néanmoins une très grande hétérogénéité dans l'expression de ces marqueurs ostéoblastiques. Candelieri et collaborateurs (Candelieri et al., 2001) ont en effet montré que des ostéoblastes histologiquement identiques mais issus de différentes zones de la calvaria de rat expriment en fait des marqueurs à des taux très variables. Seule la phosphatase alcaline semble exprimée de façon ubiquitaire. En revanche, les niveaux d'expression de la sialoprotéine osseuse ou de l'ostéocalcine sont très différents en fonction de la localisation et de l'environnement osseux.

En dehors des protéines osseuses, les ostéoblastes sécrètent un certain nombre de facteurs de croissance qui jouent un rôle important dans la régulation du métabolisme osseux, tels que le TGF- β (transforming growth factor β), le FGF (fibroblast growth factor) et les BMPs (bone morphogenetic protein). Ils produisent également des molécules régulatrices solubles comme des cytokines (IL-6, IL-11, TNF α), RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor κ B Ligand) ou OPG (Ostéoprotégérine), relarguées dans le milieu extra-cellulaire et agissant sur les cellules précurseurs des ostéoclastes (Suda et al., 1999). Certaines protéases, capables de

réguler le remodelage osseux par leur action sur les protéines de la matrice osseuse, sont également produites par les ostéoblastes. C'est le cas des MMPs (matrix metalloproteinases), dont la MMP13 ou collagénase 3 (Stahle-Backdahl et al., 1997)

La synthèse de la matrice osseuse est suivie de sa minéralisation. Les ostéoblastes, qui régulent la concentration locale en calcium et phosphate, sont impliqués dans l'initiation de la minéralisation ainsi que dans la régulation de la propagation du minéral. Cette phase minérale est composée de phosphate de calcium cristallisé sous forme de cristaux d'hydroxyapatite. Les espaces situés entre les fibres de collagène de type I alignées jouent un rôle important dans la minéralisation de la matrice osseuse puisqu'ils seraient le site de formation des cristaux d'hydroxyapatite associés avec les complexes collagène-protéines non collagéniques (Manolagas, 2000). En effet, certaines protéines telles que l'ostéocalcine et l'ostéonectine ont une forte affinité pour le calcium, sont associées au collagène, et pourraient donc contribuer à la minéralisation (Hauschka, 1986).

A l'issue de la période de formation osseuse, la majorité des ostéoblastes (65%) meurent par apoptose, un processus de mort cellulaire programmée commun à de nombreux tissus. Les cellules restantes peuvent alors se transformer en cellules bordantes ou en ostéocytes (Manolagas, 2000) (Figure 3).

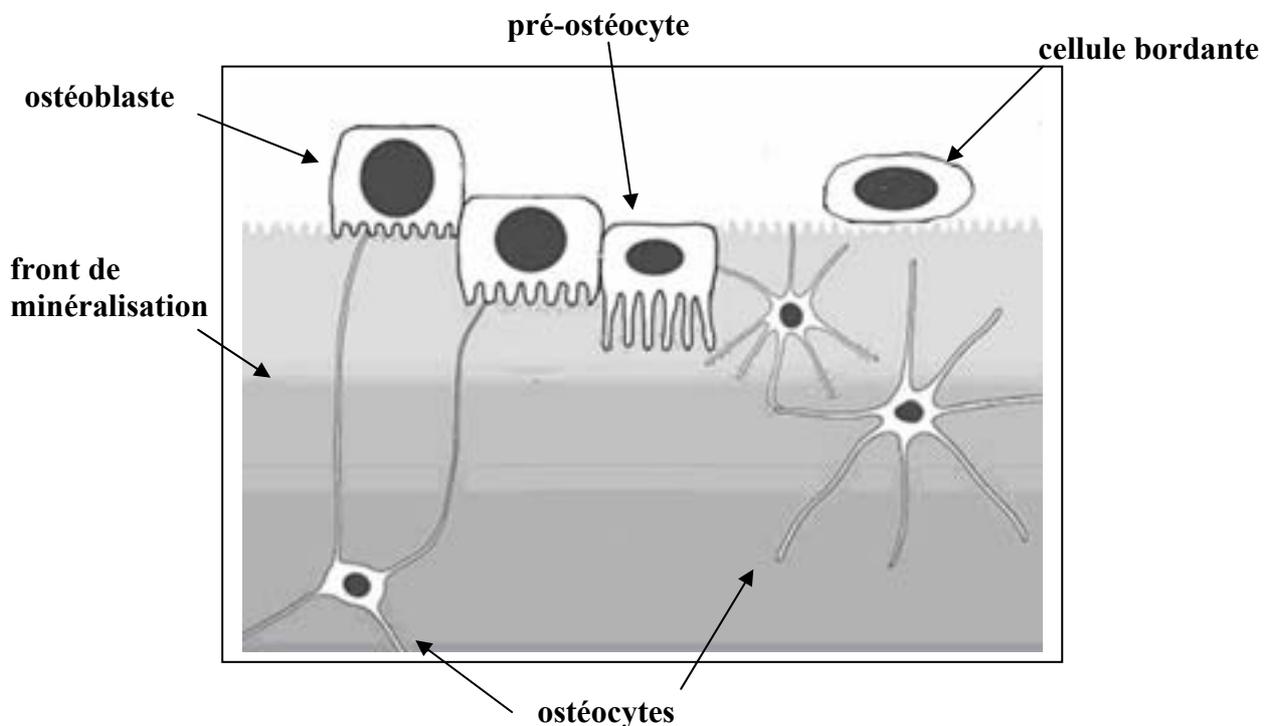


Figure 3 : Ostéoblastes, ostéocytes et cellules bordantes.

(D'après (Franz-Ondendaal et al., 2006))

Les **ostéocytes** proviennent d'ostéoblastes enfouis dans la matrice osseuse minéralisée, à l'intérieur d'une lacune périostéocytaire ou ostéoplaste. Ce sont les cellules les plus abondantes de l'os mature. La transformation de l'ostéoblaste en ostéocyte dure environ trois jours pendant lesquels de nombreux changements histologiques et morphologiques vont s'opérer. Le volume cytoplasmique est réduit de 70% alors que de nombreux et fins prolongements cytoplasmiques sont formés (Palumbo, 1986), leur conférant une forme étoilée (Figure 4). Le cytoplasme des ostéocytes renferme un abondant cytosquelette, composé de microtubules, de filaments intermédiaires et de filaments d'actine. Par contre, il est très peu riche en organites : le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et les mitochondries sont fortement réduits, correspondant à une faible activité de synthèse protéique, alors que s'accumule du glycogène (Knothe Tate et al., 2004). Les marqueurs ostéoblastiques précédemment exprimés vont progressivement disparaître (phosphatase alcaline, collagène de type I, sialoprotéine osseuse, ostéocalcine) lors de la différenciation terminale en ostéocyte (Franz-Odendaal et al., 2006).

Les prolongements cytoplasmiques des ostéocytes leur permettent d'établir des contacts entre eux et avec les cellules bordantes qui recouvrent la surface osseuse. Les ostéocytes, qui forment un vaste réseau, interviennent essentiellement dans la transmission de signaux mécanosensoriels et dans les échanges entre les cellules et le microenvironnement (Aarden et al., 1994), assurant une adaptation fonctionnelle du tissu osseux.

Certains marqueurs, plus ou moins spécifiques des ostéocytes, ont pu être identifiés :

- la sclérostine, protéine produite et sécrétée par les ostéocytes durant la phase de minéralisation de la matrice (van Bezooijen et al., 2004), qui réduit la formation osseuse en inhibant la prolifération et la différenciation des ostéoblastes, et en stimulant leur apoptose (Sutherland et al., 2004)
- l'antigène E11, protéine de surface exprimée lors de la transition ostéoblaste/ostéocyte (Wetterwald et al., 1996). Si certaines études tendent à prouver que ce marqueur est spécifique des ostéocytes (Schulze et al., 1999), d'autres au contraire ont montré une expression commune aux ostéoblastes et ostéocytes (Hadjigryrou et al., 2001)
- le CD44, une glycoprotéine transmembranaire ayant des fonctions d'adhésion entre cellules et matrice, est exprimé très fortement par les ostéocytes mais également par les lignées d'ostéosarcomes (Hughes et al., 1994; Jamal and Aubin, 1996)
- la DMP1 (Dentin Matrix Protein 1), phosphoprotéine détectée dans la matrice et exprimée par les pré-ostéocytes et ostéocytes (Toyosawa et al., 2001)

Le problème posé par les ostéocytes est qu'il est techniquement difficile de les isoler et de les cultiver *in vitro*. Les conditions de culture en monocouche sont trop différentes de leur environnement naturel, conduisant à des modifications phénotypiques. C'est pourquoi ces cellules ont été peu étudiées et restent mal connues.

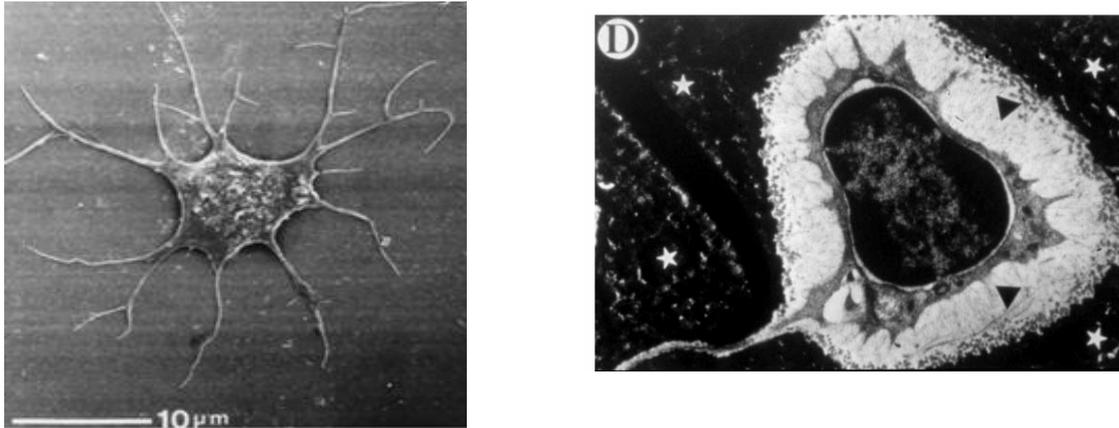


Figure 4 : Ostéocyte

à gauche : microscopie électronique à balayage, d'après (Tanaka-Kamioka et al., 1998).

à droite : microscopie électronique à transmission

Les ostéoblastes peuvent également se différencier en **cellules bordantes**. Ce sont des cellules aplaties présentes le long des surfaces osseuses, avec un cytoplasme et un réticulum endoplasmique réduit, traduisant une faible activité de synthèse. Leur principale fonction est d'assurer la communication entre l'environnement cellulaire et les ostéocytes emmurés dans la matrice osseuse. Elles jouent également un rôle durant la phase initiale du remodelage osseux. En effet, elles sont capables de percevoir un signal d'initiation dont la nature reste inconnue, conduisant à la dégradation de la matrice non minéralisée située sous ces cellules. La matrice minéralisée est alors exposée à l'action des précurseurs ostéoclastiques qui vont venir adhérer à la matrice (Chambers and Fuller, 1985).

B/ L'ostéoclaste

Cette cellule ne sera présentée que brièvement car nos études n'ont pas porté principalement sur sa biologie.

Responsable de la résorption osseuse, l'ostéoclaste est une grosse cellule multinucléée pouvant renfermer de 2 à 30 noyaux. Elle possède un appareil de golgi très développé, de nombreuses mitochondries péri nucléaires, est riche en enzymes lysosomales telles que la phosphatase acide résistante au tartrate (TRAP) ou la cathepsine K et en collagénases nécessaires à son activité de dégradation osseuse. Contrairement aux ostéoblastes qui dérivent de cellules souches mésenchymateuses pluripotentes, les ostéoclastes dérivent de la lignée hématopoïétique monocytaire (Suda et al., 1992). Leurs précurseurs ont la capacité de se différencier en ostéoclastes notamment grâce à un processus de fusion des précurseurs mononucléés. Cette différenciation est sous l'influence de différents facteurs, dont notamment l'hormone parathyroïdienne (PTH), l'interleukine 1 (IL-1), la 1,25,dihydrovitamine D et RANKL (Suda et al., 1999).

L'ostéoclaste est visible au fond des lacunes de résorption appelées lacunes de Howship, au contact de la matrice osseuse calcifiée. La zone de contact est caractérisée par la présence de nombreuses vacuoles intracytoplasmiques et d'une bordure plissée. À ce niveau, l'ostéoclaste est capable d'acidifier le milieu extracellulaire grâce à une pompe à protons, ce qui permet la solubilisation de la fraction minérale. La digestion de la trame organique s'effectue ensuite sous l'action des enzymes protéolytiques contenues dans les lysosomes (Blair et al., 1986).

C/ Le remodelage osseux

Le tissu osseux est un tissu dynamique, siège de remaniements permanents, contribuant à préserver ses propriétés biomécaniques et à assurer l'homéostasie minérale. Le remodelage osseux est un processus complexe qui fait intervenir deux activités opposées mais complémentaires, conduisant au maintien de la masse osseuse : la formation du tissu osseux par les ostéoblastes et sa destruction par les ostéoclastes. C'est ainsi que le tissu osseux peut remplir son rôle métabolique (libération de sels minéraux lors de la résorption) et son rôle de soutien (adaptations architecturales aux changements de conditions mécaniques).

Le signal qui déclenche le remodelage osseux peut être de nature mécanique (altération de l'architecture locale de l'os : fracture, prise de poids...) (Turner and Pavalko, 1998) ou hormonal comme c'est le cas dans l'ostéoporose où une diminution du taux d'œstrogène entraîne une augmentation du nombre et de l'activité des ostéoclastes (Pacifci, 1998). Une séquence de remodelage dure en moyenne de 4 à 6 mois et se déroule selon une chronologie bien précise. Elle présente une succession de quatre phases parfaitement définies : activation, résorption, inversion et formation (Hill, 1998) (Figure 5).

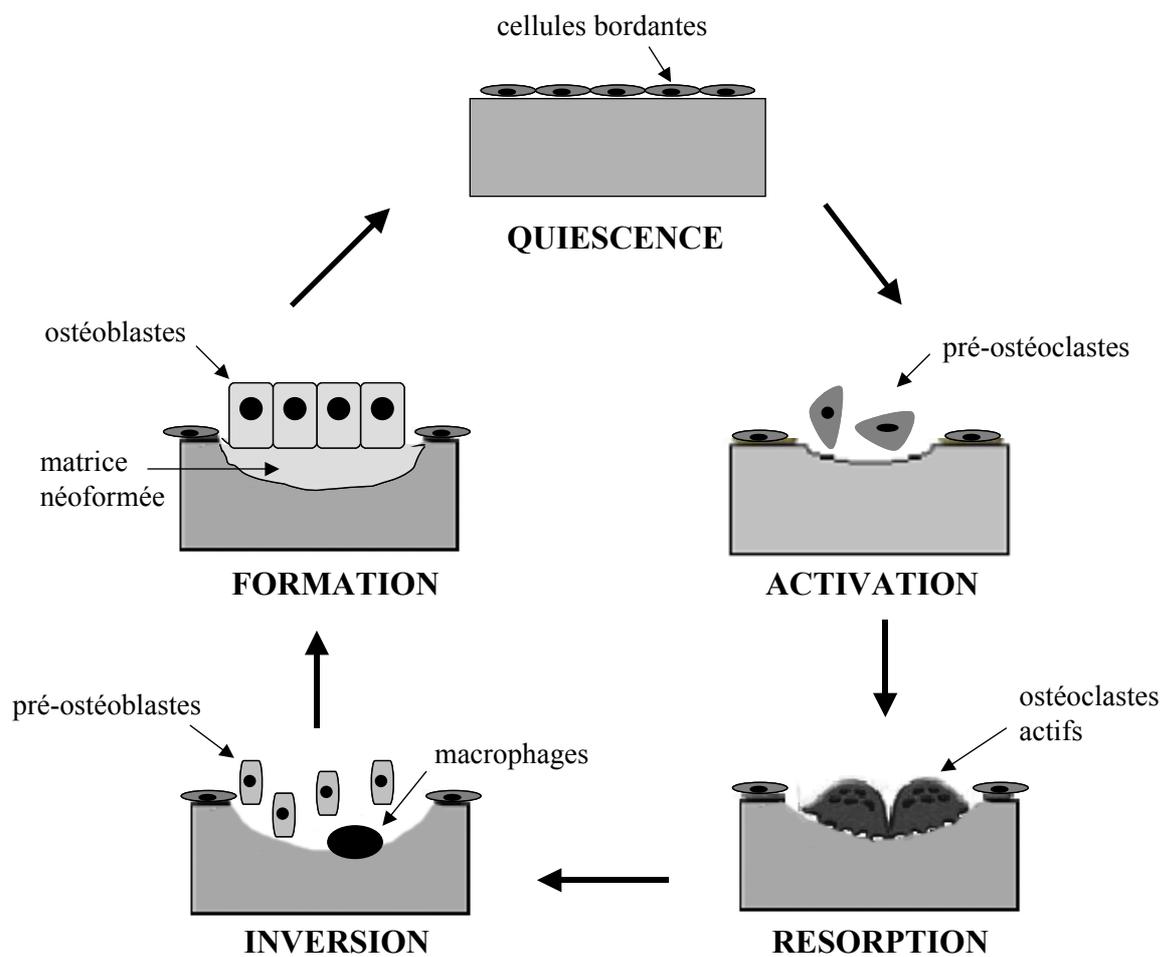


Figure 5 : Les différentes étapes du remodelage osseux.

A l'état quiescent la surface de la matrice extracellulaire de l'os est recouverte par les cellules bordantes, qui empêchent l'accès de la matrice aux ostéoclastes. Ces cellules ont une activité métabolique très réduite, mais peuvent se multiplier ou se différencier à nouveau en ostéoblastes fonctionnels sous l'influence de stimuli mécaniques ou moléculaires. Lors de la phase d'activation, sous l'action des facteurs ostéorésorbants (PTH, vitamine D3 et prostaglandine E2,...), les ostéoblastes se rétractent et laissent la place aux précurseurs mononucléés des ostéoclastes, ou pré-ostéoclastes, qui peuvent adhérer à la matrice.

Les ostéoblastes situés à proximité des pré-ostéoclastes vont favoriser la différenciation de ceux-ci en ostéoclastes matures via la production de différentes cytokines qui vont interagir avec des récepteurs présents à la surface des pré-ostéoclastes. C'est le cas notamment de RANKL (RANK ligand) qui stimule l'ostéoclastogénèse en agissant sur son récepteur RANK (Receptor Activator of Nuclear Factor κ B) situé à la surface des précurseurs ostéoclastiques. Cette activation peut par ailleurs être bloquée par l'OPG (Ostéoprotégérine), molécule soluble sécrétée par l'ostéoblaste et jouant le rôle de récepteur leurre pour RANKL, ayant alors des propriétés anti-résorptives (Wittrant et al., 2004).

Les cellules ostéoclastiques ainsi différenciées vont alors résorber l'os ancien. C'est la phase de résorption. Elle débute par l'adhésion des préostéoclastes à la surface osseuse au niveau de la zone claire avec la constitution d'une zone de scellement conduisant à la polarisation de la cellule et à la formation de la bordure en brosse. Cette adhésion est possible par la présence de membranes spécialisées, comportant des intégrines ($\alpha_2\beta_1$ et $\alpha_v\beta_3$), de la taline et de la vinculine associées à des faisceaux d'actine. Une fois attachés à la matrice osseuse, les ostéoclastes créent un microenvironnement acide, entretenu par des pompes à protons (anhydrase carbonique) spécifiques de l'ostéoclaste qui expulsent les ions H^+ . Cette acidité ainsi obtenue facilite la dissolution de la phase minérale de l'os (les cristaux d'hydroxyapatite) entraînant la libération de calcium et de phosphore, et favorise par différentes cascades d'activation les fonctions des enzymes protéolytiques (métalloprotéases et cathepsines) conduisant à la destruction de la matrice organique. La lacune ainsi créée est appelée lacune de Howship (Hill, 1998).

La dégradation de la matrice entraîne une augmentation du taux de calcium intracellulaire des ostéoclastes qui va provoquer une désorganisation des podosomes et par conséquent le détachement de l'ostéoclaste. La phase d'inversion peut alors commencer. Les ostéoclastes

qui se détachent de la surface osseuse meurent par apoptose vraisemblablement médiée par le système Fas/Fas ligand (Wu et al., 2003). Ces ostéoclastes sont alors remplacés par des cellules mononucléées de type macrophagique qui vont éliminer les derniers résidus de matrice présents dans le fond de la lacune.

L'ultime phase de ce cycle est la phase de formation osseuse. Elle débute par la prolifération des cellules ostéoprogénitrices qui vont venir tapisser le fond de la lacune de Howship, au niveau de la ligne cémentante. Les ostéoblastes vont alors synthétiser les constituants de la matrice protéique osseuse. Puis, après un délai de 10 à 15 jours, le tissu ostéoïde se minéralise par l'apposition de cristaux d'hydroxyapatite dans les espaces interfibrillaires du collagène.

Une fois la phase de formation terminée, alors que certains ostéoblastes meurent par apoptose ou sont emmurés dans la matrice osseuse et deviennent des ostéocytes, d'autres sont convertis en cellules bordantes qui vont recouvrir la surface osseuse et demeurer quiescentes jusqu'à une prochaine activation locale des ostéoclastes : c'est la phase quiescente.

D/ L'ostéosarcome : une pathologie osseuse tumorale

Comme tous les tissus, l'os est le siège de dérégulations conduisant à l'apparition de diverses pathologies. En effet, le maintien de l'architecture osseuse repose sur un équilibre entre deux mécanismes fondamentaux : la résorption et la formation osseuse, toute modification de cet équilibre étant à l'origine du développement de pathologies ostéocondensantes, ostéolytiques, bénignes ou malignes.

Les tumeurs primaires de l'os sont issues de la transformation carcinogène de cellules osseuses. Le point de départ de la tumeur est le tissu osseux lui-même. Cette transformation tumorale peut être soit bénigne soit maligne et aboutit essentiellement à l'apparition de plages ostéolytiques.

L'ostéosarcome, défini par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme une « tumeur maligne caractérisée par l'élaboration d'os ou de substance ostéoïde par les cellules tumorales », représente la tumeur osseuse maligne primitive non hématologique la plus fréquente. Il représente environ 20 % des tumeurs malignes osseuses et près du double des cas de sarcomes d'Ewing et de chondrosarcomes. Cette pathologie reste néanmoins rare puisque le nombre d'ostéosarcomes découverts par année en France est estimé entre 200 et 250. Il existe une grande variété de type d'ostéosarcomes de présentation clinique et radiographique, d'aspect microscopique et de comportement très différents.

L'ostéosarcome survient plus généralement sur une population jeune, avec une médiane d'âge de 18 ans, et touche 1,5 à 2 fois plus fréquemment les garçons que les filles. Il est rare avant 10 ans, exceptionnel avant 5 ans, mais aussi très rare après 60 ans où il survient généralement sur terrain prédisposé (Médico-Chirurgicale, 2001).

L'étiologie de l'ostéosarcome est à ce jour inconnue. Si de nombreuses théories ont été émises à partir de constatations expérimentales (origine virale, traumatique, chimique, etc.), aucune n'a reçu de confirmation chez l'homme. En revanche, il est plus fréquemment rencontré chez des sujets de grande taille, après irradiation, suite au développement de tumeurs préexistantes, dysplasie fibreuse, tumeur à cellules géantes, ou bien de maladie osseuse sous-jacente comme la maladie de Paget pour laquelle l'ostéosarcome apparaît suite à une modification pathologique du remodelage osseux. L'ostéosarcome est très rarement familial, cependant, quelques cas d'ostéosarcomes congénitaux ont été décrits (Lynch et al., 2003). Il survient dans un tableau de tumeurs multiples de différentes variétés histologiques et

correspond à la présence d'un gène de prédisposition aux tumeurs (Hauben et al., 2003). On peut citer: le syndrome de Li-Fraumeni qui correspond à l'anomalie innée de l'un des allèles du gène p53, où l'enfant développe de multiples tumeurs aussi bien sarcomateuses (os et tissus mous) que carcinomateuses ; le rétinoblastome bilatéral, maladie caractérisée par des tumeurs oculaires bilatérales et où les ostéosarcomes s'observent 100 fois plus fréquemment que dans la population normale (Chauveinc et al., 2001). Les anomalies cytogénétiques observées dans la tumeur sont caractérisées par leur extrême fréquence et leur grande complexité. Il n'existe pas de lésion génétique spécifique reconnue, mais une fréquente atteinte des loci des gènes p53 et du rétinoblastome a été observée (Fuchs and Pritchard, 2002; Wadayama et al., 1994). Une étude réalisée sur une cohorte de 29 patients atteints d'ostéosarcome a ainsi montré que 38% d'entre eux présentent une ou plusieurs altérations génétiques touchant des molécules impliquées dans le contrôle de la transition G1-S, et donc dans l'entrée dans le cycle cellulaire (Lopez-Guerrero et al., 2004). Il s'agit principalement de mutations du gène RB, TP53, et/ou de l'amplification des gènes MDM2 (inhibiteur de p53) et CDK4 (Cycline D4, nécessaire à la transition G1-S). De plus, l'analyse des caryotypes a révélé une grande complexité, avec de nombreux réarrangements chromosomiques et des variations dans le nombre de chromosomes, mais n'a conduit à l'identification d'aucune spécificité. La présence d'altérations génétiques touchant des molécules impliquées dans le contrôle de la transition G1-S a également pu être corrélée avec la survie des patients, puisque tous les patients présentant de telles altérations sont décédés durant le suivi, alors que plus de la moitié des autres patients étaient encore en vie à la fin de l'étude. De plus, un lien entre phénotype et génotype a été observé : aucune des mutations recherchées n'a été détectée dans les tumeurs de type ostéoblastique très différencié.

La principale manifestation clinique est la douleur au site tumoral, irradiant vers les articulations voisines. L'ostéosarcome peut toucher tous les os mais manifeste une prédilection pour la métaphyse des os longs. Moins de 10 % surviennent à la diaphyse et les localisations épiphysaires sont encore plus rares. Il se localise surtout au genou : extrémité inférieure du fémur (40 %) et extrémité supérieure du tibia (15 %), puis à l'extrémité supérieure du fémur et de l'humérus (14 %), sites correspondant aux segments osseux dont la croissance est la plus importante de l'organisme. Les os plats et les os courts sont plus rarement touchés. Le crâne et la face sont atteints dans moins de 10 % des cas, préférentiellement à la voûte et la base du crâne, ainsi que la mandibule. Des cas d'ostéosarcomes ont été rapportés pour tous les os du squelette, même pour les sésamoïdes.

Le traitement actuel de l'ostéosarcome repose sur l'association de traitements chirurgicaux et de chimiothérapies. La polychimiothérapie consiste en des cures alternées combinant différents produits dont les principaux sont le méthotrexate à haute dose, l'ifosfamide, la doxorubicine et le cisplatine (Bacci et al., 2003). La réduction tumorale qu'elle induit rend possible la préservation du membre au moyen de techniques de chirurgie conservatrice parfois complexes. L'analyse de la pièce de résection doit confirmer l'exérèse complète de la tumeur et évaluer la réponse à la chimiothérapie par le décompte des cellules tumorales viables, facteur pronostic important qui permet d'ajuster la chimiothérapie adjuvante. La radiothérapie, souvent indiquée après chimiothérapie et chirurgie, a pour but de réduire le risque de récurrence locale et de contribuer au contrôle de la maladie générale.

Cette prise en charge permet aujourd'hui d'obtenir des taux de survie de près de 70 % à 5 ans, tout en préservant la fonction du membre atteint et la qualité de vie. Cependant, l'ostéosarcome conduit à l'apparition de métastases pulmonaires dans les cas les plus avancés de la maladie, et si ces métastases sont détectées au moment du diagnostic, le taux de survie est de seulement 30% à 5 ans. De plus, ces taux de survie n'ont pas été améliorés depuis les trente dernières années, ces traitements étant lourds et souvent mal tolérés chez les jeunes patients.

Si les traitements conventionnels des ostéosarcomes ont largement contribué à l'augmentation du taux de survie des patients dans les années 70, ceux-ci montrent leurs limites et appellent à être renforcés voire suppléés par la mise en place de nouveaux protocoles thérapeutiques.

II. L'Oncostatine M : une cytokine multifonctionnelle

Les cytokines représentent une large famille de molécules polypeptidiques solubles, de faible masse moléculaire et en général glycosylées. Responsables des communications intercellulaires, elles sont impliquées dans des processus aussi variés que l'embryogénèse, la réponse immunitaire, l'inflammation ou l'hématopoïèse. Elles contribuent également à des situations pathologiques comme : auto-immunité, cancer, maladies inflammatoires chroniques (maladie de Crohn, polyarthrite rhumatoïde, psoriasis, etc...), hépatites virales, infection par le VIH... Les cytokines ne sont pas en général des molécules préformées mais sont rapidement synthétisées et excrétées par différents types cellulaires en réponse à une stimulation.

Leur action passe par la fixation à un récepteur membranaire spécifique et se caractérise par :

- une activité pléiotrope qui se traduit par un spectre d'action très large sur de très nombreuses cellules cibles
- une activité redondante illustrée par le fait que plusieurs cytokines peuvent posséder la même activité biologique
- une activité qui s'exerce essentiellement au niveau local selon un mode paracrine ou autocrine. Parfois, néanmoins, elles peuvent agir à distance comme de véritables hormones selon un mode endocrine

Les cytokines peuvent agir de façon synergique (plusieurs cytokines agissent ensemble) ou au contraire antagoniste (elles ont des activités opposées).

On distingue plusieurs grandes familles de cytokines, basées sur leur structure, leur récepteur et/ou leurs activités biologiques. Parmi elles, on trouve les interférons, les Tumor Necrosis Factors (TNF), les Transforming Growth Factors (TGF), les facteurs de croissance hématopoïétiques, les chimiokines et les interleukines (IL).

L'Oncostatine M (OSM) est une cytokine de la famille de l'Interleukine-6 (IL-6) au même titre que l'IL-11, l'IL-27, l'IL-31, le leukemia inhibitory factor (LIF), le ciliary neurotrophic factor (CNTF), la cardiotrophine-1 (CT-1), la cardiotrophin-like cytokine (CLC) et la neuropoïétine (NP) (Chen and Benveniste, 2004; Derouet et al., 2004; Dillon et al., 2004; Murakami et al., 2004). De toutes ces cytokines, le LIF est celle qui est la plus proche de

l'OSM, de par sa séquence, sa structure et sa localisation chromosomique. Toutes ces molécules ont en commun à la fois une structure protéique proche, des activités biologiques redondantes (sur l'inflammation, la réponse immunitaire, l'hématopoïèse, le développement embryonnaire, etc...), mais également l'utilisation d'une molécule réceptrice transmembranaire identique: la gp130 (Taga, 1996), à l'exception de l'IL-31 qui utilise la gp130 like (GPL) (Dillon et al., 2004). Si le partage de cette sous-unité confère aux différentes cytokines des activités redondantes, l'utilisation d'une deuxième sous-unité spécifique associée à la gp130 permet des effets propres à chacune de ces cytokines. Longtemps considérée comme un second LIF, l'OSM est en fait une cytokine unique jouant un rôle important dans de nombreux systèmes biologiques comme la réponse inflammatoire, l'hématopoïèse, la différenciation tissulaire ou la prolifération cellulaire.

A/ Découverte et clonage de l'Oncostatine M

La forme humaine de l'OSM a été isolée en 1986 par l'équipe de Georges J. Todaro, à partir de surnageants de cellules U-937, une lignée monocyttaire issue d'un lymphome histiocytaire humain (Zarling et al., 1986). Ils avaient en effet observé que ces cellules, après traitement avec un ester de phorbol, le phorbol 12-myristate13-acetate (PMA), se différenciaient en cellules de type macrophagique et que leur surnageant avait la capacité de ralentir la croissance des cellules de la lignée de mélanome A375. Ils ont alors isolé et caractérisé le facteur produit par ces macrophages et responsable de cette inhibition de la prolifération tumorale, identifiant une nouvelle glycoprotéine de 28 kDa: l'Oncostatine M (Zarling et al., 1986).

Le clonage et l'analyse de sa séquence réalisés en 1989 par Malik et collaborateurs ont permis de démontrer que l'ADNc de l'OSM humaine code pour un précurseur protéique de 252 acides aminés contenant un peptide-signal hydrophobe de 25 acides aminés à l'extrémité NH₂ terminale (Malik et al., 1989). Après clivage de ce peptide-signal, une forme soluble de pro-OSM de 227 acides aminés est produite. La forme active de l'OSM (196 acides aminés) sera obtenue après un second clivage de 31 acides aminés en C-terminal (Linsley et al., 1990).

De par sa séquence en acides aminés et l'utilisation de la sous unité gp130 pour transduire son signal, l'OSM a été identifiée comme un membre de la famille de l'Interleukine-6 (Gearing and Bruce, 1992).

L'OSM humaine contient 5 résidus cystéine C6, C49, C80, C127 et C167, formant deux ponts dissulfure intramoléculaires : C6-C127 et C49-C167. La structure secondaire de l'OSM est caractérisée par 4 longues hélices α antiparallèles, une structure commune à toutes les cytokines de la famille de l'IL-6 (Hoffman et al., 1996) (Figure 6).

L'OSM est une protéine robuste : stable entre pH2 et pH11, elle résiste à des températures élevées (1 heure à 56°C). Comme beaucoup de cytokines, elle est produite par synthèse de novo suivie de son relargage par la voie classique de sécrétion. Elle est principalement produite par les lymphocytes T activés, les monocytes/macrophages et les polynucléaires neutrophiles dans lesquels elle est présente sous forme de stocks intra-cellulaires préformés (Grenier et al., 1999; Malik et al., 1989).

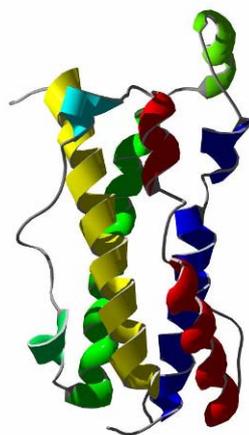


Figure 6 : Structure tridimensionnelle de l'OSM

D'après (Deller et al., 2000).

Le gène codant pour l'OSM humaine, d'une taille de 9kb, contient 3 exons et 2 introns. Il est localisé sur le chromosome 22 en q12, à seulement 12 kb du gène codant pour le LIF, suggérant que ces deux gènes dérivent d'une duplication en tandem relativement récente dans l'évolution (Giovannini et al., 1993; Malik et al., 1989; Rose et al., 1993). Ils partagent

de plus de nombreuses similarités de structure, au niveau de l'organisation introns/exons mais également des séquences promotrices (Rose and Bruce, 1991).

Chez la souris, l'OSM a été identifiée comme étant un gène précoce induit par de nombreuses cytokines telles que l'IL-2, l'IL-3 et l'érythropoïétine (EPO) via la voie Jak/STAT5 dans les cellules myéloïdes et lymphoïdes (Yoshimura et al., 1996). Le gène de l'OSM murine, situé sur le chromosome 11, à proximité du gène du LIF, est exprimé de façon abondante dans les tissus hématopoïétiques comme la moelle osseuse, le thymus et la rate. Relativement peu conservées, les formes humaine et murine de l'OSM ne montrent que 48% d'identité.

B/ Le récepteur à l'OSM

La conséquence principale d'une stimulation cytokinique est la régulation (induction ou répression) de l'expression de gènes. Les deux étapes majeures conduisant à ces effets sont tout d'abord la fixation de la cytokine à son récepteur à la surface de la cellule cible, puis l'activation d'une cascade de signalisation allant de la membrane plasmique au noyau cellulaire. De manière générale, les cytokines de la famille de l'IL-6 initient leur signalisation intra-cellulaire en se fixant à une sous-unité spécifique, et forment ensuite un complexe actif en s'associant avec la sous-unité réceptrice responsable de la transduction du signal et commune à cette famille de cytokines: la gp130 (Kishimoto et al., 1992) (Figure 7).

Dans le cas de l'OSM, la situation est différente. C'est la seule cytokine capable de se lier directement à la gp130, formant ainsi un complexe de basse affinité incapable de transduire un signal (Gearing and Bruce, 1992). La gp130 va pouvoir constituer un hétérodimère en s'associant avec une deuxième sous-unité réceptrice, formant un récepteur de haute affinité actif. Chez l'homme il existe deux récepteurs de haute affinité pour l'OSM :

- le récepteur de type I : lorsque la gp130 s'associe avec le LIF récepteur β (LIFR β)
- le récepteur de type II : lorsque la gp130 s'associe avec l'OSM récepteur β (OSMR β)

Le récepteur de type I est utilisé également par le CNTF, la CT-1, la CLC, et bien sûr par le LIF (Figure 5). Chez l'homme, l'OSM est donc capable de transduire des signaux à la fois via son récepteur spécifique, mais également via le récepteur au LIF. L'utilisation d'un même récepteur explique en partie que ces deux cytokines aient de nombreux effets similaires, alors

que le récepteur de type II, utilisé de façon exclusive par l'OSM, est responsable des activités spécifiques de cette cytokine.

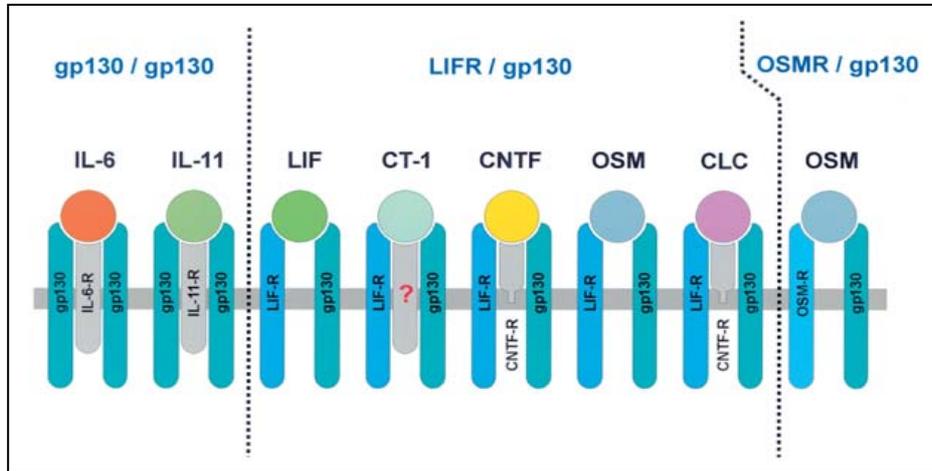


Figure 7 : Récepteurs utilisés par les cytokines de la famille de l'IL-6
(Heinrich et al., 2003).

Cloné en 1996 par Mosley et collaborateurs (Mosley et al., 1996), l'OSMR β présente une structure très proche de celle de la gp130 et du LIFR β , avec 23,3% et 32,2% d'homologie respectivement. La principale différence structurale entre le LIFR β et l'OSMR β est la présence d'un module supplémentaire dans le LIFR β contenant des cystéines conservées et situées en N-terminal (Figure 8).

Alors que la sous-unité gp130 est exprimée de façon ubiquitaire, la chaîne OSMR β a une distribution plus restreinte. On la retrouve dans le tissu nerveux, les fibroblastes, les cellules épithéliales, certaines cellules de la moelle osseuse, et de nombreuses cellules tumorales (Mosley et al., 1996).

Il existe néanmoins des différences entre les espèces. En effet, chez la souris, l'OSM murine ne peut transduire un signal que via son récepteur propre, formé d'un hétérodimère gp130 murine / OSMR β murin. Elle est incapable de se fixer au récepteur au LIF murin (m $gp130/mLIFR$) ni au récepteur humain de type I ou II. En revanche, l'OSM humaine peut activer le mLIFR (m $gp130/mLIFR$) mais pas le mOSMR (m $gp130/mOSMR\beta$) (Lindberg et al., 1998; Richards et al., 1997) (Figure 8).

Les effets observés après stimulation par l'OSM humaine chez la souris -comme l'induction du développement de cellules lymphocytaires T- peuvent donc être attribués à l'activation du récepteur au LIF et non du récepteur à l'OSM (Grant and Begley, 1999). La complexité et la spécificité d'espèce des formes humaine et murine de l'OSM laissent à penser que les activités biologiques de ces deux cytokines ne sont pas équivalentes

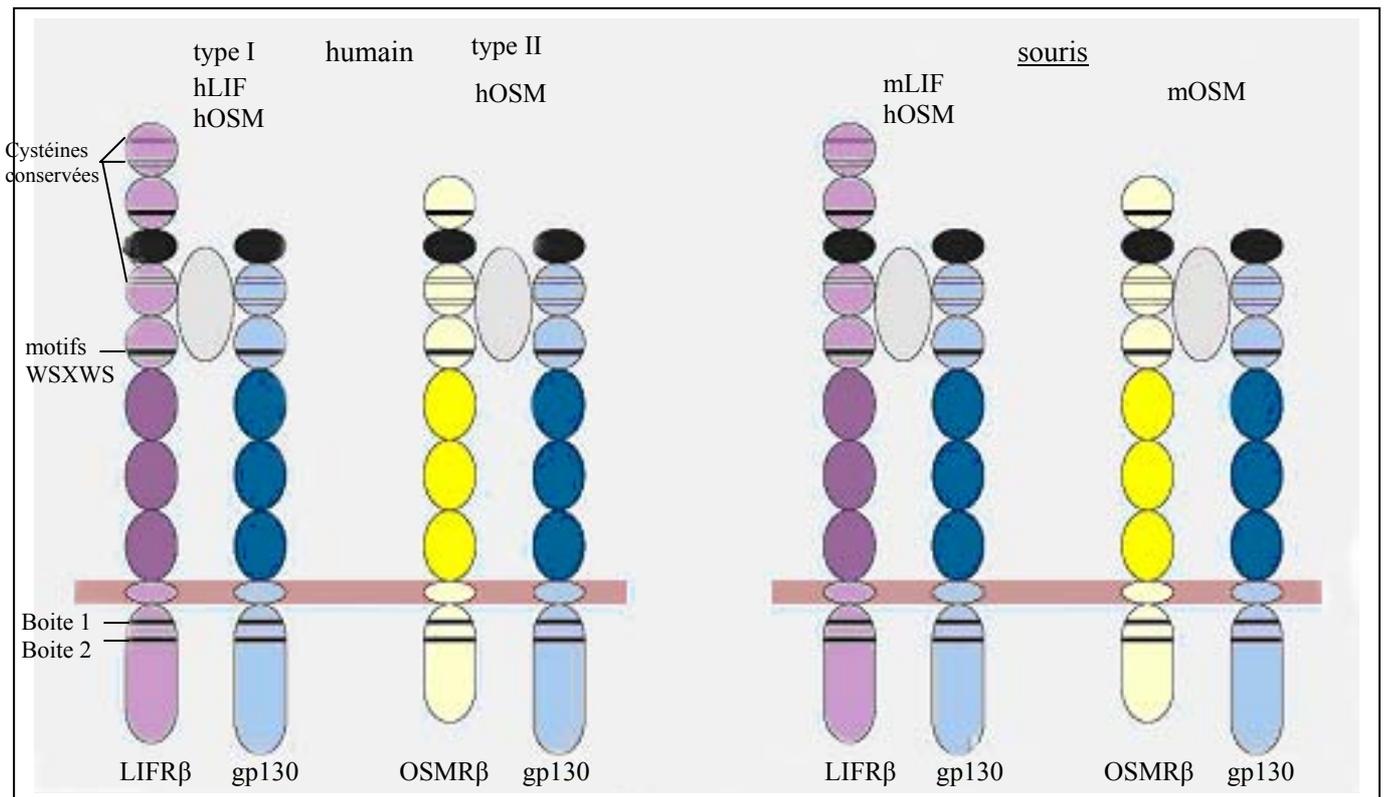


Figure 8 : Représentation des récepteurs à l'OSM et au LIF chez l'homme et la souris.

L'OSM humaine se fixe à deux récepteurs de haute affinité: le récepteur de type I (hgp130+hLIFR β), et le récepteur de type II (hgp130+hOSMR β). L'OSM murine ne peut se fixer qu'à son récepteur spécifique (mgp130+mOSMR β). Par contre, l'OSM humaine, qui ne se fixe pas au récepteur à l'OSM murine, est capable de transduire un signal via le récepteur au LIF murin. (d'après Grant S.L. et Begley C.G., Molecular Medicine Today, 1999)

C/ Les voies de signalisation activées par l'OSM

La fixation de l'OSM sur son récepteur va induire la phosphorylation rapide et transitoire de résidus tyrosine conservés dans le domaine intra-cellulaire à l'extrémité C-terminale des chaînes réceptrices. Mais contrairement à d'autres types de récepteurs, comme les récepteurs aux facteurs de croissance, les récepteurs aux cytokines de la famille de l'IL-6 ne possèdent pas d'activité tyrosine kinase intrinsèque (Darnell, 1997). Pour initier leur signalisation, ces cytokines utilisent des kinases constitutivement associées à leur récepteur : les JAKs (Janus Kinases). Ces kinases sont associées à la partie cytoplasmique des récepteurs, au niveau de régions conservées appelées "boite 1" et "boite 2" (Figure 8). L'importance de ces deux motifs a été démontrée par le fait que la délétion de la boite 1 ou la mutation de seulement deux résidus proline de cette boite 1 empêche totalement l'association JAK-récepteur et la transduction du signal (Murakami et al., 1991). De même, la région comprise entre les boites 1 et 2 est essentielle, puisque la mutation d'un acide aminé (Trp 666) annule la liaison avec les JAKs et conduit à l'inactivation du récepteur (Haan et al., 2000). Dans le cas de l'OSM, les kinases JAK1, JAK2 et dans une moindre mesure Tyk2 ont été identifiées comme étant liées au récepteur (Auguste et al., 1997; Guschin et al., 1995; Narazaki et al., 1994; Stahl et al., 1994).

La liaison de l'OSM à son récepteur entraîne le rapprochement des deux sous-unités le constituant et donc des JAKs associées. Elles sont alors activées par phosphorylation, puis vont à leur tour phosphoryler des résidus tyrosine situés dans le domaine intra-cytoplasmique du récepteur, créant ainsi des sites d'ancrage pour de nombreuses molécules contenant un domaine SH2 (Src homology 2) (Figure 9).

Une des voies majeures activées par l'OSM est la voie des STATs (Signal Transducer and Activator of Transcription). C'est une famille de facteurs de transcription composée de sept membres : STAT 1, 2, 3, 4, 5a, 5b et 6. Avant la stimulation cytokinique, ces molécules se trouvent le plus souvent dans le cytoplasme sous forme de monomères inactifs. L'existence de complexes multimériques préformés de molécules STATs, dont le rôle reste encore à déterminer, a cependant été démontrée (Haan et al., 2000; Ndubuisi et al., 1999). Les STATs, qui possèdent un domaine SH2, vont pouvoir être recrutés au niveau du récepteur activé, puis être à leur tour phosphorylés par les kinases JAKs présentes à proximité. Une fois activés, les monomères se dissocient du récepteur et forment des homo- ou hétérodimères. Ces dimères

vont alors être relocalisés dans le noyau cellulaire de façon active grâce à un signal de localisation nucléaire, se lier à l'ADN et réguler l'expression de gènes cibles (Figure 9).

La phosphorylation des facteurs de transcription STATs est transitoire, et une fois déphosphorylées, ces molécules sont exportées du noyau vers le cytoplasme grâce à un signal d'exportation nucléaire. Ce modèle relativement simple selon lequel les monomères de STATs inactifs sont situés dans le cytoplasme et les dimères activés s'accumulent dans le noyau semble en réalité beaucoup plus complexe. En effet, de récents travaux tendent à démontrer qu'il existe un mouvement permanent des STATs entre cytoplasme et noyau, indépendant de leur état de phosphorylation (Meyer et al., 2002; Zeng et al., 2002). Des molécules STATs déphosphorylées ont en effet été observées dans le noyau, jouant alors un rôle de coactivateurs (Chatterjee-Kishore et al., 2000).

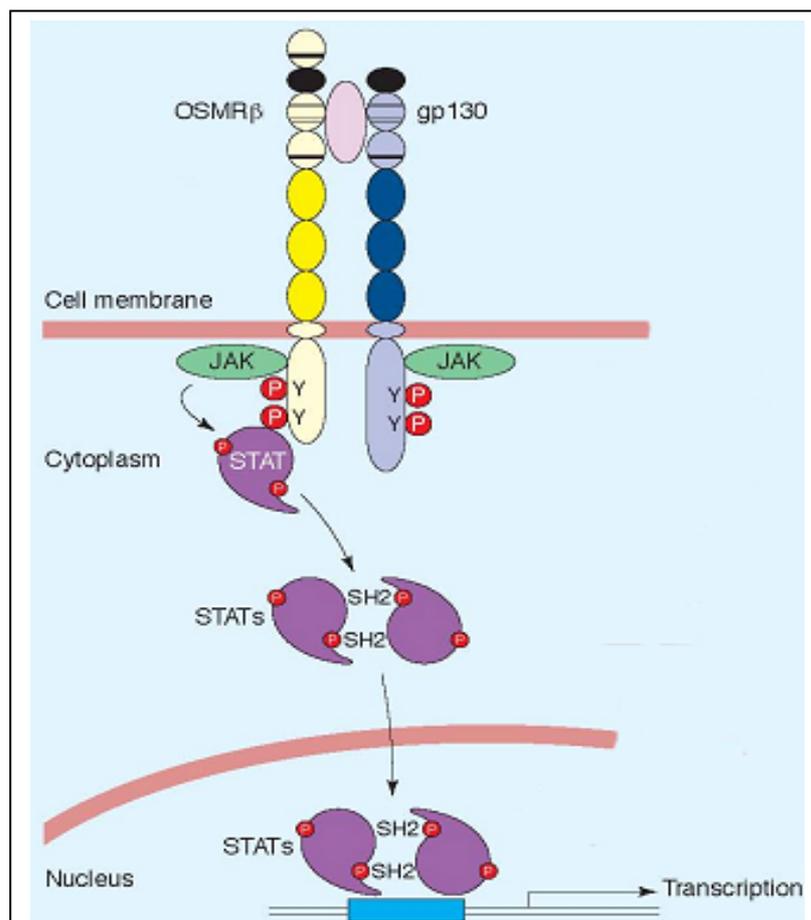


Figure 9 : Activation de la voie JAK-STAT par l'OSM

(d'après Grant S.L. et Begley C.G., Molecular Medicine Today, 1999)

Après stimulation par l'OSM, trois membres de la famille des STATs peuvent être activés :

- STAT1, phosphorylé sur la Tyr⁷⁰¹
- STAT3, phosphorylé sur la Tyr⁷⁰⁵
- STAT5 phosphorylé sur la Tyr⁶⁹⁴

STAT1 et STAT3 sont activés rapidement par les récepteurs de type I et de type II. Par contre, il a été suggéré que STAT5b est activé de façon spécifique par le récepteur de type II et ne peut donc pas être activé par le LIF. Cette spécificité de l'OSM a pu être mise en évidence par Auguste et collaborateurs en 1997 grâce à l'utilisation de cellules exprimant uniquement le récepteur de type I (cellules JAR issues d'une lignée de choriocarcinome) ou le récepteur de type II (cellules A375 issues d'une lignée de mélanome).

D'une manière générale, les facteurs de transcription STATs jouent un rôle dans les processus de différenciation et de prolifération cellulaires. Dans le cas de l'OSM, STAT3 s'est avéré impliqué dans de nombreux effets, comme la réduction de prolifération des cellules épithéliales mammaires (Hutt and DeWille, 2002), la maturation des hépatocytes fœtaux (Ito et al., 2000) ou l'induction de la différenciation ostéoblastique (Bellido et al., 1997).

Les STATs interviennent également dans les processus d'apoptose. Alors que STAT1 est classiquement décrit comme un suppresseur de tumeur capable d'induire l'apoptose (Stephanou et al., 2000), STAT3 et surtout STAT5 semblent plutôt favoriser la prolifération et la survie (Battle and Frank, 2002). Ainsi, l'activation constitutive de STAT3 ou de STAT5 est retrouvée dans de nombreux cancers : myélomes, leucémies, lymphomes, cancers de sein et de la prostate (Garcia et al., 2001; Heath and Cross, 2004; Niu et al., 1999).

Outre la voie des STATs, la fixation de l'OSM sur son récepteur conduit à l'activation d'une autre grande voie de signalisation : la voie des MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinases). La cascade moléculaire utilisée par l'OSM dans cette voie est différente de celle activée par l'IL-6 ou le LIF. Dans le cas de la gp130 et du LIFR β , une protéine contenant un domaine SH2, la SHP2 (SH2-domain-containing tyrosine phosphatase), est recrutée au niveau de la phospho-Tyr⁷⁵⁹ ou de la phospho-Tyr⁹⁷⁴ respectivement (Stahl et al., 1995). Activée, elle va à son tour recruter et activer d'autres molécules, telles que le complexe Grb2/SOS (growth-factor-receptor-bound protein / Son of Sevenless), conduisant à l'activation de Ras. Mais SHP2 n'intervient pas dans l'activation des MAPKs par l'OSMR β . C'est la protéine adaptatrice Shc (SH2 and collagen-homology-domain containing protein) qui est recrutée par

l'OSMR β via la phosphoTyr⁸⁶¹ (Hermanns et al., 2000). Il s'ensuit le recrutement et l'activation en cascade des molécules Grb2, SOS, Ras, Raf et MAPK (Figure 10).

Les cytokines de la famille de l'IL-6 activent non seulement la MAPK ERK 1/2 (Extra-cellular Regulated Kinase), connue pour favoriser la survie et la prolifération cellulaire, mais également des MAPK dites "de stress" : p38 et JNK (c-jun N-terminal kinase) (Bode et al., 2001; Wang et al., 2000).

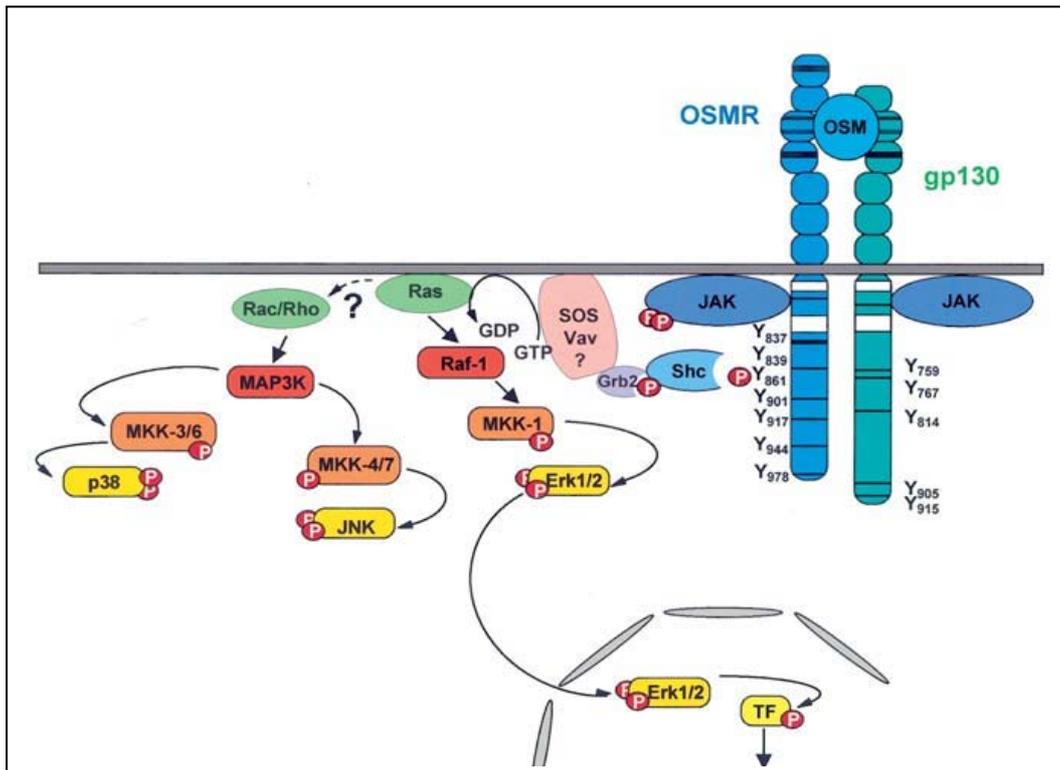


Figure 10 : Activation de la voie des MAPKs par l'OSM (Heinrich et al., 2003).

Une troisième voie activée par les cytokines de la famille de l'IL-6 est celle de la PI3K (phosphoinositide 3 kinase). Le mécanisme moléculaire conduisant à l'activation de cette enzyme par la gp130 demeure mal connu. Il a cependant été montré qu'après stimulation par l'IL-6, la protéine adaptatrice Gab2 interagit avec PI3K (Takahashi-Tezuka et al., 1998), alors qu'en réponse à l'OSM, PI3K s'associe avec IRS-1 (insulin receptor substrate-1) (Burfoot et

al., 1997). Cette enzyme est capable de phosphoryler des lipides membranaires qui vont jouer le rôle de seconds messagers. La sérine thréonine kinase Akt, est alors recrutée au niveau de la membrane plasmique où elle est activée par phosphorylation par une seconde kinase, PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase-1). Les substrats de la kinase Akt sont nombreux, avec notamment mTOR (mammalian target of rapamycin) et la molécule pro-apoptotique Bad (Bcl-2/Bcl-xl-antagonist, causing cell death), qui après phosphorylation par Akt est rendue inactive. La voie PI3K /Akt est alors associée avec la survie cellulaire et la prolifération.

Parmi les molécules activées par les cytokines de type IL-6, on trouve également un membre de la famille des protéines kinases C : la protéine kinase C delta (PKC δ). L'IL-6, tout comme l'OSM, induit la phosphorylation de PKC δ sur la Thr⁵⁰⁵ (Schuringa et al., 2001). Ainsi activée, cette kinase est capable de s'associer avec le facteur de transcription STAT3 et le phosphoryle à son tour sur la Ser⁷²⁷, amplifiant alors son activité transcriptionnelle (Jain et al., 1999). De plus, le recrutement du complexe PKC δ -STAT3 au niveau de la sous-unité gp130 semble réguler à la fois l'activité du récepteur mais aussi de ces deux protéines (Novotny-Diermayr et al., 2002). La cascade moléculaire conduisant à l'activation de PKC δ par l'IL-6 a été étudiée par Schuringa et collaborateurs (Schuringa et al., 2000), identifiant les protéines Rac-1, Sek (SAPK/ERK kinase 1) et MKK4 (MAP kinase kinase 4) en amont de PKC δ . Une autre voie classiquement décrite dans l'activation de la PKC δ implique la phospholipase C gamma (PLC γ), protéine capable de cliver le phosphatidyl inositol di-phosphate (PIP2), générant di-acyl-glycérol (DAG) et inositol tri-phosphate (IP3). Cette cascade moléculaire a notamment été décrite dans le cadre de l'IL-1 β (Amin et al., 2003), pour laquelle elle est nécessaire à l'activation des voies ERK 1/2 et Akt. Impliquée dans de nombreux processus cellulaires, comme la prolifération ou l'apoptose, le rôle précis de la PKC δ reste néanmoins mal connu et semble dépendre du contexte physiologique, se révélant anti- ou pro-apoptotique selon le type cellulaire et le stimulus appliqué (Brodie and Blumberg, 2003).

Après la stimulation cytokinique, l'activation de toutes ces voies de signalisation est transitoire, et de nombreux mécanismes interviennent dans l'arrêt du signal. Parmi eux, on peut citer l'action de phosphatases, telles que SHP-2 (Src homology 2-containing tyrosine phosphatase), capables de déphosphoryler et donc d'inactiver le récepteur lui-même, les molécules JAKs ou les STATs. Il existe également un mécanisme de rétro-contrôle négatif impliquant les protéines SOCS (Suppressors Of Cytokine Signalling) (Starr et al., 1997). L'expression de ces molécules est induite par la cytokine elle-même via la voie JAK-STAT,

comme c'est le cas pour CIS, SOCS1 et SOCS3 après stimulation par l'OSM (Blanchard et al., 2001). Les protéines SOCS empêchent la phosphorylation des STATs et la transduction du signal qui en découle. Pour cela elles vont interagir avec le domaine catalytique des JAKs afin d'inhiber leur activité kinase (Yasukawa et al., 1999). Elles peuvent se lier directement aux JAKs avec une forte affinité, comme c'est le cas pour SOCS1 (Naka et al., 1997), ou interagir avec la sous-unité réceptrice gp130 et former un complexe avec les JAKs, comme dans le cas de SOCS3 (Nicholson et al., 2000).

D/ Les effets biologiques de l'OSM

Les cytokines de la famille de l'Interleukine-6 sont impliquées dans un grand nombre d'activités biologiques aussi variées que l'inflammation, le remodelage de la matrice extracellulaire, l'hématopoïèse ou la régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaire. L'OSM présente donc de nombreux effets biologiques sur une grande variété de cellules à la fois *in vitro* et *in vivo* (résumés dans le Tableau 1).

Effets sur la prolifération et la différenciation cellulaire

Initialement identifiée par sa capacité à inhiber la prolifération tumorale des cellules de la lignée de mélanome A375, l'OSM peut en fait moduler la prolifération soit positivement soit négativement selon le type cellulaire. De nombreuses études ont démontré un effet anti-prolifératif de l'OSM, et notamment sur des lignées de tumeurs solides comme le mélanome (Horn et al., 1990), le cancer du sein (Grant and Begley, 1999), le gliome (Halfter et al., 1998), l'hépatocarcinome (Klausen et al., 2000) ou l'ostéosarcome (Bellido et al., 1997). Mais l'OSM peut également réduire la prolifération de cellules non-tumorales comme c'est le cas pour les cellules épithéliales de la glande mammaire (Grant et al., 2001; Liu et al., 1998), le facteur de transcription STAT3 étant impliqué dans ce phénomène (Hutt and DeWille, 2002). Dans d'autres modèles cellulaires, l'OSM s'est au contraire avérée capable de stimuler la prolifération : sur des cellules tumorales - myélome et sarcome de Kaposi - (Zhang et al., 1994) et des cellules non transformées comme les fibroblastes de la peau (Ihn and Tamaki, 2000) pour lesquels la voie des MAPKs semble indispensable.

Une inhibition de la prolifération est très souvent associée à une induction de la différenciation. C'est en effet ce qui a été observé par Douglas et collaborateurs sur les lignées de cellules MCF-7 et MDA-MB-231 issues de cancer du sein (Douglas et al., 1998).

Après un traitement par l'OSM, la prolifération de ces cellules est fortement réduite, l'analyse du cycle cellulaire montrant une accumulation en phase G0/G1. De nombreux changements morphologiques caractéristiques lui sont associés : plus hétérogènes, avec un noyau et un cytoplasme plus importants, les cellules ont un aspect allongé et de nombreux prolongements cytoplasmiques. S'intéressant au stade de différenciation, ils ont alors montré que le traitement à l'OSM était corrélé à une induction de la différenciation de ces cellules, visualisée par la présence de nombreuses gouttelettes lipidiques caractéristiques des cellules épithéliales mammaires matures.

Effets sur le développement du foie

Des effets similaires ont été observés sur des progéniteurs hépatiques de rat, les cellules ovales, impliquées dans la régénération du foie en réponse à un dommage. Cultivés en présence d'OSM, ces précurseurs ont une croissance très ralentie et adoptent une morphologie d'hépatocytes. De plus, des marqueurs caractéristiques des cellules hépatiques adultes – albumine, tyrosine amino transférase, tryptophane oxygénase- sont exprimés alors que les marqueurs fœtaux disparaissent, démontrant une induction de la différenciation hépatique par l'OSM (Okaya et al., 2005). Le rôle de l'OSM dans le développement du foie avait préalablement été étudié. Lors du développement embryonnaire, l'OSM stimule la maturation fonctionnelle des hépatocytes fœtaux en induisant l'expression de marqueurs hépatiques, l'accumulation de glycogène et la synthèse lipidique (Miyajima et al., 2000). Le facteur de transcription STAT3 s'est avéré essentiel pour le développement hépatique induit par l'OSM, alors que l'activation de Ras semblait réguler négativement ce processus (Ito et al., 2000). Plus récemment, l'utilisation de souris invalidées pour le gène du récepteur à l'OSM (souris $OSMR^{-/-}$) a confirmé l'importance de la voie de signalisation activée par l'OSM dans le phénomène de régénération hépatique. En effet, après exposition au tétrachlorure de carbone CCl_4 , les souris $OSMR^{-/-}$ ont montré une prolifération hépatique et un remodelage tissulaire lent et seulement partiel comparé aux souris sauvages (Nakamura et al., 2004).

Effets sur le tissu osseux

Les cytokines de la famille de l'IL-6 jouent un rôle majeur dans la biologie de l'os. Afin d'étudier plus précisément leur implication, différentes études ont été réalisées sur des souris dont le gène de la gp130 a été modifié génétiquement. Les souris dont le gène codant la gp130 a été invalidé ($gp130^{-/-}$) ne sont pas viables et présentent de nombreuses anomalies du

squelette. L'analyse des ostéoblastes a révélé des défauts dans la fonction de ces cellules, comme une réduction du niveau d'expression de la phosphatase alcaline, et une incapacité à stimuler les ostéoclastes (Shin et al., 2004). En générant des sous-unités gp130 mutantes, pour lesquelles la voie des STATs ou la voie des MAPKs est activée de façon sélective, Sims et collaborateurs (Sims et al., 2004) ont observé que l'activation des STATs par la gp130 est essentielle à la croissance osseuse et à l'activation des ostéoblastes, alors que les MAPKs sont impliquées dans l'inhibition de l'ostéoclastogénèse. Le rôle majeur des STATs dans l'activation des ostéoblastes a par ailleurs été confirmé par des travaux très récents (Itoh et al., 2006) utilisant des molécules gp130 modifiées, incapables d'activer STAT3 ou au contraire l'activant de façon forte et prolongée. Les souris présentant une sur-activation de STAT3 ont montré une augmentation du volume osseux, un remodelage plus intense, et une activité phosphatase alcaline élevée. Au contraire, lorsque STAT3 était inactivé, le volume osseux était réduit et la minéralisation absente. L'ensemble de ces résultats tendent à montrer que la gp130, via STAT3, stimule la différenciation et l'activité ostéoblastique ainsi que le remodelage osseux.

Les effets du LIF et de l'OSM dans la différenciation ostéoblastique ont été étudiés sur différents types de cellules progénitrices. Dans un modèle de moelle osseuse de rat, le LIF a montré un effet biphasique en fonction du stade de différenciation cellulaire : à des stades très précoces, il inhibe la prolifération et stimule la minéralisation, alors qu'à un stade plus tardif, il inhibe la minéralisation et donc la différenciation (Malaval and Aubin, 2001). Par contre, dans un modèle de calvaria de rat, le LIF n'a exercé que des effets inhibiteurs sur la différenciation osseuse (Malaval et al., 1995). Les effets de l'OSM ont été étudiés dans ce même modèle de calvaria, et contrairement au LIF, un effet biphasique a été observé. Jusqu'à 4 jours de culture, l'OSM a stimulé la formation de nodules de minéralisation, mais au-delà de ce temps de culture, elle a montré un effet inhibiteur (Liu, 2000).

Des études réalisées sur les cellules MG63, issues d'un ostéosarcome humain de type fibroblastique, ont montré que ces cellules prolifèrent de façon moins importante après stimulation par l'OSM humaine, avec un blocage du cycle en phase G1. De plus, elles acquièrent un phénotype ostéoblastique plus marqué caractérisé par une induction de la phosphatase alcaline. Cette effet pro-différenciation met en jeu la voie JAK-STAT et la protéine p21^{WAF1}, un inhibiteur des Cdks (Cyclin dependant kinases) induit par l'OSM (Bellido et al., 1997; Bellido et al., 1998).

L'OSM peut agir sur le remodelage osseux via les deux types cellulaires impliqués dans ce phénomène : les ostéoblastes et les ostéoclastes. En réalité, son action sur les

ostéoblastes et les cellules stromales est directe car ces cellules expriment l'OSMR β , alors qu'elle n'est qu'indirecte sur les ostéoclastes due à l'absence de récepteur spécifique, et passe par le relargage de protéines produites par l'ostéoblaste et agissant sur l'ostéoclaste (Bellido et al., 1996; Heymann and Rousselle, 2000). Dans un modèle de calvaria de souris, l'OSM est capable d'augmenter l'expression de RANKL par les ostéoblastes, molécule pro-résorptive stimulant les ostéoclastes. Il en résulte une stimulation de la résorption, avec relargage de calcium, ces effets étant retrouvés avec les autres cytokines de la famille de l'IL-6, comme le LIF ou l'IL-11 (Palmqvist et al., 2002).

Effets sur l'inflammation et le remodelage de la matrice extra-cellulaire

Nous avons vu précédemment que l'OSM était sécrétée par les lymphocytes T activés, les monocytes/macrophages et les polynucléaires neutrophiles (Grenier et al., 1999; Malik et al., 1989), cellules intervenant dans les processus immunitaires et notamment dans la réaction inflammatoire. Cependant, l'OSM semble avoir des effets pro- ou anti-inflammatoires en fonction du modèle d'étude.

Une inflammation aiguë est associée à la libération rapide par le foie de plusieurs protéines plasmatiques appelées protéines de la phase aiguë de l'inflammation (APPs pour acute phase plasma proteins). Il s'agit d'anti-protéases telles que l' α 1 antichymotrypsine, du fibrinogène qui favorise la réparation tissulaire, ou de l'haptoglobine, protéine de transport de l'hémoglobine synthétisée par les hépatocytes. Parmi les facteurs responsables de la production de ces APPs, les cytokines de la famille de l'IL-6 et en particulier l'OSM ont été identifiées sur les hépatocytes de rat et les hépatocarcinomes HepG2 (Richards et al., 1992). Outre cet effet direct, l'OSM régule l'inflammation de manière indirecte via la production d'autres cytokines et de leurs récepteurs. En effet, l'OSM stimule la production d'IL-6 dans les cellules endothéliales (Brown et al., 1991) et de son récepteur dans les cellules HepG2 (Cichy et al., 1997). Etant donné que l'IL-6 joue un rôle proinflammatoire et que des souris déficientes pour l'IL-6 montrent une production réduite des APPs (Kopf et al., 1994), l'OSM pourrait médier une partie de ses effets via l'IL-6. Mais il existe également des effets propres à l'OSM, que n'exercent pas les autres membres de la famille de l'IL-6. Ainsi, Richards et collaborateurs ont montré que l'OSM pouvait inhiber l'expression de l'IL-8 et du granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) induits par l'IL-1 dans des cultures de fibroblastes, régulant alors négativement le processus inflammatoire (Richards et al., 1996). De plus, l'OSM induit l'expression de nombreuses molécules d'adhésion par les cellules endothéliales telles que l'intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) ou la vascular

cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) (Modur et al., 1997), favorisant ainsi le recrutement et l'adhésion des leucocytes au site inflammatoire.

Lors d'une réaction inflammatoire, le remodelage de la matrice extra-cellulaire joue un rôle important pour la cicatrisation des tissus endommagés. Des protéases, les MMPs, sont impliquées dans la destruction de la matrice osseuse, leur activité étant contrebalancée par leurs inhibiteurs naturels, les Tissue Inhibitors of Matrix Metallo-Proteinases (TIMPs). L'expression de ces différentes protéines peut être régulée par l'OSM. Ainsi, l'OSM induit l'expression de TIMP-1 dans des fibroblastes d'origine synoviale (Richards et al., 1993), MMP-1 et MMP-3 dans les astrocytes, MMP-1 et MMP-9 dans les fibroblastes (Korzus et al., 1997). De plus, l'OSM augmente la production de MMP-1, MMP-3, MMP-13 et TIMP-3 dans les chondrocytes humains via la voie JAK-STAT, et participe alors à la destruction du cartilage (Li et al., 2001).

Plusieurs études concernant le rôle de l'OSM dans les maladies inflammatoires chroniques comme la polyarthrite rhumatoïde (PR) ont été réalisées, *in vitro* puis *in vivo*. Produite localement par les macrophages des patients atteints de PR, l'OSM est associée à la fois à une dégradation de la matrice extra-cellulaire, via la stimulation des MMPs, et à une stimulation de la production de médiateurs proinflammatoires. Ainsi, Langdon et collaborateurs ont montré que l'injection intramusculaire d'un adénovirus codant pour l'OSM murine au niveau du genou induisait une inflammation, avec augmentation du nombre de cellules infiltrantes, et une dégradation articulaire chez les souris (Langdon et al., 2000). Plusieurs études sont venues confirmer ces observations, précisant que cet effet proinflammatoire était indépendant de l'IL-6 (de Hooge et al., 2002), que l'IL-1 jouait un rôle important dans cette inflammation articulaire (de Hooge et al., 2003), et qu'une combinaison avec le TNF α augmentait fortement la destruction articulaire via la surexpression des MMPs (Hui et al., 2003). De plus, l'étude de la structure de l'os a montré que l'OSM induisait une dégradation de l'os sous-jacent les articulations et une apposition osseuse au périoste (de Hooge et al., 2002).

Effets sur le développement du système nerveux central

Chez la souris, les ARN messagers codant pour l'OSMR β ont été détectés dans de nombreuses cellules du système nerveux central : les astrocytes du bulbe olfactif, les cellules épithéliales du plexus choroïde ou les cellules méningées de la pie mère (Tamura et al., 2003),

toutes ces cellules étant impliquées dans la défense contre l'inflammation. Le rôle de la gp130 lors du développement du système nerveux a été étudié grâce à des souris déficientes pour cette sous-unité réceptrice. Une réduction du nombre de neurones sensitifs et moteurs, ainsi qu'une plus faible expression d'un marqueur astrocytaire, la GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) ont été observées dans ces souris, suggérant un rôle essentiel de la gp130 dans la survie de certaines sous-populations neuronales et la différenciation astrocytaire *in vivo* (Nakashima et al., 1999).

Plus récemment, Morikawa et collaborateurs ont généré des souris déficientes pour l'OSM (Morikawa et al., 2004). Bien qu'elles se développent normalement et ne montrent pas de différence de taille ou de poids, ils ont constaté une réduction du nombre de neurones nociceptifs présents dans le ganglion spinal de la racine dorsale, neurones exprimant l'OSMR β . La coordination motrice de ces souris n'est pas atteinte, mais des tests comportementaux ont montré une altération dans la réponse à la douleur, que ce soit à des stimuli thermiques, chimiques ou mécaniques. L'OSM semble donc avoir un rôle clé lors des stades postnataux dans la formation et le maintien des circuits nerveux intervenant dans la détection de la douleur.

Effets sur l'hématopoïèse et la lymphopoïèse

Exprimée de façon abondante dans les tissus hématopoïétiques comme la moëlle osseuse, le thymus et la rate (Yoshimura et al., 1996), l'OSM est impliquée dans l'hématopoïèse. Ainsi, exprimée dans la région aortique lors du développement embryonnaire de la souris, l'OSM s'est avérée indispensable à la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques multipotents, stimulant également la formation de cellules endothéliales (Mukoyama et al., 1998). Mais l'OSM intervient également au stade adulte. Afin d'étudier plus précisément ses effets sur l'hématopoïèse, des souris déficientes pour son récepteur ont été générées. Alors que ces souris sont viables et se développent normalement, l'analyse hématologique montre des résultats anormaux. En effet, le nombre d'érythrocytes et de plaquettes est diminué comparé aux souris sauvages. De plus, les progéniteurs des lignées érythroïdes et mégakariocytaires produits par la moëlle osseuse sont également en nombre réduit, indiquant que l'OSM (et/ou l'IL-31 qui utilise également l'OSMR β), en agissant sur le micro-environnement médullaire (vraisemblablement les cellules stromales de la moëlle osseuse), est nécessaire au maintien d'un pool de cellules progénitrices de ces lignées (Tanaka et al., 2003).

L'OSM est également impliquée dans la lymphopoïèse. L'expression ciblée d'OSM bovine par le thymus, obtenue grâce à un promoteur lck, conduit en effet à un phénotype auto-immun léthal et à des modifications dans le développement du tissu lymphoïde, avec une architecture du thymus altérée (Malik et al., 1995). Les thymocytes CD4⁺ CD8⁺ y sont fortement sous-représentés, remplacés par des follicules de lymphocytes B. Une splénomégalie ainsi que des ganglions importants dus à une lymphoprolifération de cellules T ont également été observés, suggérant un dérèglement entre tissus lymphoïdes primaire et secondaire (Malik et al., 1995). Ces résultats ont par ailleurs été confirmés par les travaux de Clegg et collaborateurs (Clegg et al., 1999; Clegg et al., 1996) qui ont utilisé des souris transgéniques surexprimant les formes humaines, bovines ou murines de l'OSM : toutes induisent un développement lymphocytaire T extra-thymique, avec accumulation de cellules matures et immatures dans les ganglions lymphatiques. Ces cellules T extra-thymiques sont différentes des lymphocytes T classiques en terme de cinétique et de fonction : proliférant plus vite, elles acquièrent des caractéristiques de cellules T mémoires mais sont plus sensibles à l'apoptose (Blais et al., 2006). L'OSM semble donc jouer un rôle important dans la lymphopoïèse et la fonction des lymphocytes T.

Effets sur les processus liés au développement tumoral

L'OSM régule la prolifération et la différenciation de nombreux types cellulaires, et inhibe la croissance d'un grand nombre de cellules tumorales. Son rôle dans les processus métastatiques a donc logiquement été étudié dans différents modèles, conduisant à des conclusions diverses. Dans des expériences de cocultures neutrophiles – cellules tumorales, l'OSM produit par les neutrophiles augmente la sécrétion de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), un facteur proangiogénique impliqué dans l'invasion tumorale, par des cellules issues de cancer du sein (MDA-MB-231 et T47D). De plus, l'OSM stimule le détachement de ces cellules et leur capacité invasive (Queen et al., 2005). Une seconde étude sur la lignée T47D a montré des résultats similaires : perte d'adhérence au substrat, changements morphologiques, augmentation de la capacité invasive, mais également sécrétion de protéases lysosomales telles que la cathepsine D et L (Jorcyk et al., 2006), suggérant un rôle positif de l'OSM sur la dissémination métastatique. Sur le plan de l'angiogénèse, il a été montré que l'OSM stimulait la formation de nouveaux vaisseaux via la production de VEGF *in vivo*, dans un modèle de cellules cornéennes de lapin (Vasse et al., 1999). Cependant cet effet semble restreint à ce modèle, puisqu'aucune stimulation n'a pu être observée dans un modèle de cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine ni dans

des cellules endothéliales de l'artère pulmonaire de veau. L'effet positif de l'OSM sur la migration des cellules endothéliales a par ailleurs été corrélé avec une activation de la plasmine, protéase capable d'hydrolyser la fibrine et de dissoudre les caillots sanguins, via une induction de l'activateur du plasminogène (Strand et al., 2000).

En revanche, des études menées sur la lignée 95-D, issue d'un carcinome pulmonaire humain très métastatique, ont révélé un effet totalement opposé. In vitro, l'OSM réduit la formation de colonies, la migration et la capacité invasive de ces cellules, avec une inhibition de la production des protéases MMP2 et MMP9. Testée in vivo sur un modèle murin de mélanome conduisant au développement de métastases pulmonaires, une diminution significative du nombre de foyers métastatiques a pu être observée chez les souris traitées par l'OSM humaine (et non murine) comparé au groupe contrôle (Ouyang et al., 2006), faisant de l'OSM un potentiel agent thérapeutique.

La cachexie, phénomène lié au développement tumoral, est une perte de poids par hypermétabolisme des lipides et des protéines. Cette dérégulation a pu être associée aux cytokines de type IL-6, produites par la rate chez des souris porteuses de tumeurs (Barton and Murphy, 2001). L'expression de l'OSM, détectée un jour seulement après injection des cellules tumorales, semble en partie responsable de la cachexie observée chez ces animaux, puisqu'un anticorps anti-OSM retarde son apparition jusqu'à l'expression plus tardive d'autres cytokines (IL-6, IL-11), suggérant une action indépendante de chacune d'entre elles.

Autres effets biologiques

De nombreux autres effets de l'OSM, plus éloignés de notre thématique, ont été décrits. On peut citer entre autres un rôle dans le phénomène de décidualisation, essentiel à l'implantation de l'embryon dans l'utérus et caractérisé par une infiltration de leucocytes et un remaniement de la matrice extracellulaire endométriale. Tout comme le LIF, l'OSM augmente le nombre de cellules stromales viables de l'endomètre. Par contre, elle joue un rôle inhibiteur dans le processus de décidualisation et le relargage de prolactine par ces cellules, effet non observé avec le LIF (Tanaka and Umesaki, 2003).

EFFET BIOLOGIQUE	/	Voie de Signalisation impliquée
Prolifération		
- inhibe la prolifération :		
mélanome, cancer du sein, gliome, cellules épithéliales mammaires	/	STAT3
- stimule la prolifération :		
myélome, sarcome de Kaposi, fibroblastes de la peau	/	MAPK
Développement tumoral		
- stimule la dissémination métastatique dans un carcinome mammaire, augmente le VEGF		
- inhibe la dissémination métastatique dans un carcinome pulmonaire et un mélanome, réduit les MMPs		
Foie		
- différenciation des progéniteurs et hépatocytes foetaux	/	STAT3
- régénération hépatique après un dommage		
Tissu Osseux		
- effet biphasique sur la différenciation des cellules de calvaria		
- différenciation de la lignée MG63	/	STATs / p21
- résorption osseuse		
Inflammation		
- production d'APPs, d'IL-6		
- stimulation des MMPs dans les chondrocytes, les astrocytes	/	STATs
Système Nerveux Central		
- survie de sous-populations neuronales		
- réponse à la douleur		
Hématopoïèse / Lymphopoïèse		
- prolifération des progéniteurs hématopoïétiques (lignées érythroïdes et mégacaryocytaires)		
- développement lymphocytaire T extra-thymique		
- splénomégalie		

Tableau 1: Principaux effets biologiques de l'OSM

III. Objectifs de la thèse

Les traitements actuels des ostéosarcomes, qui consistent en une résection chirurgicale associée à une polychimiothérapie, ont largement contribué à la progression du taux de survie des patients. Néanmoins, ceux-ci montrent leurs limites, notamment lorsque des métastases sont détectées au moment du diagnostic, et il est nécessaire de développer de nouvelles approches thérapeutiques.

L'OSM est une cytokine multifonctionnelle capable de réduire *in vitro* la prolifération de nombreuses tumeurs solides, parmi elles l'ostéosarcome (Bellido et al., 1997). En effet, des études menées sur la lignée d'ostéosarcome humain MG63 ont montré que ces cellules, mises en présence d'OSM, sont bloquées en phase G1 du cycle et prolifèrent de façon moins importante. Cet effet anti-prolifératif fait de l'OSM un bon candidat pour une utilisation thérapeutique dans le cadre des ostéosarcomes. Néanmoins, ses effets sur les cellules tumorales et sur la biologie de l'os en général restent très peu connus.

Les cytokines de la famille de l'IL-6 jouent un rôle majeur mais complexe dans le développement osseux. Stimulatrice de la différenciation sur la lignée préostéoblastique MG63 (Bellido et al., 1997), quel peut être l'effet de l'OSM sur des cellules d'ostéosarcomes très différenciées et sur des ostéoblastes matures non transformés ? Pour répondre à cette question, nous avons entrepris une étude *in vitro* des effets de l'OSM sur la différenciation de plusieurs modèles cellulaires, dont une lignée d'ostéosarcome de rat, la lignée OSRGA, pour laquelle nous disposons également d'un modèle d'étude *in vivo*. Afin de mieux anticiper les effets induits par cette cytokine *in vivo*, des cultures primaires d'ostéoblastes matures et de cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse ont été incluses dans cette étude.

La seconde partie de ce travail a consisté en l'étude des effets de l'OSM sur la viabilité cellulaire. En effet, bien connaître l'impact obtenu sur la survie des cellules tumorales et des cellules saines est essentiel dans le cadre d'un traitement anti-cancéreux. Or le rôle de l'OSM dans la viabilité cellulaire a été très peu étudié et reste méconnu. Si cette cytokine semble induire l'apoptose dans la lignée tumorale Y-1, elle protègerait au contraire les cellules d'ostéosarcome MG63 de cette mort cellulaire programmée. C'est pourquoi nous avons souhaité étudier la viabilité de différentes lignées d'ostéosarcomes mais aussi d'ostéoblastes non transformés en présence d'OSM, et les mécanismes moléculaires impliqués dans ses effets.

Lors de ces études, l'OSM s'est avéré être un inhibiteur de l'expression de nombreux gènes. Nous nous sommes donc intéressés aux histones déacétylases (HDAC), des inhibiteurs de la transcription, et à leur rôle potentiels dans les effets de l'OSM.

Enfin, dans le but de confirmer les études réalisées in vitro, une étude in vivo a pu être menée. Celle-ci a porté sur le modèle d'ostéosarcome de rat OSRGA, traité par de l'OSM administrée grâce à un adénovirus et combiné ou non à d'autres agents thérapeutiques (anti-cancéreux, anti-résorption). L'objectif de cette étude, au-delà de la démonstration d'un effet anti-tumoral potentiel de l'OSM, était d'analyser l'effet de l'OSM sur le tissu osseux sain ou pathologique, et notamment sur la résorption osseuse via la triade OPG/RANK/RANKL.

PARTIE I

Etude in vitro des effets de l'OSM sur la biologie des ostéosarcomes

I/ OSM et Différenciation Ostéoblastique

Introduction

Identifiée à l'origine par son effet anti-prolifératif sur les cellules de mélanome de la lignée A375 (Zarling et al., 1986), l'OSM s'est avérée rapidement capable d'agir sur un grand nombre de tumeurs solides, comme le mélanome (Horn et al., 1990), le cancer du sein (Grant and Begley, 1999), le gliome (Halfter et al., 1998), l'hépatocarcinome (Klausen et al., 2000) et l'ostéosarcome (Bellido et al., 1997). De telles propriétés en ont fait un candidat intéressant en vue de l'établissement de nouveaux protocoles thérapeutiques pour les pathologies tumorales.

Les principales études concernant les effets de l'OSM sur les ostéosarcomes ont été réalisées sur la lignée MG63. C'est une lignée issue d'un ostéosarcome humain de type fibroblastique, c'est-à-dire peu différencié et exprimant faiblement les marqueurs ostéoblastiques. Bellido et collaborateurs (Bellido et al., 1997; Bellido et al., 1998) ont pu mettre en évidence une inhibition de la prolifération de ces cellules caractérisée par un arrêt du cycle en phase G1. Cet effet est probablement médiée par la protéine p21^{WAF1}, un inhibiteur des Cdks (Cyclin dépendant kinases) induit par l'OSM via le facteur de transcription STAT3. Parmi les autres cytokines de la famille de l'IL-6 testées (IL-6, IL-11 et LIF), seule l'IL-6 associée à son récepteur soluble montrait une telle propriété. Une inhibition de prolifération est généralement corrélée à une induction de la différenciation. C'est en effet ce qui a été observé dans cette étude, puisque l'OSM stimule l'activité phosphatase alcaline (PAL), marqueur ostéoblastique précocement exprimé, et ce de façon dose dépendante. De plus, cet effet prodifférenciation semble directement lié à l'arrêt de la prolifération puisque le blocage de la synthèse de la protéine p21^{WAF1} empêche l'induction de l'activité PAL par l'OSM.

En parallèle de notre étude et afin d'éclaircir le rôle de l'OSM sur la différenciation des cellules de type ostéoblastique, une étude a été menée sur un modèle de culture de calvaria, modèle dans lequel des ostéoprogéniteurs prolifèrent et se différencient en ostéoblastes (Malaval et al., 2005). Administrée entre 1 et 4 jours de culture, l'OSM a stimulé la différenciation ostéoblastique, avec induction de la phosphatase alcaline et de l'ostéocalcine, un marqueur tardif des ostéoblastes, et formation de nodules de minéralisation. Par contre, après 7 jours de culture, l'OSM a montré un effet inhibiteur sur la capacité de ces cellules à minéraliser, suggérant un rôle différent de l'OSM selon le stade de différenciation de la cellule osseuse.

Il existe plusieurs types d'ostéosarcomes, basés sur le stade de différenciation des cellules tumorales le composant. Ainsi, on décrit des ostéosarcomes fibroblastiques lorsque les cellules ont un caractère ostéoblastique peu marqué, ou ostéoblastiques lorsque les cellules sont plus différenciées. De plus, ces tumeurs osseuses primitives se développent dans un environnement osseux composé entre autres de préostéoblastes, d'ostéoblastes matures non transformés, d'ostéocytes et de cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse. Or les effets de l'OSM sur ces différents types cellulaires, tumoraux ou sains, et notamment sur les cellules très différenciées (ostéosarcomes ostéoblastiques, ostéoblastes matures) n'ont jusqu'à présent jamais été étudiés. C'est pourquoi nous avons entrepris une étude des effets de l'OSM sur la prolifération et la différenciation d'ostéosarcomes, d'ostéoblastes matures et de cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse.

Article I

“L’Oncostatine M réduit l’expression des marqueurs ostéoblastiques et induit la GFAP dans les cellules d’ostéosarcome via PKC δ et STAT3.”

JBMR, Novembre 2004.

L’Oncostatine M est une cytokine multifonctionnelle de la famille de l’IL-6 impliquée dans le développement embryonnaire, la différenciation, l’inflammation et la régénération de tissus, comme le foie, l’os, le système nerveux central et le système hématopoïétique. Une des principales propriétés de l’OSM est sa capacité à inhiber la prolifération et à induire la différenciation de nombreuses tumeurs solides, suggérant une éventuelle application thérapeutique de cette cytokine. L’objectif de cette étude a été d’analyser les effets de l’OSM sur la prolifération et la différenciation de cellules d’ostéosarcomes.

Les résultats obtenus montrent que l’OSM inhibe la prolifération des lignées d’ostéosarcomes de rat OSRGA et ROS ainsi que des ostéoblastes matures non transformés. Cette effet anti-prolifératif est corrélé à une induction de la protéine p21^{WAF1}, comme cela avait préalablement été observé dans la lignée MG63. Par contre, l’OSM réduit fortement l’expression des marqueurs ostéoblastiques tels que la phosphatase alcaline, la sialoprotéine osseuse et l’ostéocalcine, conduisant à une inhibition de la capacité de ces cellules à minéraliser la matrice extra-cellulaire. Mais cet effet inhibiteur est limité aux cellules ostéoblastiques différenciées (ostéosarcomes, ostéoblastes matures). En effet, l’OSM stimule l’expression de ces marqueurs et la formation de nodules de minéralisation dans des cultures précoces (et pas tardives) de cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse. De plus, nous avons pu mettre en évidence l’induction d’un marqueur des cellules gliales, la GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) ainsi que d’importants changements morphologiques (élongation des cellules) dans les ostéosarcomes et les cellules souches mésenchymateuses cultivées en présence d’OSM.

L’étude des mécanismes impliqués dans ces effets a révélé que la protéine kinase C delta (PKC δ) était nécessaire à la perte des marqueurs ostéoblastiques induite par l’OSM, alors que le facteur de transcription STAT3 était impliqué dans l’induction de la GFAP.

L’ensemble de ces résultats met en évidence le rôle complexe joué par l’OSM sur les cellules de type ostéoblastique en fonction de leur stade de différenciation, ainsi que la grande plasticité de ces cellules. La GFAP étant exprimée par les cellules gliales mais également par les ostéocytes, dernier stade de différenciation ostéoblastique, ces observations laissent

envisager soit une transdifférenciation de la lignée ostéoblastique vers la lignée gliale, soit une différenciation terminale ostéoblastique.

Complément de discussion à l'article I

Reconnue pour ses propriétés anti-prolifératives sur diverses lignées tumorales, l'OSM semble exercer des effets complexes sur la différenciation des cellules de type ostéoblastique. Dans cette étude, nous démontrons que cette cytokine joue un rôle différent selon le stade de différenciation de la cellule cible. En effet, comme cela avait déjà été montré précédemment (Bellido et al., 1997; Liu et al., 1998), l'OSM stimule l'expression de marqueurs ostéoblastiques tels que la phosphatase alcaline, la sialoprotéine osseuse ou l'ostéocalcine sur des cellules peu différenciées comme des cultures primaires de cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse à des stades précoces (14 jours de culture). Par contre, l'OSM réduit l'expression de ces mêmes marqueurs sur des cellules plus différenciées. C'est le cas pour des cellules d'ostéosarcome de type ostéoblastique (OSRGA, ROS), mais aussi pour des cultures primaires d'ostéoblastes non transformés et de cellules souches de la moelle osseuse à des stades plus tardifs (21 jours de culture)(article I) et sur des cultures tardives de calvaria (Malaval et al., 2004). La capacité de ces cellules à former des nodules de minéralisation en est alors affectée, puisque plus aucun nodule n'est observé dans les cellules OSRGA et ROS cultivées en présence d'OSM murine. Cet effet opposé sur la différenciation ne peut être relié à un effet différent sur la prolifération, car nous avons pu confirmer l'effet antiprolifératif de l'OSM sur les cellules des lignées d'ostéosarcome de rat (OSRGA, ROS), humain (MG63) mais aussi sur les ostéoblastes non transformés. Comme cela avait été décrit pour la lignée MG63 (Bellido et al., 1998), la protéine p21^{WAF1} est induite après 8 h de traitement par l'OSM dans ces cellules de rat.

Antiprolifératif sur tous les types cellulaires étudiés, l'OSM peut en revanche stimuler ou au contraire inhiber l'expression des marqueurs ostéoblastiques selon le stade de différenciation de la cellule.

La GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) est un marqueur des cellules gliales qui peut être induit par les cytokines de type IL-6. Cela a été observé notamment lors du développement du cerveau foetal, où l'OSM active la transcription du gène de la GFAP via le facteur de transcription STAT3 et stimule ainsi la différenciation astrocytaire (Yanagisawa et al., 1999). De même, dans un modèle de mélanome, STAT3 activé par les cytokines de type IL-6 induit la GFAP et la gliogénèse (Kamaraju et al., 2002). Dans notre étude, nous avons démontré l'induction de ce marqueur astrocytaire par l'OSM, au niveau ARN et protéique, à

la fois dans les lignées d'ostéosarcome mais aussi dans les cellules souches de la moelle osseuse. Cette observation semble indiquer que l'OSM induit une transdifférenciation de la lignée ostoblastique vers la lignée gliale. Ce phénomène a déjà été décrit en ce qui concerne les cellules souches mésenchymateuses. Celles-ci peuvent classiquement se différencier en cellules de différentes lignées, comme les lignées adipogéniques, chondrogéniques, myogéniques ou ostéoblastiques, toutes d'origine mésodermique, selon les facteurs de transcription activés. Mais sous certaines conditions de culture, il semblerait que ces cellules souches, d'une grande plasticité, puissent également se diriger vers une lignée d'une origine embryonnaire différente. C'est ce qui a été observé lors de la transplantation de cellules souches de la moelle osseuse dans le cerveau de rats (Mezey et al., 2003), qui ont alors acquis des caractéristiques neuronales.

L'analyse plus poussée des cellules d'ostéosarcome traitées à l'OSM n'a pu aboutir à un phénotype neuronal précis. En effet, aucun autre marqueur glial ou neuronal ne semble induit de façon commune dans les différents types cellulaires étudiés. Si la Nestine, un marqueur des cellules souches neurales, est exprimée dans les cellules de la lignée ROS après traitement à l'OSM, elle ne l'est pas dans les cellules OSRGA ni dans les cellules de la moelle osseuse. De plus, la protéine MAP2 (microtubule associated protein 2), caractéristique des neurones différenciés, est réduite dans les ostéosarcomes qui l'expriment de façon basale. La GFAP semble donc être le seul marqueur glial induit par l'OSM dans les cellules d'ostéosarcome. Il est à noter que l'induction de cette protéine n'a pas été observée dans les ostéoblastes non transformés, sans doute du fait d'une moindre plasticité comparé aux cellules tumorales et aux cellules souches.

Mais l'expression de cette protéine gliale n'est en réalité pas limitée exclusivement aux cellules de cette lignée, et il a été montré que les ostéocytes l'exprimaient également (Kasantikul and Shuangshoti, 1989). Ces cellules constituant le dernier stade de différenciation ostéoblastique, une deuxième hypothèse est alors que l'OSM induirait une différenciation terminale des cellules en ostéocytes. Cette hypothèse est confortée par le fait que les ostéocytes n'expriment que très faiblement les marqueurs ostéoblastiques (phosphatase alcaline, sialoprotéine osseuse, ostéocalcine), et que leur morphologie est très proche de celle des cellules gliales, et de celle observée dans les cellules traitées par l'OSM. Très allongées, elles présentent de nombreux prolongements cytoplasmiques leur conférant une forme étoilée. Des jonctions cellulaires de type gap leur permettent d'établir des contacts entre cellules et favorisent la formation d'un réseau de communication, tandis que l'analyse microscopique du cytosquelette montre une réorganisation des filaments d'actine sans doute

dûe à la GFAP, puisqu'elle est impliquée dans l'assemblage des filaments intermédiaires. Dans ce modèle, l'OSM conduirait donc les cellules à un état de différenciation plus avancé. Les précurseurs ostéoblastiques et les préostéoblastes seraient amenés à l'état d'ostéoblastes matures, exprimant fortement les différents marqueurs, alors que les cellules déjà différenciées de type ostéosarcome parviendraient à l'état d'ostéocyte, avec perte des marqueurs ostéoblastiques et acquisition de la GFAP et d'une morphologie ostéocytaire. Afin de faire la distinction entre ces deux hypothèses (différenciation gliale ou ostéocytaire), des études complémentaires ont été menées. Malgré la mauvaise connaissance des ostéocytes, des marqueurs plus ou moins spécifiques ont pu être identifiés. C'est le cas de la DMP1 (Dentin Matrix Protein 1), exprimée par les pré-ostéocytes et ostéocytes (Toyosawa et al., 2001), de la sclérostine sécrétée par les ostéocytes pendant la phase de minéralisation de la matrice (van Bezooijen et al., 2004), ou d'un récepteur à la sérotonine, le 5HTR2b, exprimé fortement dans ces cellules (Westbroek et al., 2001). L'expression des transcrits de ces différents marqueurs a alors été étudiée par RT-PCR sur les lignées OSRGA, ROS, et sur des cultures de moelle osseuse traitées avec de l'OSM. Malheureusement, aucune modification majeure n'a pu être observée. Si l'expression basale de DMP1 détectée dans les cellules ROS n'est pas modulée par l'OSM, aucune expression n'a pu être décelée dans les cellules OSRGA. Il en va de même pour le récepteur à la sérotonine 5HTR2b, non détecté dans ces cellules, et des résultats identiques ont été obtenus avec l'analyse de la sclérostine. Dans les cultures de cellules souches de la moelle osseuse, les résultats ont été très variables selon les séries, allant de l'induction à la réduction du niveau d'expression de ces différents marqueurs et ne permettant pas de conclure sur leur phénotype. La GFAP restait donc le seul marqueur glial ou ostéocytaire induit par l'OSM dans les cellules d'ostéosarcome, ne nous permettant pas de préciser le phénotype exact de nos cellules. Néanmoins, des travaux récents réalisés au laboratoire ont apporté de nouvelles indications quant au type de cellule obtenu après traitement par l'OSM. Cette étude, utilisant la technique d'infection lentivirale, a permis d'obtenir des cellules d'ostéosarcome produisant de façon stable l'OSM murine. L'analyse des différents marqueurs sur ces cellules a montré une réduction des marqueurs ostéoblastiques (phosphatase alcaline, sialoprotéine osseuse, ostéocalcine), une induction de la GFAP, mais également une induction de la sclérostine et de l'antigène E11, autre protéine exprimée par les ostéocytes. La différence entre les deux approches repose sur le fait que suite à l'infection lentivirale, l'OSM est produite de façon stable dans le temps. La stimulation cytokinique est alors beaucoup plus longue (plusieurs mois) que lors de l'ajout de protéine recombinante, la durée maximale de l'expérience étant alors de 72h, temps semble-t-il trop

court pour une différenciation terminale totale en ostéocyte. Ces résultats viennent donc appuyer l'hypothèse selon laquelle le phénotype obtenu après un traitement des cellules d'ostéosarcome par l'OSM est de type ostéocytaire et non glial.

L'analyse des voies de transduction activées par l'OSM et impliquées dans ses effets a montré que la kinase PKC δ était nécessaire à la réduction des marqueurs ostéoblastiques, alors que le facteur de transcription STAT3 intervenait dans l'induction de la GFAP. Ce dernier résultat est en accord avec les études précédentes décrivant l'induction de la GFAP par les cytokines de type IL-6 dans le mélanome ou dans des précurseurs neuronaux (Kamaraju et al., 2002; Yanagisawa et al., 1999) et impliquant également STAT3. Il semble donc que les deux phénomènes – réduction des marqueurs et induction de la GFAP - soient totalement indépendants, ceci étant confirmé par le fait que l'OSM réduise les marqueurs sur les ostéoblastes non transformés mais n'induit pas la GFAP. Les mécanismes par lesquels PKC δ réduit l'expression des marqueurs ostéoblastiques demeurent néanmoins inconnus, même si l'on peut suggérer que cette kinase puisse phosphoryler et donc moduler l'activité d'autres protéines nécessaires à l'ostéoblaste.

De nombreux facteurs de transcription interviennent lors de la différenciation ostéoblastique. Cbfa1 et Osterix sont essentiels à l'expression de la phosphatase alcaline et de l'ostéocalcine et ainsi à l'engagement des cellules dans cette voie. L'expression de ces deux facteurs a été étudiée au niveau ARN, ainsi qu'au niveau protéique pour Cbfa1, mais aucune modulation par l'OSM n'a pu être observée. Une hypothèse possible serait une régulation de ces protéines par phosphorylation, ou par le biais d'interactions avec d'autres molécules.

Hormis les facteurs favorisant la différenciation ostéoblastique, il existe également des régulateurs négatifs de cette lignée, comme c'est le cas des facteurs de transcription Twist1 et Twist2. Ces deux protéines, présentant une forte homologie, sont capables d'inhiber la fonction de Cbfa1, mais pas son expression, en empêchant sa liaison à l'ADN et donc son activité transcriptionnelle (Bialek et al., 2004). Des cellules d'ostéosarcome humain SaOS2 sur-exprimant Twist se caractérisent par une prolifération plus lente, un taux d'expression de la phosphatase alcaline réduit et une morphologie allongée, alors que les cellules sous-exprimant cette protéine sont plus différenciées (Lee et al., 1999). Ces observations semblent correspondre avec celles faites après un traitement par l'OSM, faisant de Twist un candidat intéressant. Nous avons alors voulu étudier l'expression des transcrits codant pour ce facteur de transcription dans nos cellules d'ostéosarcome, mais aucune régulation n'a pu être mise en évidence. Alors que Twist1 semble stable, Twist2 est légèrement réduit dans les lignées

OSRGA et ROS. Encore une fois, les modulations d'activité de ces facteurs peuvent avoir lieu à divers niveaux : taux d'expression protéique, phosphorylation, localisation, interactions avec d'autres protéines.

De nombreux travaux ont rapporté l'importance des gènes de la famille Msx et Dlx au cours du développement des tissus dentaires et osseux. Ces gènes codent pour des protéines à homéodomaine, c'est-à-dire des facteurs de transcription intervenant lors du développement en régulant l'expression de gènes au niveau spatial et temporel. Parmi eux, Msx1, Msx2 et Dlx5 semblent jouer un rôle majeur dans la différenciation osseuse. En effet, Msx2 et Dlx5 régulent négativement la transcription du gène de l'ostéocalcine (Ryoo et al., 1997; Towler et al., 1994), alors que Msx1 réduit l'expression du facteur de transcription Cbfa1 (Blin-Wakkach et al., 2001), empêchant la différenciation ostéoblastique et maintenant les cellules dans un état prolifératif. De plus, une réduction de l'expression de Msx1 a pu être associée avec une différenciation terminale dans des cellules de cartilage et de muscle (Houzelstein et al., 1999; Mina et al., 1995). La régulation de ces différents facteurs est cependant complexe. Il existe notamment un ARN anti-sens endogène de Msx1 capable de bloquer l'expression de cette protéine, cet anti-sens pouvant lui-même être inhibé par Dlx5 (Blin-Wakkach et al., 2001). Afin d'examiner l'implication de ces facteurs de transcription dans les effets de l'OSM, les transcrits codant pour ces protéines ont été étudiés en RT-PCR sur les cellules OSRGA. Si l'expression de Msx2 n'a pu être détectée, celle de Dlx5 s'est révélée stable après un traitement à l'OSM. Par contre, nous avons pu constater une induction du taux de transcrits correspondant à Msx1 anti-sens dès 48h de traitement, alors que ceux codant pour Msx1 sens restaient stables. Cela tend à montrer que la protéine Msx1 est réduite dans les cellules d'ostéosarcome OSRGA traitées à l'OSM, résultat compatible avec la réduction de prolifération et la différenciation terminale observée.

Des investigations supplémentaires seraient alors nécessaires pour réellement conclure sur l'implication de ces différents facteurs de transcription dans la perte des marqueurs ostéoblastiques induite par l'OSM et sur leur lien avec la kinase PKC δ .

Dans son ensemble, cette étude sur la différenciation ostéoblastique a permis de montrer que l'OSM:

- **stimule l'expression des marqueurs ostéoblastiques sur des cellules peu différenciées**
- **réduit l'expression de ces marqueurs sur des cellules très différenciées via la kinase PKC δ**
- **induit l'expression de la GFAP dans ces différents types cellulaires via le facteur de transcription STAT3**

Le phénotype des cellules ainsi obtenues semble correspondre à un phénotype ostéocytaire plutôt qu'à un phénotype glial, suggérant que l'OSM induirait une différenciation terminale dans les ostéoblastes normaux ou transformés.

II/ OSM et Viabilité Cellulaire

Introduction

Le développement d'un cancer met en jeu de nombreuses altérations moléculaires, et plus particulièrement des mutations de gènes impliqués dans le contrôle de la prolifération et de la survie de la cellule. L'exemple le plus fréquemment décrit est la mutation du gène codant pour la protéine p53, protéine suppresseur de tumeur appelée "gardienne du génome". Dans des cellules saines, p53 est responsable de l'arrêt du cycle cellulaire en réponse à un stress ou à un dommage à l'ADN, permettant la réparation de la lésion avant de réentrer dans le cycle. Dans le cas où le dommage est trop important, p53 peut orienter le devenir de la cellule vers une mort par apoptose, éliminant ainsi les cellules ayant un ADN endommagé. Plus de la moitié des cancers humains (dont les ostéosarcomes) présentent une protéine p53 mutée, ce qui permet à ces cellules d'échapper au processus d'apoptose et de proliférer, contribuant à la formation tumorale. Une voie de recherche consiste donc à réinduire cette mort programmée dans les cellules tumorales.

Deux voies d'induction de l'apoptose sont classiquement décrites: la voie des récepteurs de mort et la voie mitochondriale (Cory and Adams, 2002; Fleischer et al., 2006; Schneider and Tschopp, 2000). La première voie est activée par la fixation sur son récepteur membranaire d'un ligand de la famille du TNF, et se caractérise par l'activation de la caspase-8 puis de la caspase-3 (Walczak and Krammer, 2000). La seconde met en jeu la protéine p53 et les protéines de la famille Bcl-2, qui peuvent être pro-apoptotiques (comme Bax, Bad, Noxa, Puma) ou anti-apoptotiques (comme Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1). Le rôle pro-apoptotique de p53 repose sur le fait qu'elle peut à la fois neutraliser des molécules anti-apoptotiques telles que Bcl-2 et Bcl-xl, mais aussi induire la transcription de Bax, Noxa ou PUMA (Mihara et al., 2003; Thornborrow and Manfredi, 1999). Le ratio entre ces différentes molécules et leurs nombreuses interactions détermineront le devenir de la cellule. En cas de signal apoptotique, les membres pro-apoptotiques déclencheront le relargage de cytochrome c de la mitochondrie vers le cytosol, la formation de l'apoptosome et enfin l'activation de la caspase-3, effectrice de cette mort cellulaire (Adams and Cory, 1998; Green and Evan, 2002; Kelekar and Thompson, 1998). L'apoptose se caractérise alors par la destruction des membranes, la condensation de la chromatine, la fragmentation de l'ADN et la formation de corps apoptotiques.

En dehors des situations pathologiques, l'apoptose demeure un phénomène essentiel. Lors du développement embryonnaire, puis tout au long de la vie, elle permet le contrôle du nombre de cellules et le maintien de l'organisation tissulaire. Dans le tissu osseux, la majorité des ostéoblastes ayant achevé leur fonction de formation osseuse meurt par apoptose, les cellules restantes se transformant alors en cellules bordantes ou en ostéocytes (Jilka et al., 1998). Ce phénomène est modulé par les facteurs de croissance et les cytokines produites par le microenvironnement osseux. Ainsi, dans la lignée de précurseurs ostéoblastiques murine MC3T3-E1, le TGF β , le LIF ou l'IL-6 associée à son récepteur soluble protègent les cellules de la mort induite par la privation de sérum ou par le TNF.

Dans l'article précédent, nous avons montré que l'OSM inhibait la prolifération et induisait une différenciation de type ostéocytaire dans des cellules ostéoblastiques / ostéosarcomateuses. Il existe un lien étroit entre un stade avancé de différenciation et l'apoptose, et ce particulièrement dans les ostéoblastes ; c'est pourquoi nous avons voulu savoir quels pouvaient être les effets de l'OSM sur la viabilité de ces cellules.

Très peu d'études ont porté sur ce sujet, et les conclusions ont été différentes selon le modèle utilisé. Dans la lignée d'ostéosarcome MG63, il a été montré que l'OSM protégeait les cellules de la mort induite par un anticorps anti-Fas (et donc activant la voie extrinsèque de l'apoptose), en empêchant la réduction de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Jilka et al., 1998). Par contre, en activant la caspase-3 via la voie JAK-STAT, l'OSM induit l'apoptose dans les cellules Y-1 issues d'une tumeur des corticosurrénales (Auernhammer et al., 2004). Les résultats de nos travaux concernant la viabilité des cellules d'ostéosarcomes après un traitement à l'OSM sont présentés dans l'article suivant.

Article II

“L’Oncostatine M sensibilise les cellules d’ostéosarcome à l’apoptose via la voie mitochondriale: rôle de STAT5 et p53”, soumis à JBMR.

L’Oncostatine M, une cytokine de la famille de l’Interleukine-6, réduit la prolifération et induit la différenciation de cellules ostéoblastiques en cellules de type glial / ostéocytaire. Le but de cette étude a été de mieux connaître les effets de cette cytokine sur l’apoptose des ostéoblastes normaux et transformés (ostéosarcomes).

Les résultats obtenus montrent que l’OSM sensibilise les cellules tumorales à l’apoptose déclenchée par différents inducteurs de mort, tels que la Staurosporine (Sts), les UV ou le TNF α . Cette apoptose est médiée par la voie mitochondriale, caractérisée par l’activation des caspases 3 et 9. L’analyse des protéines impliquées dans cette cascade apoptotique a révélé la modulation de nombre d’entre elles, et notamment l’activation par phosphorylation de la protéine suppresseur de tumeur p53, l’induction de la protéine pro-apoptotique Bax et la réduction de la protéine anti-apoptotique Bcl-2. Une étude des mécanismes liés à l’augmentation du ratio Bax/Bcl2 a par la suite permis de démontrer que les molécules p53 et STAT5, toutes deux activées par l’OSM, sont responsables de l’induction de Bax et de la réduction de Bcl-2 respectivement. De plus, ces deux facteurs de transcription interagissent de façon constitutive et forment un complexe modulé par le traitement à l’OSM.

Ces travaux indiquent que l’OSM est non seulement capable de réduire la prolifération et d’induire la différenciation de cellules d’ostéosarcome, mais également de les sensibiliser à l’apoptose. Aux vues de ces résultats, l’association de l’OSM et d’un inhibiteur de kinase tel que la Sts pourrait représenter une nouvelle stratégie thérapeutique pour les ostéosarcomes présentant une p53 de type sauvage.

Chipoy C, Brounais B, Trichet V, Battaglia S, Berreur M, Oliver L, Juin P, Rédini F, Heymann D, Blanchard F.

Sensitization of osteosarcoma cells to apoptosis by oncostatin M depends on STAT5 and p53.

Oncogene. 2007 Oct 11;26(46):6653-64. Epub 2007 Apr 30.

PMID: 17471233

Complément de discussion à l'article II

De par ses capacités d'inhibition de la prolifération tumorale et d'induction de la différenciation ostéoblastique, l'OSM est une molécule particulièrement intéressante dans le cadre de l'élaboration de nouveaux protocoles thérapeutiques des ostéosarcomes. Néanmoins son rôle sur la viabilité cellulaire restait jusqu'à présent presque totalement inconnu. Les travaux présentés dans cet article constituent la première mise en évidence d'un effet sensibilisateur de l'OSM à l'apoptose dans des cellules de type ostéoblastique.

En effet, l'OSM seule n'affecte pas la viabilité, mais semble préparer la cellule à divers signaux de mort. Ainsi, une faible dose de Staurosporine (Sts) sans effet sur des cellules non traitées à l'OSM, déclenchera une apoptose massive si ces mêmes cellules ont été préalablement cultivées en présence d'OSM. Cette mort est associée au relargage du cytochrome c dans le cytosol et à l'activation par clivage des caspases-9 et -3, et donc à la voie mitochondriale de l'apoptose. Des résultats similaires ont été obtenus avec d'autres inducteurs de mort, comme les UV, le TNF α associé à l'IFN γ ou la privation de sérum. Le mécanisme commun à ces différents agents semble être la relocalisation de la protéine pro-apoptotique Bax à la mitochondrie, même dans le cas du TNF α qui active la voie des récepteurs de mort (Eskes et al., 2000; Kashkar et al., 2005). En effet, la caspase-8, qui peut cliver directement la caspase-3, va également activer une protéine de la famille Bcl-2, appelée Bid, qui à son tour va venir relocaliser Bax à la membrane mitochondriale. C'est l'élément clé de la cascade apoptotique, puisque cette insertion de Bax alors oligomérisé va permettre le relargage dans le cytosol de cytochrome c, son association avec Apaf-1 et la caspase-9 (formant l'apoptosome), puis l'activation de la caspase-3.

L'analyse de l'expression des protéines impliquées dans cette voie mitochondriale sur les cellules OSRGA a montré d'importantes variations, au niveau ARN et protéine, après un traitement à l'OSM. L'observation la plus importante a été la surexpression des molécules pro-apoptotiques Bax et Bad, et la réduction de la molécule anti-apoptotique Bcl-2. Le ratio Bax / Bcl-2, crucial pour le déclenchement de l'apoptose, semble donc largement augmenté dans ces cellules, qui pourtant ne meurent pas en l'absence d'autre signal. Cela suggère l'existence de signaux de survie forts activés dans le même temps par l'OSM.

Les voies de signalisation activées par l'OSM sont nombreuses, et on peut distinguer deux familles: les facteurs de transcription STATs (STAT1, STAT3 et STAT5) et les kinases

(ERK 1/2, Akt et PKC δ), ces dernières étant classiquement associées à la notion de survie et de prolifération. Ceci a pu être confirmé par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques qui ont conduit à une réduction de viabilité, et principalement les inhibiteurs d'Akt et de PKC δ . On peut donc penser que l'action de la Sts (inhibiteur de kinases non spécifique), après un traitement à l'OSM, peut être reliée à la fois à l'annulation de signaux de survie, et à la relocalisation de la protéine Bax présente à des taux très importants.

L'étude des voies de signalisation a par ailleurs indiqué que seul STAT5 était nécessaire à l'induction de l'apoptose par la combinaison OSM+Sts. Cette observation peut sembler surprenante, étant donné que STAT5 a très majoritairement été décrit comme un facteur anti-apoptotique. Des études réalisées sur des souris déficientes pour STAT5 a et b ont montré que STAT5 jouait un rôle anti-apoptotique sur les progéniteurs des érythrocytes et les cellules de la moelle osseuse en induisant directement la protéine anti-apoptotique Bcl-xL (Battle and Frank, 2002). Il existe en effet deux sites de fixation pour STAT5 dans le promoteur de ce gène. De plus, une activation constitutive de STAT5 a été décrite dans de nombreux cancers: leucémies, lymphomes, cancers du sein (Debierre-Grockiego, 2004). Pourtant, un rôle pro-apoptotique de STAT5 a pu être démontré dans un modèle de myélome exprimant un mutant de STAT5 constitutivement actif, et dans lequel STAT5 était hyperphosphorylé après ajout d'IL-3 (Nosaka et al., 1999). Dans cette étude, les auteurs suggéraient que l'affinité de STAT5 pour les régions promotrices de ses gènes cibles pouvait varier selon son degré de phosphorylation et les interactions éventuelles avec d'autres protéines. L'activation transcriptionnelle de ces gènes est alors modulée en intensité et en durée, conduisant à des effets différents sur la prolifération, la différenciation et l'apoptose. Des travaux très récents rapportent un mécanisme similaire concernant STAT3 (Lu et al., 2006). Dans cette étude, le LIF induit une hyperactivation de STAT3 (en intensité et dans le temps) dans des fibroblastes embryonnaires de souris déficients pour SOCS3 (un inhibiteur de la voie JAK-STAT), conduisant à une apoptose des cellules, avec activation de la caspase-3 et une forte réduction de Bcl-2 et d'Akt. Les auteurs suggèrent que SOCS3 est un régulateur clé capable de convertir STAT3 de molécule anti-apoptotique à pro-apoptotique, en fonction de son degré d'activation. Dans notre étude, l'activation de STAT5 s'est révélée nécessaire à la réduction de Bcl-2 induite par l'OSM. Cet effet n'a jamais été décrit auparavant, et les mécanismes précis de cette réduction, directs ou non, restent à explorer. En revanche, l'induction de Bax semble totalement indépendante de STAT5. On peut noter que Bcl-xL, classiquement activé par STAT5, est retrouvé faiblement induit par l'OSM, que ce soit au niveau du transcrit ou de la protéine, mais n'est pas suffisant pour empêcher l'apoptose.

La seconde protéine essentielle à la sensibilisation à la mort par l'OSM est le facteur de transcription p53. Activée par phosphorylation après un traitement à l'OSM, cette protéine "suppresseur de tumeur" est responsable de l'induction transcriptionnelle de Bax, comme cela avait déjà été décrit auparavant. Plusieurs approches nous ont permis de démontrer cette activité. Tout d'abord, l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique de p53, la pifithrin α , a empêché l'induction protéique de Bax et bloqué partiellement l'apoptose après un traitement OSM+Sts. Ces résultats ayant été obtenus sur les cellules d'ostéosarcome OSRGA, présentant une p53 sauvage, nous avons par la suite testé un grand nombre d'autres lignées cellulaires ayant un statut p53 différent (muté ou nul). Toutes les lignées ayant une protéine p53 non fonctionnelle, qu'elles soient issues d'ostéosarcomes ou non, se sont révélées insensibles à l'effet de l'OSM. Egalement, nous avons pu disposer de cellules issues d'un carcinome colique humain, les cellules HCT116, pour lesquelles il existe une lignée sauvage (p53^{+/+}) et une lignée "knock out" (p53^{-/-}), et démontré que la lignée p53^{+/+} est sensible à l'apoptose, avec induction de Bax et activation de la caspase-3, alors que la lignée p53^{-/-} y est insensible. Ce résultat démontre de plus que cet effet n'est pas restreint aux cellules ostéoblastiques. La démonstration inverse serait alors de réinduire p53 dans les lignées d'ostéosarcome déficientes et ainsi de les sensibiliser à l'apoptose. Cette approche a été envisagée mais nous n'avons malheureusement pas bénéficié des outils techniques nous permettant cette étude. Un phénotype sauvage pour p53 est donc essentiel à l'effet pro-apoptotique de l'OSM, mais pas de façon exclusive. En effet, l'activation de STAT5 est également indispensable, de même qu'un taux de prolifération important. Ainsi les ostéoblastes matures non transformés, d'origine murine ou humaine, sont insensibles à l'apoptose, malgré un statut p53 sauvage et une activation de STAT5 par l'OSM. Ceci confère un avantage certain à cette association OSM+Sts, dans l'optique d'une utilisation thérapeutique, puisque seules les cellules proliférant rapidement, et donc les cellules tumorales, sont affectées.

La coopération STAT5-p53 soupçonnée lors de notre étude s'est réellement concrétisée par la mise en évidence d'une interaction constitutive entre ces deux protéines. Localisé dans le cytosol puis transloqué dans le noyau après une stimulation par l'OSM, ce complexe est alors capable de réguler la transcription de gènes, STAT5 inhibant l'expression de Bcl-2 et p53 activant celle de Bax. Il est fort probable que ces deux facteurs de transcription forment un complexe plus important, comprenant d'autres molécules régulatrices. Un candidat potentiel est la molécule CBP/p300, connue pour interagir avec p53

et la stabiliser (Lambert et al., 1998), mais également capable d'interagir avec le domaine transactivateur de STAT5 (Pfitzner et al., 1998).

Les résultats obtenus au cours de cette étude ont permis de montrer que:

- **l'OSM sensibilise les cellules d'ostéosarcome à la mort induite par divers agents apoptotiques (Sts, UV, TNF α)**
- **cette mort se caractérise par l'activation des caspases -9 et-3 et par une augmentation du ratio Bax / Bcl-2**
- **les facteurs de transcription STAT5 et p53 sont nécessaires à cette apoptose, réduisant Bcl-2 et induisant Bax respectivement**
- **ces deux protéines interagissent constitutivement, formant un complexe moléculaire régulé par l'OSM**
- **cet effet pro-apoptotique n'est pas restreint aux ostéosarcomes de rongeurs, mais est observé également dans des carcinomes humains ou des ostéoblastes proliférants**

III/ p53 et différenciation ostéoblastique

Dans les études précédentes, nous avons montré que l'OSM était capable d'inhiber la prolifération de nombreuses cellules, de modifier leur stade de différenciation et de les sensibiliser à l'apoptose. Néanmoins, ces effets requièrent l'activation de différentes voies de signalisation. Ainsi, l'effet anti-prolifératif met en jeu STAT3 et la protéine p21^{WAF1}, et concerne aussi bien les cellules MG63, OSRGA que les ostéoblastes matures. La modulation des marqueurs ostéoblastiques et l'induction de la GFAP nécessitent l'action de PKC γ et de STAT3, et la sensibilisation à l'apoptose est liée quant à elle au statut p53 et à l'activation de STAT5. L'inhibition de prolifération et l'induction de l'apoptose semblent donc totalement indépendants: en effet, les cellules MG63, ayant une p53 mutée, sont sensibles à l'effet anti-prolifératif mais pas à l'apoptose. Mais existe-il un lien entre l'effet sur la différenciation et la sensibilisation à l'apoptose ?

Plusieurs études concernant le rôle de p53 dans la différenciation ostéoblastique ont été publiées récemment, et toutes concluent à un effet inhibiteur. Dans un cas, Wang et collaborateurs (Wang et al., 2006) ont examiné la structure et le métabolisme osseux de souris délétées pour le gène p53 (p53^{-/-}). Dans l'autre, Lengner et collaborateurs ont analysé les effets d'une hyperactivité de p53 due à la mutation de son inhibiteur Mdm2 sur la formation osseuse (Lengner et al., 2006).

L'étude comparative de souris sauvages et de souris p53^{-/-} a montré que ces dernières présentent une densité minérale osseuse et un volume osseux plus importants, ainsi qu'une augmentation du nombre d'ostéoblastes et du taux de formation osseuse (Wang et al., 2006). Les cellules issues de la calvaria de ces souris mutées expriment un plus fort taux de phosphatase alcaline et surtout d'ostéocalcine, suggérant que p53 ralentit ou inhibe la différenciation ostéoblastique. Au niveau mécanistique, le facteur de transcription Osterix, favorisant la différenciation, s'est avéré réduit par la protéine p53. Malgré une prolifération plus rapide de ces cellules p53^{-/-} due à l'absence de protéine p21^{WAF1}, les auteurs ont pu montrer que ces deux phénomènes (prolifération et différenciation) étaient totalement indépendants. Les ostéoclastes, responsables de la résorption osseuse, sont également plus actifs dans ces souris p53^{-/-}. Cet effet n'est pas du à une action directe de p53 sur ces cellules, mais plutôt à une stimulation plus importante de la part des ostéoblastes p53^{-/-} produisant plus de M-CSF.

La suractivité de p53 consécutive à la mutation de Mdm2 dans des progéniteurs ostéoblastiques a entraîné de graves défauts dans le développement du squelette lors de l'embryogénèse, de taille plus petite et moins minéralisé (Lengner et al., 2006). Ces cellules expriment de façon réduite la phosphatase alcaline, le collagène de type I et le facteur de transcription Cbfa1. Au contraire, des progéniteurs p53^{-/-} sont plus différenciés mais prolifèrent plus rapidement, et sont liés au développement d'un grand nombre de cancers chez ces souris p53^{-/-}, et principalement d'ostéosarcomes.

La majorité des ostéosarcomes présente une p53 mutée, et est composé de cellules de type ostéoblastique plus ou moins différenciées. Afin de se rapprocher des premières étapes de développement d'un ostéosarcome, Tataria et collaborateurs ont étudié le potentiel ostéogénique de plusieurs lignées de cellules souches mésenchymateuses, sauvages ou p53^{-/-} (Tataria et al., 2006). Leurs observations ont été que les cellules mutées ont une plus grande capacité à se diriger vers la lignée ostéoblastique, et que cette différenciation est plus rapide que celle de cellules sauvages. Elles expriment plus fortement les marqueurs ostéoblastiques précoces (phosphatase alcaline, ostéopontine) et le facteur de transcription Cbfa1. Par contre aucune expression de l'ostéocalcine n'est détectée, même après 21 jours de culture, contrairement aux cellules normales qui présentent une très forte expression de ce marqueur tardif. Il semble donc que les cellules souches mésenchymateuses p53^{-/-} aient une ostéogénèse accélérée mais imparfaite, et que par conséquent p53 freine la prolifération et l'engagement vers la voie ostéoblastique, mais par la suite favorise la différenciation terminale des ostéoblastes. Ces résultats sont en accord avec une étude antérieure (Chandar et al., 1993) démontrant que p53 était nécessaire à l'induction de l'ostéocalcine dans les ostéosarcomes, et donc à une différenciation complète de ces cellules.

L'OSM réduit l'expression de marqueurs ostéoblastiques et semble induire une différenciation terminale des cellules d'ostéosarcomes en cellules de type ostéocytaire. De plus, l'OSM active la protéine p53, et avec la collaboration de STAT5, sensibilise ces cellules à l'apoptose. Nous nous sommes alors demandé si l'activation de p53 était liée aux effets de l'OSM sur la différenciation. Des expériences complémentaires ont donc été réalisées afin de répondre à cette question.

Dans une première approche, nous avons utilisé les cellules OSRGA, ayant une p53 fonctionnelle, et dans lesquelles l'OSM réduit les marqueurs ostéoblastiques. Pour examiner l'implication éventuelle de p53 à la fois dans l'expression basale de ces marqueurs et dans la réduction induite par l'OSM, les cellules ont été traitées avec la pifithrin α , un inhibiteur

pharmacologique de l'activité transcriptionnelle de p53, puis un test d'activité phosphatase alcaline a été effectué. Tout d'abord, nous pouvons constater que l'inhibition de p53 entraîne une augmentation du taux basal d'activité phosphatase alcaline, et ce de façon dose-dépendante (figure 1). De plus, la diminution d'activité observée après traitement à l'OSM est moins importante en présence de l'inhibiteur, cette réduction passant de 61% à 32% puis à 22% avec des doses de 10 et 30 μ M d'inhibiteur.

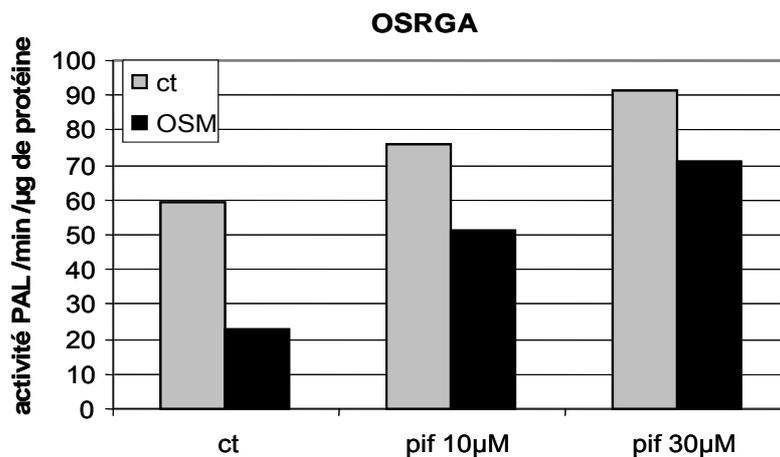


Figure 1 : Test d'activité phosphatase alcaline exprimée en activité /min/ μ g de protéine, réalisé dans des cellules OSRGA.

Ces résultats tendent donc à montrer que non seulement p53 limite l'activité basale de phosphatase alcaline, mais qu'elle est également nécessaire à la réduction de ce marqueur induite par l'OSM.

Une seconde approche a consisté à étudier les cellules présentant une protéine p53 non fonctionnelle, et à réaliser une étude comparative. Concernant la lignée MG63, il a déjà été montré que l'OSM induit l'expression de la phosphatase alcaline. Cette lignée est peu différenciée, et a une protéine p53 délétée. Nous disposons au laboratoire de deux autres ostéosarcomes humains, déjà présentés dans l'étude précédente. Il s'agit des cellules SaOS2, nulles pour p53, et U2OS, ayant une p53 sauvage mais inactivée par un excès de son inhibiteur Mdm2. L'effet de l'OSM sur l'expression des marqueurs ostéoblastiques a été étudié par des expériences de RT-PCR, et est présenté dans la figure 2. La première observation est que ces cellules n'expriment pas la sialoprotéine osseuse et l'ostéocalcine, mais seulement la phosphatase alcaline, et sont donc peu différenciées. La deuxième est que

l'OSM induit l'expression de la phosphatase alcaline dans ces trois lignées, mais n'a pas d'effet sur l'expression des autres marqueurs.

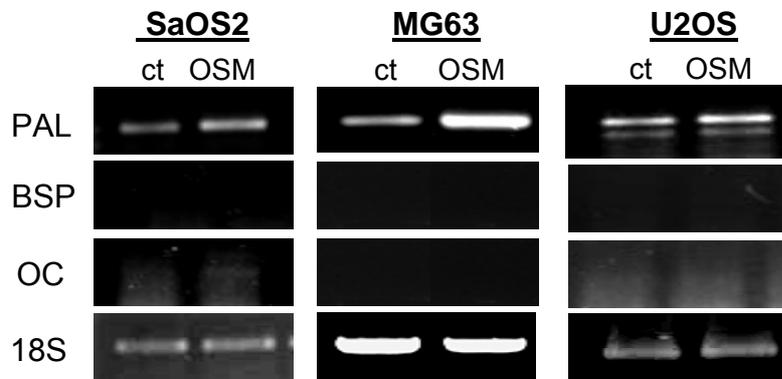


Figure 2: Expression des transcrits codant pour la phosphatase alcaline (PAL), la sialoprotéine osseuse (BSP) et l'ostéocalcine (OC) dans les cellules SaOS2, MG63 et U2OS traitées ou non à l'OSM.

Ces résultats semblent indiquer qu'en l'absence de p53, l'OSM est capable d'induire la phosphatase alcaline. Cet effet est donc bien dissocié de celui obtenu sur des cellules très différenciées, comme les OSRGA, à savoir la réduction des marqueurs (phosphatase alcaline et sialoprotéine osseuse) et la différenciation terminale.

Cette étude, qui reste assez préliminaire, semble toutefois indiquer que p53 pourrait être impliquée dans la différenciation terminale des ostéosarcomes induite par l'OSM. En effet, la réduction de la phosphatase alcaline est moins importante en présence d'un inhibiteur de son activité transcriptionnelle. Nous avons montré dans l'article 1 que cet effet était médié en partie par PKC δ . Le lien éventuel entre ces deux protéines reste donc à élucider. De plus, l'implication de p53 dans la réduction des autres marqueurs et dans l'induction de la GFAP reste à étudier. Cette hypothèse est néanmoins en accord avec les études décrivant p53 comme essentielle à la différenciation terminale des ostéoblastes. De plus, on peut noter la corrélation entre le statut p53 et le stade de différenciation des cellules : les lignées ayant une p53 déficiente sont toutes peu différenciées, exprimant uniquement la phosphatase alcaline. L'OSM est alors capable d'induire son expression, indépendamment de p53. Par contre, ces cellules n'atteignent pas un stade de différenciation très avancé. Il serait intéressant de

pouvoir rétablir une protéine p53 fonctionnelle dans ces lignées (MG63, SaOS2), afin d'étudier l'expression des marqueurs et les effets de l'OSM. Les outils nécessaires à cette étude sont actuellement en cours de réalisation au laboratoire.

IV/ Les inhibiteurs des histones déacétylases

Introduction

Dans les cellules eucaryotes, la chromatine est, dans son état normal, non permissive à la transcription. En effet, l'ADN y est enroulé autour de structures protéiques, formant des nucléosomes. Ces complexes sont composés d'environ 150 paires de bases d'ADN et d'un octamère d'histones (H2a, H2b, H3 et H4)_{x2}. Les interactions entre les histones chargées positivement et l'ADN chargé négativement maintiennent cette structure très fermée et empêchent l'accès aux enzymes et facteurs de transcription. Mais des modulateurs de la transcription peuvent venir se lier à ces complexes, et modifier l'état de la chromatine. Elle peut alors entrer dans un état dit "de silence", totalement fermée à toute interaction, ou au contraire dans un état autorisant le recrutement d'activateurs de la transcription. Une modification post-traductionnelle majeure intervenant dans cette modification de la chromatine est l'acétylation des histones. Des enzymes, les histones acétyl-transférases (HAT), sont en effet capables d'acétyler des lysines situées dans la partie N-terminale des histones, neutralisant ainsi leur charge positive. L'interaction ADN-nucléosome est alors moins importante, rendant l'ADN plus accessible à la transcription. Dans le même temps, il existe d'autres enzymes, les histones déacétylases (HDAC), ayant l'activité inverse. Ces protéines vont enlever les groupements acétyls des histones, restaurant leur charge positive et une structure des nucléosomes condensée. La transcription est alors réprimée. Des protéines autres que les histones peuvent également être déacétylées de manière réversible par les HDACs: c'est le cas de la protéine p53, acétylée dans sa partie C-terminale par un HAT, la molécule CBP/p300 (Chan and La Thangue, 2001). Cette modification stabilise la protéine et augmente son activité transcriptionnelle (Barlev et al., 2001). En modifiant l'état d'accessibilité de l'ADN, ces deux classes d'enzymes participent donc au contrôle de l'expression génique.

Une altération dans les activités des HATs et/ou des HDACs est observée dans de nombreux cancers (Jones and Baylin, 2002; Timmermann et al., 2001; Wang et al., 2001). Une suractivité des HDACs ou un recrutement aberrant par certains facteurs de transcription, va conduire à une répression accrue de l'expression de gènes, dont des gènes suppresseurs de tumeurs, et favoriser le développement de tumeurs (Dhordain et al., 1998; Lin et al., 1998). Il existe également des mutations touchant des HATs. Ainsi, des mutations du gène codant pour

CBP (responsable de l'acétylation de p53) sont associées à l'apparition de leucémies et de carcinomes colorectaux et gastriques (Muraoka et al., 1996).

Le développement de molécules inhibitrices des HDACs est apparu durant la dernière décennie comme une stratégie nouvelle dans le contrôle de pathologies telles que le cancer. Un certain nombre d'entre elles ont montré leur capacité à induire un arrêt de la prolifération, une induction de la différenciation et/ou une induction d'apoptose. Ces agents inhibent également la croissance des cellules tumorales *in vivo*, et sont actuellement à l'étude dans des essais cliniques (Kim et al., 1999; Nakajima et al., 1998; Richon et al., 1998; Saito et al., 1999).

Les modifications épigénétiques de la chromatine sont par ailleurs impliquées dans les grandes fonctions cellulaires telles que le développement embryonnaire, la différenciation cellulaire, l'apoptose (Jaenisch and Bird, 2003). Les inhibiteurs des HDACs représentent donc une classe d'agents thérapeutiques potentiels pour d'autres pathologies que le cancer, et notamment les maladies inflammatoires.

Revue I

“Les inhibiteurs des histones déacétylases: de nouveaux médicaments pour le traitement des maladies inflammatoires? ”, DDT, Février 2005.

Les inhibiteurs des HDACs ont représenté une voie de recherche prometteuse dans le traitement de maladies cancéreuses, de par leur capacité à induire un arrêt du cycle cellulaire, la différenciation voire l'apoptose des cellules tumorales. Certains d'entre eux ont d'ailleurs fait l'objet d'essais cliniques. Mais récemment, ces molécules se sont révélées potentiellement intéressantes dans la prise en charge de maladies inflammatoires, telles que l'arthrite rhumatoïde ou le lupus érythémateux. Le mécanisme moléculaire mis en jeu, encore mal connu, semble toutefois impliquer le facteur de transcription NFκB, responsable de l'inflammation via la production de monoxyde d'azote et de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, -8, -10, -12). Cette revue fait le point sur les principaux inhibiteurs d'HDACs et leurs effets sur l'inflammation dans divers modèles. L'ensemble des résultats tend à montrer que ces molécules possèdent de réelles propriétés anti-inflammatoires, bien qu'agissant par des mécanismes divers. Les contre-indications à l'utilisation des inhibiteurs d'HDACs seraient les pathologies inflammatoires asthmatiques et neuronales. Cet effet anti-inflammatoire est particulièrement intéressant dans le cadre de pathologies associant développement tumoral et inflammation, comme c'est le cas des tumeurs ostéo-articulaires, et plus particulièrement de l'ostéosarcome.

Histone deacetylase inhibitors: new drugs for the treatment of inflammatory diseases?

Frédéric Blanchard and Céline Chipoy

Histone deacetylase (HDAC) inhibitors induce cell cycle arrest and differentiation in cancer cells and have been in Phase I–II clinical trials for the treatment of various solid or haematological malignancies. In recent years, HDAC inhibitors have emerged as potent contenders for anti-inflammatory drugs, offering new lines of therapeutic intervention for rheumatoid arthritis or lupus erythematosus. The molecular mode of action of HDAC inhibitors is still controversial but seems to rely on reduced inflammatory mediator production, such as nitric oxide or cytokines, which implies inhibition of the transcription factor NF- κ B. These anti-inflammatory effects will hopefully lead us to appreciate the complex anti-tumour effects of HDAC inhibitors.

► The major symptoms of inflammation, namely pain, redness, swelling and elevated body temperature, result from the deregulation of a subset of genes; the so-called pro-inflammatory genes that maintain physiological homeostasis. Within this set of inflammatory molecules, soluble mediators such as nitric oxide (NO), prostaglandins (PGs) and cytokines have been studied extensively because of their importance in controlling blood pressure, vascular permeability, platelet aggregation, leukocyte infiltration, organ failure and/or regeneration, body temperature and production of acute phase protein in the liver. Interestingly, the major anti-inflammatory drugs, salicylates (aspirin) and glucocorticoids (dexamethasone), are known to inhibit activation of transcription factors such as NF- κ B that are crucial for the production of inflammatory mediators [1]. Novel anti-inflammatory therapies include other NF- κ B inhibitors (peptides, peptidomimetic and natural compounds) [1] or anti-cytokine antibodies [i.e. anti-tumour necrosis factor (TNF)- α] [2].

The packaging of DNA sequences in nucleosomes and higher-order chromatin structures has been implicated in the regulation of transcription and, until recently, it has been widely accepted that the

presence of nucleosomes blocks the accessibility of specific transcription factors to their cognate binding sequences [3,4]. Recent advances in the study of gene expression have disclosed numerous posttranslational modifications to histone N-termini. Acetylation, in particular, is regulated by the opposing actions of histone acetyl transferase (HAT) enzymes and histone deacetylase (HDAC) enzymes, and the patterns of acetylated histone residues contribute to the histone code hypothesis for epigenetic regulation of gene expression [5]. Although exceptions do exist depending on the nature of the gene [6], a common view has emerged that associates the recruitment of HAT activity with transcriptional activation, and HDAC activity with transcriptional repression. Thus, HDAC inhibitors induce the expression of numerous genes, inhibit cell proliferation and induce differentiation and/or apoptosis of tumour cells *in vitro* and *in vivo* [7,8]. Therefore, they are considered as a new class of therapeutic agents for the treatment of solid and haematological malignancies [9]. For example, HDAC inhibition induces gelsolin, which in turn is implicated in actin filament reorganization and change in cell shape [10], whereas drug-dependent inhibition of DNA synthesis and growth arrest in

Frédéric Blanchard
Univ Nantes,
EA 3822,
Laboratory of
Pathophysiology of Bone
Resorption and Therapy of
Primitive Bone Tumours,
1 rue Gaston Veil,
44035 Nantes cedex 1,
France
e-mail:
frederic.blanchard@sante.univ-nantes.fr

Céline Chipoy
INSERM,
ER17,
44035 Nantes cedex 1,
France

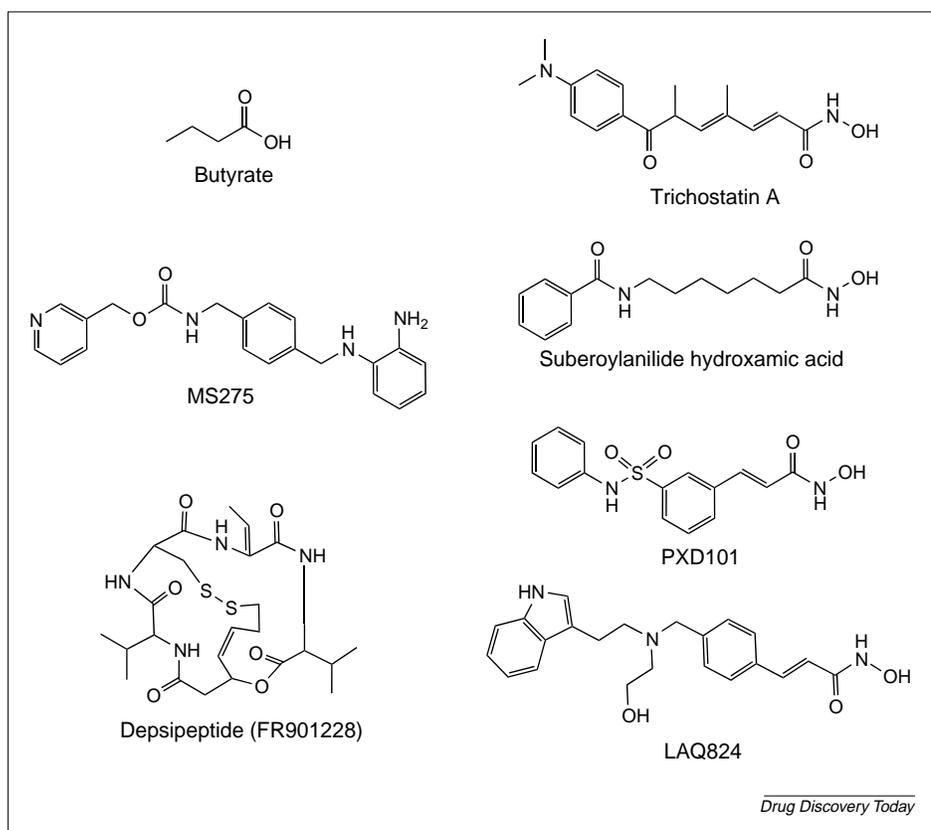


FIGURE 1
Small molecules that inhibit histone deacetylase *in vitro* and *in vivo*.

early G1 phase partly depends on the cyclin-dependent kinase inhibitor p21^{WAF1} [11]. In addition, growth arrest could be related to enhanced acetylation of non-histone targets, such as p53 [7,12].

However, epigenetic modifications of chromatin structure are known to accompany every major cell function, such as embryonic development, cell growth, differentiation, apoptosis, DNA repair and cell interactions [8,13], suggesting that HDAC inhibitors could be therapeutic candidates not only for malignancies but also many other non-malignant diseases. For instance, butyrate, the simplest HDAC inhibitor, has been found to be important for proper epithelial cell regulation, especially in the colon [14]. Butyrate and trichostatin A (TSA), although structurally unrelated compounds, both reduce interleukin (IL)-8 production and induce cell differentiation in colonic epithelial cells [15]. TSA also induces histone hyperacetylation, thus these observations soon led to the hypothesis that HDAC inhibitors could be used to treat ulcerative colitis or other inflammatory diseases via inhibition of cell proliferation and reduction of inflammatory cytokine production. A global analysis of gene expression estimated that between 2% and 9% of the genome might be regulated by HDAC inhibitors, with equal numbers of tested genes activated or repressed [8,16]. This review summarizes recent, sometimes conflicting, results indicating that HDAC inhibitors are able to

repress transcription, possess anti-inflammatory properties and, therefore, could be used to improve the treatment of ulcerative colitis, rheumatoid arthritis, lupus erythematosus, endotoxemia and hepatic injury.

HDAC inhibitors

Mammalian HDACs have been classified into three classes [7,17,18]. Class I HDACs (HDACs 1, 2, 3 and 8) are homologues of yeast RPD3 and are found exclusively in the nucleus. Class II HDACs (HDACs 4, 5, 6, 7, 9 and 10), homologues of yeast Hda1, are found in both the nucleus and the cytoplasm. HDAC11 has properties of both class I and class II HDACs. Class III HDACs (Sirt1–Sirt7) are homologues of yeast Sir2 and form a structurally distinct class of NAD-dependent enzymes [7,17,18]. Northern blot and serial analysis of gene expression indicated that both class I and II HDACs have tissue-specific expression profiles [7,19]. HDAC1, 2 and 3 are ubiquitously expressed in the various immune tissues [19] and their expression in human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) is increased by polyclonal activators (phorbol ester and α -CD3 antibodies) and HDAC inhibitors, but not by lipopolysaccharide (LPS) [19].

Currently, there are several HDAC inhibitors including butyrate, hydroxamic acid, benzamide and cyclic peptides (Figure 1) [7,8,12]. The simplest compound, butyrate, is a short-chain fatty acid derived from bacterial metabolism of dietary fibres in the colon. Butyrate inhibits all class I and II HDACs (IC_{50} in the mM range) except HDAC6 and 10 [7,18]. By contrast, TSA is a hydroxamic acid identified as having a potential therapeutic value against cancer in screens for agents that induce differentiation of erythroleukemia cells [20]. TSA inhibits all class I and II HDACs (IC_{50} = 1–10 nM) [7,17,18,21]. More recently, suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) was designed as a hydroxamate-containing small-molecule inhibitor of class I and II HDACs (IC_{50} = 10–300 nM; Figure 1), which binds directly to the zinc-containing pocket of HDACs [21,22]. Numerous other hydroxamate-containing compounds against HDAC, such as PXD101 and LAQ824, have been developed and tested in Phase I–II clinical trials (Figure 1) [12]. Another promising HDAC inhibitor (IC_{50} = 1 nM) is the depsipeptide FR901228 (or FK228), a natural product isolated from *Chromobacterium violaceum* [8,23]. This cyclic peptide is currently in Phase II clinical trials for cutaneous T-cell lymphoma and refractory solid tumours [24]. An example of a benzamide analogue that acts as a HDAC inhibitor is MS275 (Figure 1), which is suitable for both *in vitro* and *in vivo* applications [7,25]. Interestingly, MS275 preferentially inhibits HDAC1

TABLE 1

Inflammatory models sensitive to HDAC inhibitors			
Inflammatory disease	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	Inflammation
Ulcerative colitis	Colonic epithelial cells	Dextran sulfate sodium-induced colitis	Inhibition
Rheumatoid arthritis	Synoviocytes	Adjuvant arthritis	Inhibition
Lupus erythematosus (nephritis)	Splenocyte and mesangial cells	MRL- <i>lpr/lpr</i> mice	Inhibition
Endotoxemia	PBMC and macrophages	LPS injections	Inhibition
Hepatitis	Hepatocytes	Con A-induced hepatic injury	Inhibition
Asthma	Lung epithelial cells	Bronchial biopsies from subjects with asthma	Activation
Neurodegenerative diseases, stroke and traumatic brain injuries	Microglial cells	None	Activation

Abbreviation: Con A, concanavalin A.

(IC_{50} = 300 nM) versus HDAC3 (IC_{50} = 8 μ M) and has no inhibitory activity towards HDAC8 (IC_{50} >100 μ M) [17].

HDAC inhibitors, cytokine and NO expression and inflammatory diseases

Recent results have indicated that HDAC inhibitors can reduce the cytokine and NO production that contribute to various inflammatory diseases [15,26–28]. Thus, the observation that butyrate and TSA inhibit IL-8 expression in colonic epithelial cells suggested that HDAC inhibitors can be used for the effective treatment of ulcerative colitis through increased histone acetylation and reduced production of pro-inflammatory cytokines by the intestinal epithelium (Table 1) [14,15,26]. Additionally, butyrate inhibited dendritic cell maturation and IL-12 production [27], and reduced IL-2 transcription in T-cells [28]. These results suggested that bacteria could escape the host defence in the gastrointestinal tract by producing high amounts of the HDAC inhibitor, butyrate. Indeed, daily oral treatment of mice with 50 mg kg⁻¹ SAHA reduced the clinical and cytokine abnormalities in dextran sulfate sodium-induced colitis significantly [29]. Furthermore, numerous human clinical trials indicated that butyrate enemas (around 100 mM) resulted in marked improvement or remission in ulcerative colitis [30,31]. The usefulness of local butyrate administration was also observed in ulcerative colitis that is refractory to conventional salicylate treatment [31]. However, at present, there is little clinical data indicating that other HDAC inhibitors can be used as effective anti-inflammatory drugs and appropriate human clinical trials are urgently required.

In the simple animal model of mice injected with LPS, a single oral administration of SAHA reduced circulating level of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and interferon (IFN)- γ in a dose-dependent manner (0.1–50.0 mg kg⁻¹) (Table 1) [29]. Interestingly, SAHA also inhibited secretion of these

cytokines in LPS-stimulated PBMC (Table 1). The specificity of SAHA was also demonstrated by the fact that this HDAC inhibitor reduced NO production by thioglycolate-elicited mouse peritoneal macrophages, IL-12 secretion by monocytes without any modification of T-cell-receptor-stimulated IFN- γ production in PBMC [29]. Butyrate also reduced IL-12 production by human blood monocytes [32], and inhibited NO production in RAW macrophage cells [33]. Altogether, these results highlighted the anti-inflammatory properties of HDAC inhibitors during endotoxemia, an effect that could be related to the reduction of pro-inflammatory cytokines and NO production by monocytes and/or macrophages rather than by T-cells.

Systemic lupus erythematosus (SLE) is one of the autoimmune diseases characterized by heightened levels of cytokines produced by T-cells, polyclonal B-cell activation, dysregulated autoantibody production and renal inflammation. Interestingly, TSA and SAHA inhibited IL-6, IL-10, IL-12 and IFN- γ production by splenocytes of MRL-*lpr/lpr* mice, a model of SLE (Table 1) [34], as well as by human lupus T-cells [35]. In splenocytes, HDAC inhibitors induced histone H3 and H4 acetylation but did not alter cell viability [34]. Moreover, in glomerular mesangial cells stimulated with LPS and cytokines, TSA inhibited the production of TNF- α , IL-6, IL-12 and NO in a dose-dependent manner [34,36]. Finally, in MRL-*lpr/lpr* mice, subcutaneous injections of TSA (0.5 mg kg⁻¹) significantly reduced proteinuria, glomerulonephritis and splenomegaly, as well as the renal pathology index, without changing the circulating level of autoantibodies, immune complex deposition and/or complement fixation in the glomerulus [34]. Thus HDAC inhibitors could have therapeutic benefit in the treatment of SLE, to inhibit nephritis independent of autoantibody production (Table 1).

In a mouse model of concanavalin A-induced hepatic injury, a model that is TNF- α - and IL-18-dependent, SAHA (50 mg kg⁻¹ administered orally) prevented the elevation of alanine amino transaminase by 50%, suggesting an attenuation of hepatic injury (Table 1) [29].

HDAC inhibitors and transcription factors

Several results have demonstrated inhibition of NF- κ B transcriptional activity after treatment with HDAC inhibitors. As initially reported, this transcription factor is crucial for the expression of numerous pro-inflammatory mediators, such as inducible NO synthase (iNOS), IL-6, IL-8, IL-10 and IL-12 [29,34,36]. Moreover, other anti-inflammatory drugs, such as salicylates and glucocorticoids, are also known to inhibit NF- κ B [1]. However, and as discussed in a subsequent section, activation of NF- κ B by HDAC inhibitors has also been described in the literature.

At the level of the iNOS gene, it has been demonstrated that overexpression of HDAC2, 4, 5 or 6 in mesangial cells augmented iNOS promoter activity, and TSA inhibited it [36]. Therefore, HDACs were not only transcriptional

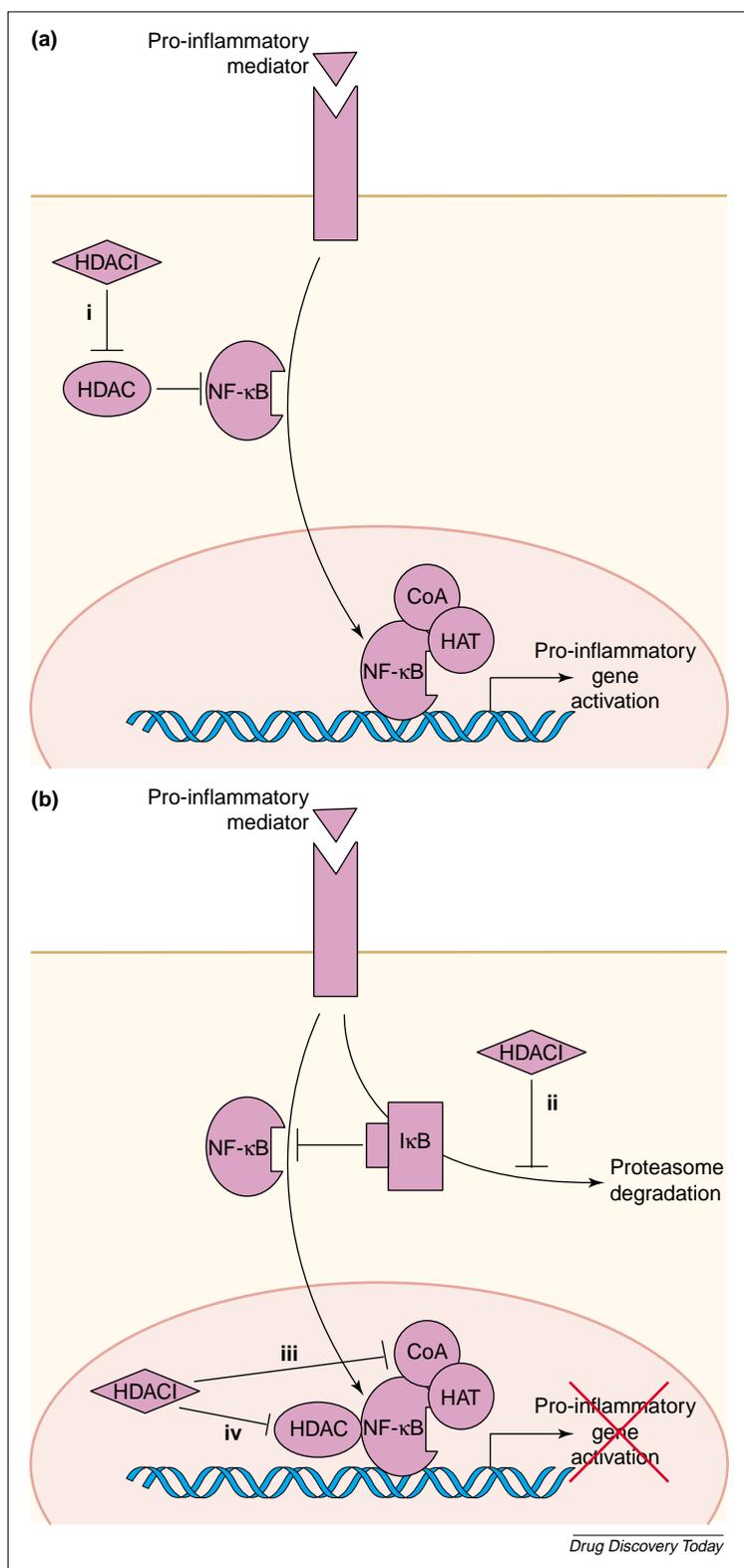


FIGURE 2

HDAC inhibitors regulate NF-κB. Histone deacetylase inhibitors (HDACi) can be either activators of pro-inflammatory gene (A, activation labelled i) or inhibitors (B, inhibitions labelled ii, iii and iv) based on their molecular target, the pro-inflammatory mediator used or the cell type. Abbreviations: CoA, transcriptional co-activator.

repressors but also transcriptional activators for particular genes concerned with NO production. Transcriptional activation by HDAC in mesangial cells required NF-κB for

three reasons: (i) HDAC2 increased the activity of an artificial NF-κB responsive promoter; (ii) TSA inhibited this activity without altering NF-κB nuclear translocation or DNA binding; and (iii) HDAC2 interacted directly with NF-κB (Figure 2b, inhibition labelled iv) [36]. In fact, studies with different gene promoters indicated that HDAC inhibition, at levels that induce global histone acetylation, might leave specific regulatory regions relatively unaffected. These treatments lead to transcriptional inhibition by mechanisms that reduced expression, recruitment or activation of various transcriptional cofactors such as NcoA1 or the acetyltransferase CBP/p300 (Figure 2b, inhibition labelled iii) [37,38].

The mechanisms leading to NF-κB inhibition by HDAC inhibitors appeared different in other cell lineages. In a monocyte and/or macrophage cell line, butyrate and TSA prevented the nuclear translocation of NF-κB, as well as NF-κB-dependent promoter activity [39]. In the same cells stimulated with LPS, butyrate reduced NO production by stabilization of IκB, an inhibitor of NF-κB, and downregulation of iNOS expression [33]. In a colon cell line, butyrate and TSA inhibited the proteasome-dependent degradation of IκB, nuclear translocation and DNA binding of NF-κB, as well as NF-κB-regulated gene expression (Figure 2b, inhibition labelled ii) [14].

The signal transducers and activators of transcription (STAT) factors are major signalling molecules downstream of numerous cytokine receptors, such as IFN, IL-2 or IL-6 receptors. Recently, it has been shown that STAT1 and 2 associated with HDAC1 (but not with HDAC4 and 5), leading to enhanced gene expression after IFN-α treatment [40]. Thus, TSA inhibited the expression of IFN-α-induced genes [40]. The IFN-γ-STAT1 system also required HDAC1, 2 and 3 activities and the STAT3-dependent transcription was inhibited by TSA in certain cell systems [41]. Together with the inhibitory role of TSA on IL-2 responses and HDAC1 recruitment to STAT5 target genes [42,43], these results lead to hypothesize that the recruitment of class I HDACs might be required generally for STAT-dependent transcriptional regulation and propagation of the inflammatory reaction.

HDAC inhibitors, inflammation and cancer: an example of osteo-articular diseases

Here, osteo-articular tissue will be used as an example to discuss how inhibition of inflammation and bone resorption by HDAC inhibitors could help explain their anti-tumour activities. However, this hypothesis, which could be extended to other tissues and malignancies, needs additional evaluation in animal models and human clinical trials.

Primary or metastatic bone tumours favour inflammation and osteoclast-mediated bone resorption. The candidates for osteolytic mediators are vitamins (VitD3), hormones (*para*-thyroid hormone and *para*-thyroid hormone-related peptide) and cytokines [receptor activator of NF-κB ligand (RANKL), IL-1, TNF-α, IL-6 type cytokines]

[46–49]. These cytokines are produced by osteoblastic or tumour cells, by infiltrating macrophages or lymphocytes. Subsequently, peri-tumour osteolysis activates the release of matrix-associated cytokines, such as transforming growth factor- β (TGF- β) and bone morphogenetic proteins (BMPs) (Figure 3), which increase tumour proliferation. Thus, a vicious cycle is established between tumour growth and associated inflammation and/or bone resorption (Figure 3) [46,47]. Therefore, recent trials were performed to evaluate the therapeutic potential of anti-resorption agents such as bisphosphonates in the treatment of osteosarcoma, chondrosarcoma, myeloma and metastatic bone tumours [48].

In an osteosarcoma xenograft model in nude mice, FR901228 reduced the tumour volume to 30% [44]. Thus, HDAC inhibitors, by inducing tumour regression, are promising anti-tumour agents against paediatric bone tumours [25,44]. FR901228 directly induced apoptosis in osteosarcoma cells via induction of Fas ligand and/or Fas signalling and subsequent activation of caspases (Figure 3) [44]. Another action of HDAC inhibitors on tumour growth might be indirect through inhibition of tumour-associated inflammation and bone resorption. Thus, butyrate and TSA suppressed osteoclast differentiation induced by RANKL on bone marrow cultures or the macrophage cell line RAW264 (Figure 3), but did not modify the formation of mature macrophages induced by macrophage colony-stimulating factor [39]. In RAW264 cells treated with RANKL, butyrate and TSA decreased NF- κ B-dependent gene transactivation by preventing NF- κ B nuclear translocation (Figure 3) [39]. *In vivo*, the inhibitory effects of HDAC inhibitors on bone resorption were observed in a mouse model of rheumatoid arthritis [45]. In this model, 10% butyrate cream or 1% TSA ointment reduced joint swelling, cell infiltration, synovial hyperplasia, pannus formation and cartilage and bone destruction. These effects correlated with (i) inhibition of synovial cell proliferation via induced expression of the cell cycle inhibitors p16^{INK4} and p21^{WAF1}, and (ii) reduced production of TNF- α in the synovium of arthritic mice [45].

Contraindications in inflammatory diseases

In contrast to these anti-inflammatory effects, TSA and SAHA have been shown to strongly potentiate microglial inflammation. These HDAC inhibitors enhanced the LPS-induced expression of IL-6, TNF- α , macrophage inflammatory protein-2 and NO in primary microglial cells as well as in neural co-cultures (Table 1) [50]. Therefore, histone acetylation could participate in the inflammatory response associated with a variety of neurodegenerative diseases, stroke and traumatic brain injuries. Whether the inducing effect of HDAC inhibitors on microglial inflammation rely on expression of different HDAC isoforms or other tissue-specific variations remains to be determined. In this context, the use of new type-selective HDAC inhibitors could be particularly interesting, as discussed in a subsequent section.

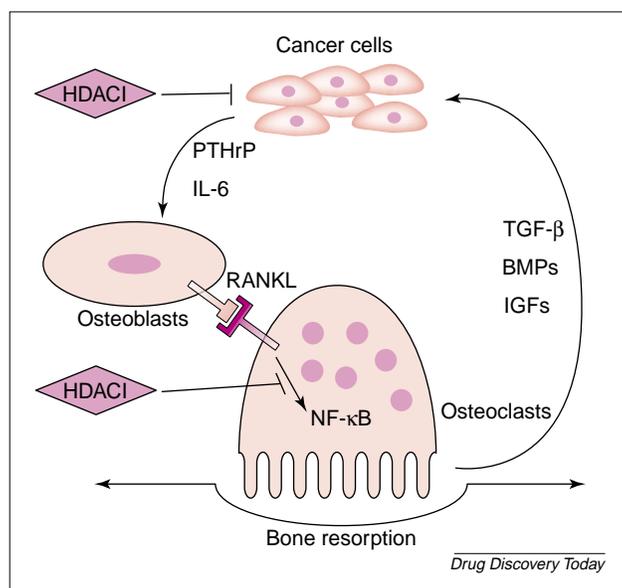


FIGURE 3

HDAC inhibitors, bone tumours and inflammation/bone resorption.

Histone deacetylase inhibitors (HDACi) inhibit tumour proliferation and/or survival and associated inflammation/bone resorption via neutralization of NF- κ B in osteoclasts. This dual effect of HDACi could lead to reduced levels of pro-inflammatory cytokines and growth factors in the tumour microenvironment and thus participate in tumour regression. Abbreviations: IGFs, insulin-like growth factors; PTHrP, *para*-thyroid hormone-related peptide.

TSA also enhanced IL-8 production by SV-40-transformed lung epithelial cells treated with LPS, suggesting an inducing role of TSA on airway inflammation (Table 1) [51]. Other experiments indicated that bronchial biopsies from patients with asthma have reduced HDAC activities and induced HAT activities [52]. The increased expression of pro-inflammatory genes in asthma could therefore be related to histone hyperacetylation, precluding the use of HDAC inhibitors for the treatment of this disease [53,54].

Similarly, increased histone hyperacetylation was found within the TNF- α promoter in monocytes from patients with diabetes [55]. THP1 monocytic cells treated with high glucose or TSA have induced TNF- α mRNA levels, in correlation with increased HAT and decreased HDAC1 binding to the TNF- α promoter, suggesting that histone hyperacetylation is also implicated in diabetes-induced inflammatory disease [55].

In microglial cells, a NF- κ B inhibitor prevented induction of NO and cytokine production by TSA [50]. Similarly, HDAC inhibitors enhanced NF- κ B activation in the lungs [51–54] and in THP1 monocytic cells [55]. In line with these results, other groups demonstrated that the interaction of NF- κ B with HDAC1 represses transcription in resting cells, whereas the interaction with CBP/p300 activates transcription in stimulated cells [56]. NF- κ B is acetylated at multiple lysine residues by CBP/p300 acetyltransferase, impairing I κ B assembly and increasing NF- κ B transcriptional activation [57,58]. Inversely, acetylated NF- κ B is subject to deacetylation by HDAC3, promoting

I κ B binding, nuclear export and termination of the NF- κ B signal. In this scheme, HDAC inhibitors such as TSA induced an NF- κ B-dependent reporter-gene (Figure 2a, activation labelled i) [55–58]. Most presumably, inhibitory or inducing effects of HDAC inhibitors on NF- κ B rely on the cell type and expression of a different set of HDAC isoforms, as well as the source of cell stimulation (e.g. LPS, cytokines and high glucose levels).

New HDAC inhibitors

Based on their various sub-cellular localization, intra-tissue variation and non-redundant activity, the different HDACs are certainly implicated in various specific cellular processes, such as proliferation, metabolism and differentiation. For example, class I HDACs are mainly nuclear enzymes, whereas class II HDACs localize either to the cell nucleus or to the cytoplasm, depending on their phosphorylation and subsequent binding of 14-3-3 proteins.

Moreover, class II HDACs display a tissue-specific expression, whereas class I HDACs are ubiquitously expressed [7,17–19,59]. Thus, it is speculated that the ideal anti-inflammatory HDAC inhibitor will target the specific HDAC isoform primarily expressed in inflamed tissues and implicated in inflammatory mediator production. Numerous published data suggest that class I HDACs, most presumably HDAC1, 2 and 3, could have inflammatory properties [7,19,36,40,41,43]. Interestingly, butyrate and MS275 show a somewhat preferential inhibitory effect against particular class I HDACs [17,18]. However, butyrate has an IC₅₀ in the mM range and a short half-life that limits its effectiveness as a therapeutic agent. Therefore, synthesis of new short fatty acid or benzamide structural homologues could help in the design of true isoform-selective, highly active inhibitors within class I HDACs. Already, chemical manipulation of hydroxamate compounds has led to the discovery of selective class II HDAC inhibitors [59] that should now be studied as modulators of inflammation. Of course, the development of new cost effective assays for the screening of specific HDAC inhibitors will help delineate more effective, less toxic and clinically relevant anti-inflammatory reagents [17,21]. Ideally, new *in vitro* and cell-based assays should be used that closely model the situation in cytokine and NO producing cells.

Peptide therapy could also provide an interesting outlook for the design of specific HDAC inhibitors. Small membrane-penetrating peptides have the potential to block the signalling pathways selectively, especially in NF- κ B-dependent pathways [1]. Therefore, peptides designed to prevent interaction between a particular HDAC and NF- κ B or other transcription factors could represent promising anti-inflammatory reagents.

Conclusions and perspectives

Butyrate improves the efficacy of conventional anti-inflammatory treatments in refractory ulcerative colitis

[31], therefore, future trials will certainly analyse association of salicylates, glucocorticoids and/or anti-cytokine immunotherapy with low dose HDAC inhibitors for the treatment for other inflammatory diseases. Whether the administration of HDAC inhibitors should be local or systemic will certainly depend on the nature of the inflammatory disease, on the extent of inflammation and its aggressiveness. *In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory effects of HDAC inhibitors seem to rely on three factors: (i) inhibition of cytokine and NO production; (ii) inhibition of key transcription factors (NF- κ B and STAT); and (iii) inhibition of proliferation or induction of differentiation of normal cells during inflammation (synoviocytes and colonic epithelial cells). Abnormal cytokine release contributes to pathogenesis and the spreading of numerous inflammatory diseases, as confirmed by knockout animal models and anti-cytokine therapies [2]. Thus, downregulation of cytokine production by HDAC inhibitors could explain their striking anti-inflammatory activities. However, *in vivo* studies that directly demonstrate an effect of HDAC inhibitors on inflammation through modulation of NF- κ B and cytokine production have not yet been published.

The major transduction pathways studied in this field of inflammatory mediators are NF- κ B and STAT transcription factors that could directly interact with various HDACs for gene induction [36–38,40,41,43]. Future research will focus on whether important steps rely on modifications of histone or on original mechanisms targeting transcription factors acetylation, sub-cellular localization or transcriptional activity through recruitment of transcriptional co-activators. Discoveries in these fields will enable the production of new arrays to screen for more specific HDAC inhibitors and new anti-inflammatory drugs or their combinations. A better understanding of HDAC mode-of-action will also permit the design of inhibitory peptides that should be specific for HDAC isoforms, or even for specific interactions between one particular HDAC and one given transcription factor.

The effect of HDAC inhibitors on normal cell proliferation and differentiation during inflammation could be related to their anti-neoplastic effects because both are associated with induction of the cell cycle inhibitor p21^{WAF1} [45]. Moreover, there is an interesting new avenue of therapeutic use of HDAC inhibitors for the treatment of malignancies associated with inflammation, such as primary or metastatic bone tumours [44–48]. The growth of malignant cells is highly regulated by the local environment, and pro-inflammatory mediators can enhance tumour proliferation. Therefore, by reducing cytokine production, HDAC inhibitors could limit tumour growth. Additionally, HDAC inhibitors could suppress tumour expansion, at least in part, by the inhibition of neovascularization [60,61]. Altogether, it appears that these drugs act as anti-tumour reagents at multiple steps: tumour proliferation and apoptosis; angiogenesis and tumour

dissemination; and pro-inflammatory reactions associated with tumour development.

HDAC inhibitors are thus emerging as a new class of drugs that could be used for the treatment of solid or haematological malignant tumours, as well as numerous inflammatory diseases. However, human clinical trials are urgently needed to confirm that HDAC inhibitors can be used as effective anti-inflammatory drugs. Moreover, HDAC inhibitors might also enhance lung and microglial inflammation as well as high glucose-induced inflammation [50–55]. Thus, studies in the field of hyperglycaemia, airway and neural inflammation are particular hotspots to understand more precisely the cell-specific

molecular mode-of-action of HDAC inhibitors and to describe more clearly their contraindications. Non-exhaustively, these include diabetes, asthma, neurodegenerative diseases, stroke and traumatic brain injuries.

Acknowledgements

We thank Kanji Mori for critical comments on this manuscript and acknowledge support from the Région des Pays de Loire, the Association de Recherche sur le Cancer (ARC), INSERM (Contrat de Recherche Stratégique n°4CR06F), the Ministère de la Recherche (ACI n°TS/0220044) and the Comité des Pays de Loire de la Ligue Contre le Cancer, France.

References

- D'Acquisto, F. *et al.* (2002) Inhibition of nuclear factor kappa B (NF- κ B): an emerging theme in anti-inflammatory therapies. *Mol. Interv.* 2, 22–35
- Zagury, D. and Gallo, R.C. (2004) Anti-cytokine Ab immune therapy: present status and perspectives. *Drug Discov. Today* 9, 72–81
- Zlatanova, J. *et al.* (1999) Chromatin structure revisited. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 9, 245–255
- Archer, T.K. *et al.* (1992) Transcription factor loading on the MMTV promoter: a bimodal mechanism for promoter activation. *Science* 255, 1573–1576
- Cheung, P. *et al.* (2000) Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell* 103, 263–271
- Glaser, K.B. *et al.* (2003) Gene expression profiling of multiple histone deacetylase (HDAC) inhibitors: defining a common gene set produced by HDAC inhibition in T24 and MDA carcinoma cell lines. *Mol. Cancer Ther.* 2, 151–163
- de Ruijter, A.J. *et al.* (2003) Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem. J.* 370, 737–749
- Weidle, U.H. and Grossmann, A. (2000) Inhibition of histone deacetylases: a new strategy to target epigenetic modifications for anticancer treatment. *Anticancer Res.* 20, 1471–1485
- Kelly, W.K. *et al.* (2003) Phase I clinical trial of histone deacetylase inhibitor: suberoylanilide hydroxamic acid administered intravenously. *Clin. Cancer Res.* 9, 3578–3588
- Mielnicki, L.M. *et al.* (1999) Epigenetic regulation of gelsolin expression in human breast cancer cells. *Exp. Cell Res.* 249, 161–176
- Archer, S.Y. *et al.* (1998) p21(WAF1) is required for butyrate-mediated growth inhibition of human colon cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 6791–6796
- McLaughlin, F. *et al.* (2003) The cell cycle, chromatin and cancer: mechanism-based therapeutics come of age. *Drug Discov. Today* 8, 793–802
- Jaenisch, R. and Bird, A. (2003) Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat. Genet.* 33, 245–254
- Yin, L. *et al.* (2001) Butyrate suppression of colonocyte NF- κ B activation and cellular proteasome activity. *J. Biol. Chem.* 276, 44641–44646
- Huang, N. *et al.* (1997) Inhibition of IL-8 gene expression in Caco-2 cells by compounds which induce histone hyperacetylation. *Cytokine* 9, 27–36
- Chambers, A.E. *et al.* (2003) Histone acetylation-mediated regulation of genes in leukaemic cells. *Eur. J. Cancer* 39, 1165–1175
- Hu, E. *et al.* (2003) Identification of novel isoform-selective inhibitors within class I histone deacetylases. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 307, 720–728
- Guardiola, A.R. and Yao, T.P. (2002) Molecular cloning and characterization of a novel histone deacetylase HDAC10. *J. Biol. Chem.* 277, 3350–3356
- Dangond, F. and Gullans, S.R. (1998) Differential expression of human histone deacetylase mRNAs in response to immune cell apoptosis induction by trichostatin A and butyrate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247, 833–837
- Yoshida, M. *et al.* (1987) Effects of trichostatin on differentiation of murine erythroleukemia cells. *Cancer Res.* 47, 3688–3691
- Wegener, D. *et al.* (2003) Recent progress in the development of assays suited for histone deacetylase inhibitor screening. *Mol. Genet. Metab.* 80, 138–147
- Marks, P.A. *et al.* (2004) Histone deacetylase inhibitors: development as cancer therapy. *Novartis Found. Symp.* 259, 269–281
- Nakajima, H. *et al.* (1998) FR901228, a potent antitumor antibiotic, is a novel histone deacetylase inhibitor. *Exp. Cell Res.* 241, 126–133
- Sandor, V. *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
- Jaboin, J. *et al.* (2002) MS-27-275, an inhibitor of histone deacetylase, has marked *in vitro* and *in vivo* antitumor activity against pediatric solid tumors. *Cancer Res.* 62, 6108–6115
- Gibson, P.R. *et al.* (1999) Colonic epithelial cell activation and the paradoxical effects of butyrate. *Carcinogenesis* 20, 539–544
- Saemann, M.D. *et al.* (2002) Bacterial metabolite interference with maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* 71, 238–246
- Diakos, C. *et al.* (2002) Novel mode of interference with nuclear factor of activated T-cells regulation in T-cells by the bacterial metabolite n-butyrate. *J. Biol. Chem.* 277, 24243–24251
- Leoni, F. *et al.* (2002) The antitumor histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid exhibits anti-inflammatory properties via suppression of cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 2995–3000
- Luhns, H. *et al.* (2002) Butyrate inhibits NF- κ B activation in lamina propria macrophages of patients with ulcerative colitis. *Scand. J. Gastroenterol.* 37, 458–466
- Vernia, P. *et al.* (2003) Topical butyrate improves efficacy of 5-ASA in refractory distal ulcerative colitis: results of a multicentre trial. *Eur. J. Clin. Invest.* 33, 244–248
- Saemann, M.D. *et al.* (2000) Anti-inflammatory effects of sodium butyrate on human monocytes: potent inhibition of IL-12 and up-regulation of IL-10 production. *FASEB J.* 14, 2380–2382
- Chakravorty, D. *et al.* (2000) The inhibitory action of butyrate on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 murine macrophage cells. *J. Endotoxin Res.* 6, 243–247
- Mishra, N. *et al.* (2003) Histone deacetylase inhibitors modulate renal disease in the MRL-*lpr/lpr* mouse. *J. Clin. Invest.* 111, 539–552
- Mishra, N. *et al.* (2001) Trichostatin A reverses skewed expression of CD154, interleukin-10, and interferon-gamma gene and protein expression in lupus T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 2628–2633
- Yu, Z. *et al.* (2002) Histone deacetylases augment cytokine induction of the iNOS gene. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13, 2009–2017
- Wilson, M.A. *et al.* (2002) The histone deacetylase inhibitor trichostatin A blocks progesterone receptor-mediated transactivation of the mouse mammary tumor virus promoter *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 277, 15171–15181
- Montecino, M. *et al.* (1999) Chromatin hyperacetylation abrogates vitamin D-mediated transcriptional upregulation of the tissue-specific osteocalcin gene *in vivo*. *Biochemistry* 38, 1338–1345
- Rahman, M.M. *et al.* (2003) Two histone deacetylase inhibitors, trichostatin A and sodium butyrate, suppress differentiation into osteoclasts but not into macrophages. *Blood* 101, 3451–3459
- Nusinzon, I. and Horvath, C.M. (2003) Interferon-stimulated transcription and innate antiviral immunity require deacetylase activity and histone deacetylase 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 14742–14747

- 41 Klampfer, L. *et al.* Requirement of histone deacetylase activity for signaling by STAT1. *J. Biol. Chem.* (in press)
- 42 Koyama, Y. *et al.* (2000) Histone deacetylase inhibitors suppress IL-2-mediated gene expression prior to induction of apoptosis. *Blood* 96, 1490–1495
- 43 Xu, M. *et al.* (2003) STAT5-induced Id-1 transcription involves recruitment of HDAC1 and deacetylation of C/EBPbeta. *EMBO J.* 22, 893–904
- 44 Imai, T. *et al.* (2003) FR901228 induces tumor regression associated with induction of Fas ligand and activation of Fas signaling in human osteosarcoma cells. *Oncogene* 22, 9231–9242
- 45 Chung, Y.L. *et al.* (2003) A therapeutic strategy uses histone deacetylase inhibitors to modulate the expression of genes involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Mol. Ther.* 8, 707–717
- 46 Hofbauer, L.C. *et al.* (2001) Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin: potential implications for the pathogenesis and treatment of malignant bone diseases. *Cancer* 92, 460–470
- 47 Grimaud, E. *et al.* (2002) Bone remodelling and tumour grade modifications induced by interactions between bone and swam rat chondrosarcoma. *Histol. Histopathol.* 17, 1103–1111
- 48 Green, J.R. (2003) Antitumor effects of bisphosphonates. *Cancer* 97, 840–847
- 49 Chambers, T.J. (2000) Regulation of the differentiation and function of osteoclasts. *J. Pathol.* 192, 4–13
- 50 Suuronen, T. *et al.* (2003) Regulation of microglial inflammatory response by histone deacetylase inhibitors. *J. Neurochem.* 87, 407–416
- 51 Iwata, K. *et al.* (2002) Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, down-regulates interleukin-12 transcription in SV-40-transformed lung epithelial cells. *Cell. Immunol.* 218, 26–33
- 52 Ito, K. *et al.* (2002) Expression and activity of histone deacetylases in human asthmatic airways. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166, 392–396
- 53 Ito, K. *et al.* (2002) A molecular mechanism of action of theophylline: Induction of histone deacetylase activity to decrease inflammatory gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 8921–8926
- 54 Rahman, I. (2002) Oxidative stress, transcription factors and chromatin remodelling in lung inflammation. *Biochem. Pharmacol.* 64, 935–942
- 55 Miao, F. *et al.* (2004) *In vivo* chromatin remodeling events leading to inflammatory gene transcription under diabetic conditions. *J. Biol. Chem.* 279, 18091–18097
- 56 Zhong, H. *et al.* (2002) The phosphorylation status of nuclear NF-kappa B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1. *Mol. Cell* 9, 625–636
- 57 Chen, L.F. *et al.* (2002) Acetylation of RelA at discrete sites regulates distinct nuclear functions of NF-kappaB. *EMBO J.* 21, 6539–6548
- 58 Chen, L.F. and Greene, W.C. (2003) Regulation of distinct biological activities of the NF-kappaB transcription factor complex by acetylation. *J. Mol. Med.* 81, 549–557
- 59 Mai, A. *et al.* (2003) Discovery of (aryloxopropenyl)pyrrolyl hydroxyamides as selective inhibitors of class IIa histone deacetylase homologue HD1-A. *J. Med. Chem.* 46, 4826–4829
- 60 Kwon, H.J. *et al.* (2002) Histone deacetylase inhibitor FK228 inhibits tumor angiogenesis. *Int. J. Cancer* 97, 290–296
- 61 Sasakawa, Y. *et al.* (2003) Antitumor efficacy of FK228, a novel histone deacetylase inhibitor, depends on the effect on expression of angiogenesis factors. *Biochem. Pharmacol.* 66, 897–906

Related articles in other Elsevier journals

Histone deacetylases: silencers for hire

Ng, H.H. and Bird, A. (2000) *Trends Biochem. Sci.* 25, 121–126

Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy: is transcription the primary target?

Johnstone, R.W. and Licht, J.D. (2003) *Cancer Cell.* 4, 13–18

The cell cycle, chromatin and cancer: mechanism-based therapeutics come of age

McLaughlin, F. *et al.* (2003) *Drug Discov. Today* 8, 793–802

Altered acetylation in polyglutamine disease: an opportunity for therapeutic intervention?

Taylor, J.P. and Fischbeck, K.H. (2002) *Trends Mol. Med.* 8, 195–197

Complément de discussion à la revue I

Dans le cadre de notre étude des effets de l'OSM sur les cellules d'ostéosarcomes, nous avons voulu savoir si les HDACs étaient impliquées dans les diverses régulations géniques observées. Le recrutement d'HDACs a pour conséquence la répression de la transcription de gènes. Or après un traitement à l'OSM, des marqueurs ostéoblastiques sont réduits (phosphatase alcaline, sialoprotéine osseuse) de même qu'une protéine anti-apoptotique indispensable à la survie de la cellule (Bcl-2). Les voies de signalisation impliquées ont été identifiées: il s'agit de la PKC δ et potentiellement de la p53 également, en ce qui concerne les marqueurs ostéoblastiques, et du facteur de transcription STAT5 pour Bcl-2. La question posée était donc la suivante: ces protéines recrutent-elles des HDACs pour inhiber la transcription de leurs gènes cibles ?

Afin de répondre à cette question, nous avons utilisé un inhibiteur des HDACs couramment employé et capable d'inhiber tous les HDACs de classe I et II: la Trichostatine A (TSA). Les cellules OSRGA ont été traitées 48 heures avec de l'OSM en présence ou non de TSA, puis les ARN ont été extraits et l'expression des marqueurs ostéoblastiques a été étudiée en RT-PCR. Les résultats obtenus ont montré que la TSA n'empêchait pas la perte des marqueurs, que ce soit la phosphatase alcaline ou la sialoprotéine osseuse (Figure 1A). Ces résultats ont pu être confirmés au niveau protéique par un test d'activité phosphatase alcaline, où à nouveau la TSA n'a aucun effet sur la réduction de ce marqueur.

La régulation de Bcl-2 en présence de TSA a ensuite été étudiée. Les cellules OSRGA ont été traitées comme précédemment, puis les protéines ont été extraites et analysées grâce à des expériences de western blot. Là encore, l'OSM est capable de réduire le niveau d'expression de Bcl-2 même en présence de TSA (Figure 1B).

Ces résultats semblent donc indiquer que les HDACs ne sont pas impliquées dans la régulation de ces gènes par l'OSM. Il est toutefois à noter que la concentration utilisée (10 nM), est relativement faible en comparaison des doses utilisées classiquement. Il faudrait alors vérifier l'efficacité de cette concentration sur d'autres cibles de la TSA, comme la protéine p21, connue pour être induite par cet inhibiteur des HDACs. Des doses plus élevées ont été testées (100 nM), mais la toxicité provoquée n'a pas permis l'analyse des ARN et protéines.

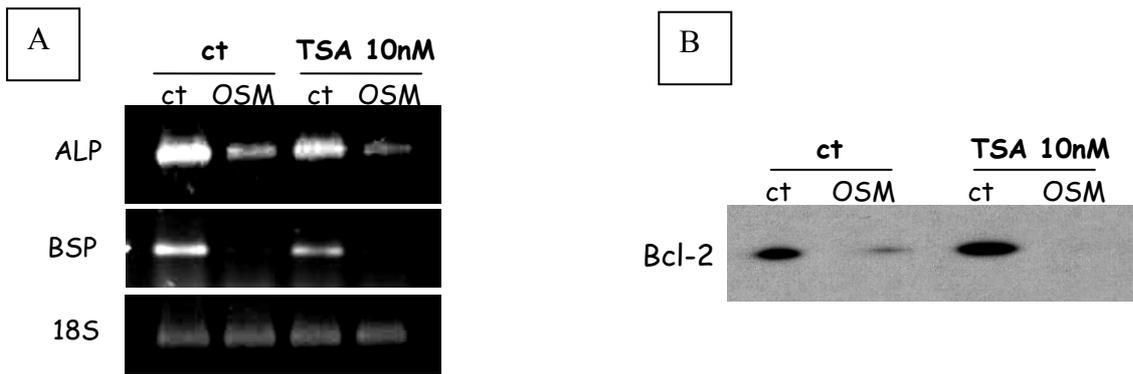


Figure 1: Effets de la TSA sur la réduction des marqueurs ostéoblastiques (A) et de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (B) suite à un traitement à l'OSM sur les cellules OSRGA.

S'il n'est pas surprenant que l'action de PKC δ ne nécessite pas l'intervention des HDACs, on pouvait en revanche s'attendre à ce que ces molécules coopèrent avec les facteurs de transcription STAT5 et p53. Plusieurs études ont en effet démontré un lien entre STAT5 et les HDACs. Xu et collaborateurs (Xu et al., 2003) ont ainsi montré qu'après stimulation à l'IL-3 dans des cellules Ba/F3, l'activation de STAT5 entraîne sa liaison à l'ADN et le recrutement d'une HDAC: HDAC1. La molécule C/EBP β , acétylée et incapable de se lier à l'ADN, va alors être déacétylée par HDAC1 et jouer un rôle activateur sur la transcription de gènes tels que Id-1. Dans ce cas, l'effet de la déacétylation induite par STAT5 est favorable à la transcription, ce qui va à l'encontre des observations classiques. Un effet similaire a également été décrit dans une seconde étude (Rasclé et al., 2003), dans laquelle un traitement à la TSA empêche l'induction de gènes cibles de STAT5, dont les protéines Cis et c-myc. Les auteurs ont pu montrer que cet effet n'est pas du à une modification de la structure de la chromatine ou à une acétylation des histones par la TSA, mais plutôt à une acétylation d'autres protéines. En fait, le blocage semble s'exercer au niveau de la machinerie transcriptionnelle, la TSA empêchant le recrutement d'une molécule nécessaire à la formation du complexe. Cette molécule, qui peut être STAT5 lui-même ou toute autre molécule du complexe d'initiation, doit rester déacétylée pour être active. Une hypothèse est que l'acétylation induite par la TSA modifie les charges et les interactions protéiques, bloquant le recrutement de protéines essentielles à la transcription. Là encore, les HDACs jouent un rôle positif sur la transcription de gènes. Ces observations sont en accord avec celles décrites dans

la revue précédente concernant l'activation de NFκB par les HDACs. Cet effet positif sur la transcription semble être soit direct, via une interaction HDAC2- NFκB, soit indirect, par le recrutement de cofacteurs par exemple. Dans ce cas, les inhibiteurs des HDACs vont bloquer la transcription génique, et ici réduire l'inflammation.

Il semble donc que les fonctions des HATs et des HDACs soient en réalité plus complexes que la description classique qui en est faite, à savoir une induction de la transcription par les HATs et une répression par les HDACs. Ceci est en partie dû au fait que ces molécules peuvent acétyler et déacétyler non seulement les histones, et donc "ouvrir" ou "fermer" la chromatine, mais également d'autres protéines (p53, C/EBPβ), modulant ainsi leur fonction et leurs interactions.

Au niveau du tissu osseux, le facteur de transcription Cbfa1 est lui aussi régulé par phosphorylation, ubiquitination et acétylation. En effet, il a été montré que la protéine BMP2 via le cofacteur p300, induit l'acétylation de Cbfa1 (Jeon et al., 2006). Cette modification, en empêchant l'ubiquitination et donc la dégradation de Cbfa1, le stabilise et augmente son activité transcriptionnelle. Au contraire, les HDAC4 et 5 déacétylent Cbfa1 qui peut alors être dégradé. Ainsi, des inhibiteurs des HDACs maintiennent Cbfa1 acétylé et favorisent la formation osseuse. L'acétylation apparaît donc comme un moyen de régulation majeur dans la cellule, au même titre que la phosphorylation.

PARTIE II

Etude in vivo des effets de l'OSM sur l'os et les ostéosarcomes

I/ Effets de l'OSM seul ou associé avec le PKC412 dans un modèle d'ostéosarcome de rat

Introduction

Les traitements actuels des ostéosarcomes, associant chirurgie et chimiothérapie, ont très largement amélioré le devenir des patients. Néanmoins, ils montrent aujourd'hui leurs limites, et notamment lorsque des métastases pulmonaires se sont développées, le taux de survie ne dépassant alors pas 30% à cinq ans. Il est donc nécessaire de développer de nouveaux protocoles thérapeutiques. Les études in vitro présentées dans la première partie de ce travail ont montré que l'OSM était capable à la fois de réduire la prolifération tumorale, de modifier le stade de différenciation, mais également de sensibiliser les cellules tumorales à l'apoptose induite par différents agents dont la Sts. Ces derniers résultats laissent envisager la possibilité d'une utilisation thérapeutique de l'OSM dans le cadre des ostéosarcomes. Afin de tester cette hypothèse et de valider les résultats obtenus in vitro, nous avons mis au point un protocole d'expérimentation animale utilisant le modèle d'ostéosarcome de rat OSRGA. Ce modèle est issu d'un ostéosarcome initialement radio-induit chez le rat Sprague-Dawley OFA par injection de ¹⁴⁴Cérium radioactif (Klein et al., 1977). Après transplantation de fragments tumoraux en position para-tibiale, le développement tumoral est accompagné d'un remodelage osseux important associé à l'apparition de plages ostéolytiques et d'une dissémination métastatique pulmonaire correspondant aux données cliniques recueillies chez l'homme (Allouche et al., 1980). De plus, ce modèle présente l'avantage de disposer de la lignée cellulaire correspondante utilisée pour les études in vitro, les cellules OSRGA. La Sts n'étant pas utilisable in vivo car toxique, nous avons décidé d'utiliser une molécule analogue : le PKC412 ou N-benzoylstaurosporine, dont les effets anticancéreux in vitro ont déjà été décrits. Ce dérivatif de la Sts est également testé en essais cliniques de phases I et II dans le cadre de pathologies tumorales (Propper et al., 2001; Stone et al., 2005; Virchis et al., 2002). Assez bien toléré, le PKC412 a permis une réduction du taux de lymphocytes et une amélioration des analyses sanguines chez des patients atteints de lymphomes non-Hodgkiniens (Virchis et al., 2002). Dans une étude clinique portant sur des patients atteints de leucémies aigües myéloïdes, le PKC412 a conduit à une diminution du nombre de lymphoblastes périphériques et de la moelle osseuse (Stone et al., 2005). Comme la Sts, le PKC412 inhibe diverses kinases dont les PKC et Akt par exemple (Tenzer et al., 2001).

Le but de notre étude a donc été d'associer l'OSM (administré sous forme d'adénovirus) et le PKC412, tout comme nous avons associé l'OSM et la Sts in vitro, et de suivre l'évolution tumorale primaire et métastatique. Avant d'entreprendre cette étude in vivo, il nous a semblé nécessaire de tester les effets du PKC412 dans notre modèle OSRGA in vitro. De plus, une étude in vivo préliminaire visant à éclaircir les effets de l'OSM seule sur la biologie osseuse, le remodelage et l'architecture osseuse, en présence ou en l'absence de tumeur, a été réalisée.

Matériel et Méthodes

Culture cellulaire / Réactifs

Les cellules OSRGA, dérivées de l'ostéosarcome de rat *in vivo*, sont des cellules adhérentes cultivées dans du milieu DMEM (Bio Whittaker) complété avec 5% de sérum de veau fœtal (Dominique Dutscher) et 1% d'une solution d'antibiotiques (pénicilline-streptomycine) à 5000 unités/ml (Invitrogen). Les cellules sont placées à l'étuve à 37°C, dans une atmosphère humide à 95% d'air et 5% de CO₂. Avant confluence, les cellules sont décollées à l'aide d'une solution de trypsine (0.5 g/l)/EDTA (0.2 g/l) (Cambrex Bio Sciences) etensemencées à la densité de 10000 cellules/cm².

Les molécules utilisées dans les différentes expérimentations sont: l'OSM murine recombinante (100 ng/ml, R&D, Minneapolis, USA), la Staurosporine (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France), le PKC412 administré oralement pour les expérimentations animales à 30mg/kg/jour (Pharma Novartis AG, Basel, Suisse), et le Zoledronate, administré en sous-cutané deux fois par semaine à 100 µg/kg (Pharma Novartis AG, Basel, Suisse).

Viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire a été déterminée par des tests XTT (Roche, Mannheim, Germany). Les cellules sontensemencées en plaque 96 puits à la densité de 1500 cellules par puits et cultivées 72 heures en présence des traitements indiqués avant ajout du réactif XTT. Après incubation 5 heures à 37°C, l'absorbance est mesurée à 490 nm. Chaque expérience a été réalisée en triplicate.

Activité caspase 3

L'activité caspase 3 a été mesurée sur 10 µl de lysats protéiques totaux grâce au kit CaspAceTM Assay System Fluorometric (Promega, Madison, USA) selon les recommandations du fournisseur. La concentration protéique a été déterminée grâce au kit BCA (Pierce Chemical), les résultats sont alors exprimés en unités arbitraires corrigées par la quantité de protéines.

Le modèle d'ostéosarcome de rat OSRGA

Ce modèle d'ostéosarcome a été obtenu grâce au Dr. Jean-Paul Thiéry (Villejuif, France). Il dérive d'un ostéosarcome de rat transplantable initialement radio-induit par injection de ¹⁴⁴Cérium radioactif. L'évolution tumorale est comparable au niveau du temps (rapport 1/100 entre rats et hommes) et de la physiologie au développement d'un ostéosarcome humain. Des métastases pulmonaires sont observées dans 75 à 90% des rats (Heymann et al., 2005).

Des rats Sprague-Dawley OFA (Elevage Charles River, Arbresle, France) âgés de cinq semaines reçoivent une greffe para-tibiale d'un fragment tumoral (environ 10 mm³) issu d'une tumeur parentale. Pour l'implantation, les rats sont anesthésiés par inhalation d'une combinaison isoflurane-air (1.5%, 1L/min). Après résection de la peau, les plans musculaires sont écartés et la pièce tumorale est placée au contact du tissu osseux à la suite de l'avivement du périoste. Le fragment de tumeur est maintenu en place par la masse musculaire. Les tumeurs sont détectables environ 7 à 10 jours après la greffe.

Protocole d'expérimentation in vivo OSM+PKC412

Les rats ayant développé des tumeurs (environ 75% des rats) sont répartis aléatoirement dans les groupes contrôle ou traité. Quinze jours après l'implantation (j15), les rats sont infectés par injection d'adénovirus contenant le transgène codant pour l'OSM murine (fourni par Carl D. Richards, Hamilton, Canada), ou celui de la GFP (green fluorescent protein) pour les groupes contrôles, injections réalisées soit dans le muscle tibial antérieur de la patte contralatérale à la patte présentant la tumeur soit en intraveineux (veine péniennne). Le lendemain (j16), une solution de PKC412 (Pharma Novartis AG, Basel, Suisse) ou un placebo sont administrés aux rats par gavage, et ce 6 jours/7 jusqu'à la fin de l'expérience.

Différent paramètres sont alors suivis durant l'expérience : volume tumoral, poids des animaux, et analyses radiologiques.

Extraction des ARN totaux et RT-PCR.

Les ARN totaux des organes prélevés (foie et muscle) sont extraits à l'aide du réactif TRIzol[®] (Invitrogen) suivant le protocole préconisé par le fournisseur. Brièvement, les ARN totaux sont isolés dans la phase aqueuse de la solution TRIzol[®]/chloroforme suite à la lyse des cellules. Les ARN sont ensuite respectivement précipités puis lavés par de l'isopropanol absolu et de l'éthanol 75%. Le culot d'ARN est finalement repris dans 20 µl d'eau DEPC.

Les réactions de RT-PCR s'effectuent respectivement à partir des mélanges réactionnels suivants :

pour la transcription inverse : 5 µg d'ARN totaux repris dans un volume de 30 µl, 1 µl d'oligo-dT (500 µg/ml, Promega), 10 µl de tampon 5X (Invitrogen), 5 µl de DTT (100 mM, Invitrogen), 2,5 µl de dNTP (10 mM, Promega), 0,5 µl de RNAsine (40 U/µl, Promega), 2 µl de MMLV-RT (200 U/µl, Invitrogen)

pour les réactions de PCR : 2 µl de produit de RT, 3 µl d'oligo-nucléotides sens et anti-sens (10 pmoles/µl chaque), 31,75 µl de H₂O-DTT (0,09%), 5 µl de tampon 10X (Eurobio), 3 µl de MgCl₂ (50 mM, Eurobio), 2 µl de dNTP (10 mM, Promega), 0,25 µl de TaqPolymérase (5

U/ μ l, Eurobio). Les réactions de PCR sont réalisées à l'aide des couples d'amorces suivantes :

I8S : 5' TCAAGAACGAAAGTCGGAGGTTTCG 3'

3' TTATTGCTCAATCTCGGGTGGCT 5'

OSM : 5' GGAACCTGGGATAGACACGA 3'

3' TGTCTGGCTCCAGATCACTG 5'

Les produits de PCR sont analysés sur un gel d'agarose 1% contenant du bromure d'éthidium. Après migration, les produits de PCR sont visualisés sous UV.

Suivi de l'évolution tumorale

Le suivi de l'évolution de la tumeur s'effectue par mesure du volume tumoral trois fois par semaine. Cette mesure est donnée par la formule $L \cdot l^2 \cdot 0.5$ (avec L : le plus grand axe de la tumeur et l : le plus petit). Tout animal présentant un des axes de la tumeur supérieur à 40 mm ou une détresse respiratoire est immédiatement euthanasié. A la fin de l'expérience, les animaux sont autopsiés pour déterminer la présence et la quantité de métastases pulmonaires.

Analyse de l'architecture osseuse

Les paramètres architecturaux ont été analysés grâce au système haute résolution à rayons X micro CT (SkyScan, Aartselaar, Belgique). Ces mesures ont été réalisées en collaboration avec Paul Pilet (INSERM U791). Le volume osseux trabéculaire (BV) et la surface osseuse ectopique relative (BS/BV) ont ensuite été quantifiés grâce aux logiciels ANT (reconstruction 3D) et CTan (calculs des volumes osseux) et comparés entre groupe contrôle et groupe traité.

Activité phosphatase alcaline

L'activité phosphatase alcaline a été mesurée à partir des sera de rats en utilisant le p-nitrophenyl phosphate comme substrat comme décrit dans l'article 1 (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France). La production de p-nitrophenol par minute a été déterminée en mesurant l'absorbance à 405 nm. L'activité est exprimée en unités par minute et par litre.

Activité TRAP

Dans ce test, une solution d'anticorps anti-TRAP est tout d'abord incubée sur une plaque précoâtée en anti-IgG de souris. Après lavages, le sérum à tester, puis le substrat de l'enzyme, sont ajoutés dans les puits. L'activité enzymatique, exprimée en U/l, est déterminée par lecture de l'absorbance à 405nm (RatTRAPTM Assay, Oxford Biosystem).

Résultats

Etude comparative entre le PKC412 et la Sts en association avec l'OSM in vitro

Avant de débiter les expérimentations animales, nous avons souhaité comparer les effets du PKC412 à ceux de la Sts in vitro, grâce à des expériences de viabilité cellulaire et des tests d'activité caspase-3. Après un prétraitement de 3 jours à l'OSM, les cellules OSRGA ont été mises en présence de Sts ou de PKC412 aux concentrations indiquées, puis la viabilité a été déterminée par un test XTT.

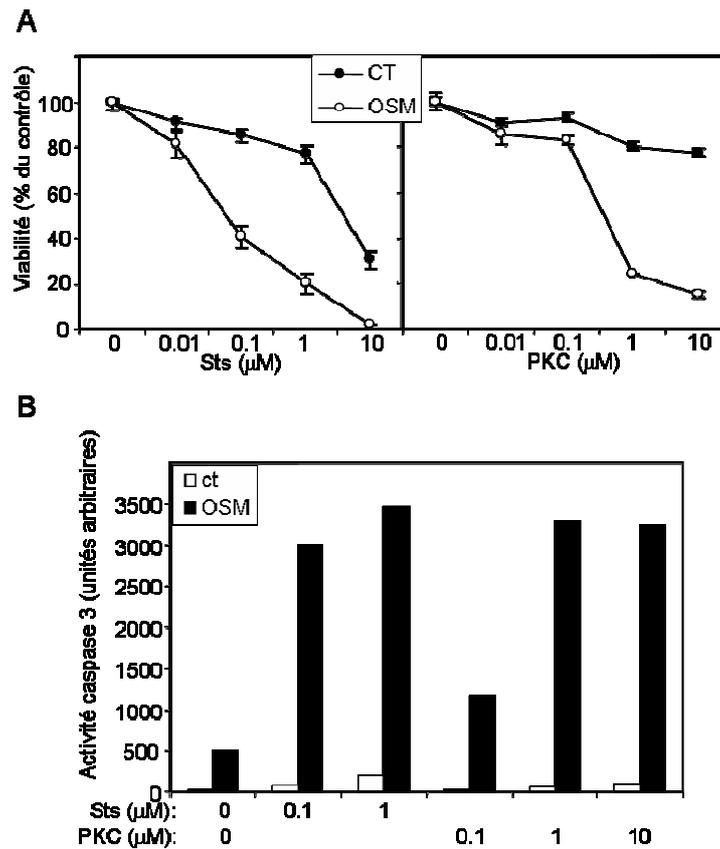


Figure 1: Comparaison des effets de la Sts et du PKC412 in vitro

A/ Viabilité cellulaire étudiée par test XTT et B/ Activité caspase-3 sur des cellules OSRGA prétraitées ou non à l'OSM et mises en présence de doses croissantes de Sts ou de PKC412

La figure 1A montre qu'il existe une synergie entre l'OSM et le PKC412 comparable à celle observée entre la Sts et l'OSM. La concentration optimale de PKC412 est de 1µM, soit 10 fois la dose optimale de la Sts (100 nM). A ces concentrations, la viabilité est réduite de façon similaire par ces deux agents combinés à l'OSM, soit de plus de 70%. Contrairement à la Sts,

le PKC412 seul n'a montré aucune toxicité, même à des concentrations plus importantes (10 μ M).

L'activité de la caspase-3 a également été testée après un traitement OSM+PKC412, et là encore on observe des résultats comparables à ceux obtenus avec la Sts, avec un facteur 10 concernant la concentration optimale (Figure 1B). In vitro, le PKC412 semble donc exercer les mêmes effets que la Sts sur la sensibilisation à la mort par l'OSM.

Efficacité de l'injection d'un adénovirus-OSM dans un cadre non tumoral

Une première série d'expériences a consisté à tester sur des rats naïfs différents modes d'injection et différentes doses d'adénovirus afin de déterminer les conditions optimales pour la suite des expérimentations. Cela a permis de constater que l'injection intraveineuse (iv) d'adénovirus-OSM est toxique de manière dose-dépendante: nulle avec injection de 1×10^9 particules infectieuses, la mortalité atteint 50% avec 2.5×10^9 particules infectieuses, et 90% avec 5×10^9 particules infectieuses après 7 jours. En revanche, l'injection en site intramusculaire (im) (dans le muscle tibial antérieur) n'entraîne aucune mortalité, même à des concentrations de 5×10^9 particules infectieuses (Figure 2A).

L'expression des transcrits OSM a pu être vérifiée par RT-PCR 7 jours après les infections virales, confirmant une forte production d'OSM au niveau hépatique après injection en iv, et au niveau musculaire après injection en im (Figure 2B).

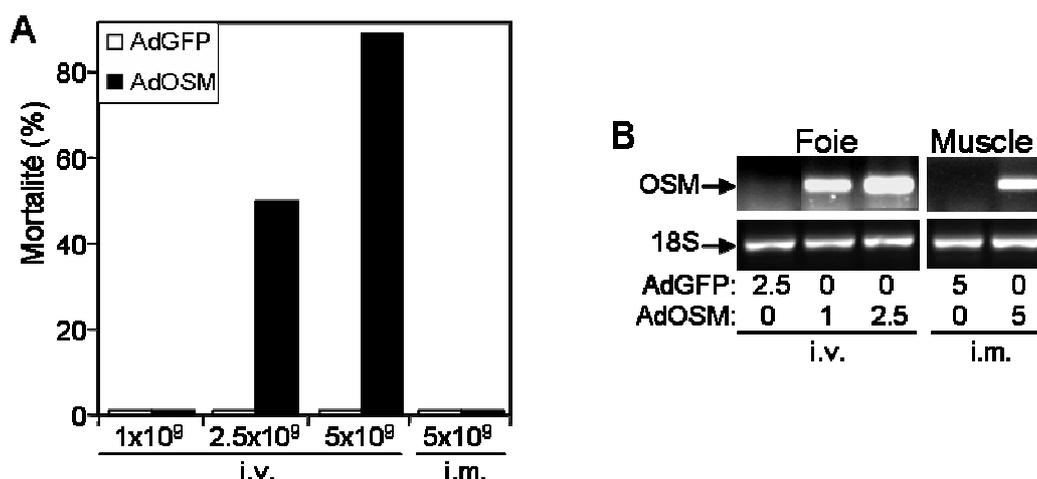


Figure 2: Effets d'un adénovirus codant pour l'OSM

A/ mortalité induite par l'adénovirus-OSM selon le site d'injection et la dose utilisée

B/ expression des transcrits OSM étudiée en RT-PCR

Effets de l'adénovirus-OSM sur la physiologie et l'architecture de l'os normal

Afin d'évaluer l'impact de l'OSM sur la biologie de l'os dans des conditions non tumorales, différents paramètres ont été étudiés. 7 jours après infection par des adénovirus-OSM, nous avons pu constater que l'activité phosphatase alcaline dans le sérum, relative aux ostéoblastes, est réduite de façon dose-dépendante quel que soit le mode d'injection, en iv ou en im (Figure 3A). Ceci concorde avec les résultats obtenus in vitro montrant une perte des marqueurs ostéoblastiques après traitement à l'OSM. De même, l'activité TRAP5b (phosphatase acide résistante au tartrate, isoforme 5b), spécifique des ostéoclastes et reflétant l'activité de résorption, est elle aussi diminuée dans les rats traités par un adénovirus-OSM après 7 jours (ici injecté en im à $1 \cdot 10^9$ particules infectieuses) (Figure 3B). L'OSM modifie également l'architecture osseuse. En effet, les mesures du volume osseux trabéculaire des tibias (BV/TV, Figure 3D) montrent qu'en présence d'OSM ce volume trabéculaire est largement réduit: de 42% après injection en im ($5 \cdot 10^9$ particules infectieuses), et de 38% après injection en iv. ($1 \cdot 10^9$ particules infectieuses).

De même, les images obtenues grâce au microscanner (Figure 3C) montrent que les travées osseuses sont moins importantes 7 jours après injection d'adénovirus-OSM ($1 \cdot 10^9$ particules infectieuses en im). Différentes mesures peuvent alors être effectuées. Alors que l'épaisseur des travées (Tb.Th) n'est pas modifiée de façon significative par l'OSM, le nombre de ces travées par mm (Tb.N) est réduit, et au contraire l'espace entre deux travées (Tb.Sp) est augmenté d'un facteur 4. Aucune différence n'a été observé au niveau de la corticale. Tout ceci tend à montrer que l'OSM affecte de manière négative les ostéoblastes, potentiellement les ostéoclastes également (réduction de TRAP5b), et par conséquent réduit la formation osseuse trabéculaire.

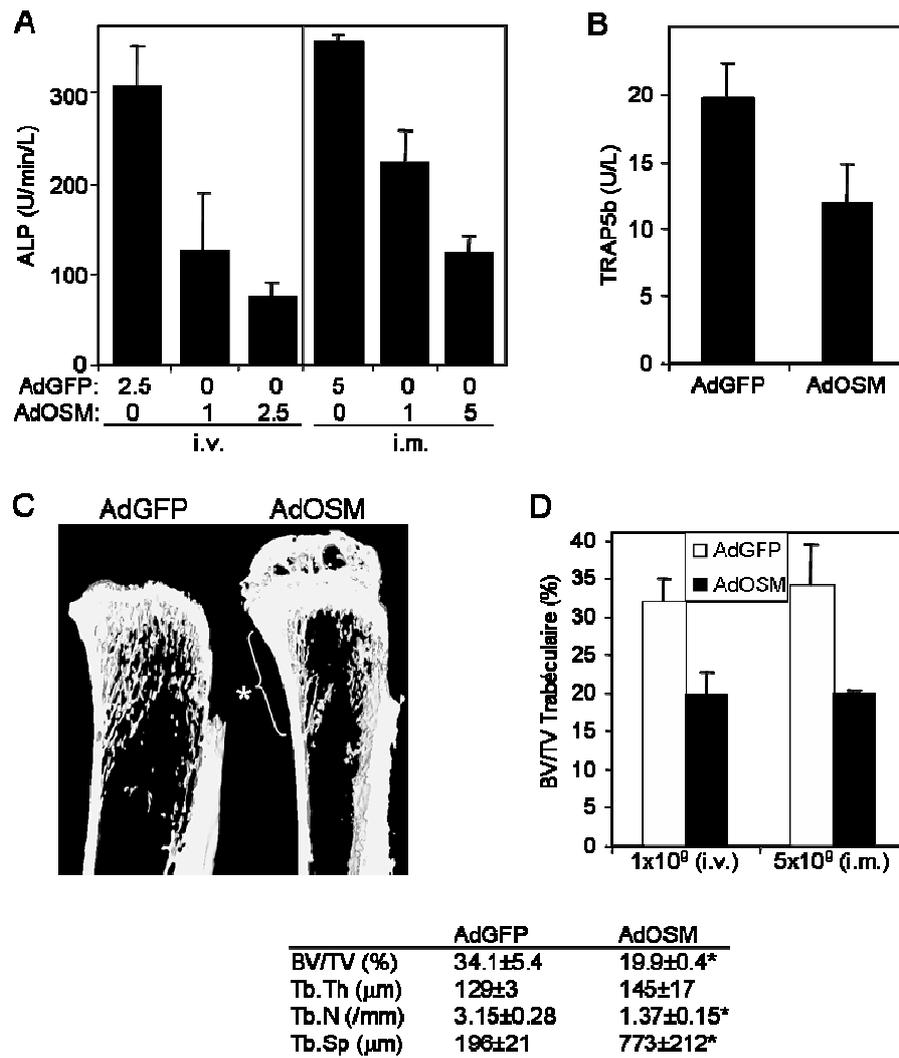


Figure 3: Effets de l'OSM sur le tissu osseux sain

A/ activité phosphatase alcaline 7 jours après infection par des adénovirus-OSM à différentes doses en iv ou en im. B/ activité TRAP5b 7 jours après infection par un adénovirus-OSM en im (1×10^9 particules infectieuses). C/ coupes frontales de tibias obtenues par microscanner 7 jours après infection par un adénovirus-GFP ou -OSM injecté en im (1×10^9 particules infectieuses). D/ Volume osseux / volume total trabéculaire après infection par un adénovirus-OSM. *BV/TV*: volume osseux/volume total en %; *Tb.Th*: épaisseur des travées osseuses en µm; *Tb.N*: nombre de travées osseuses par mm; *Tb.Sp*: espace entre deux travées osseuses en µm. n= trois animaux dans chaque groupe, * : $p < 0,05$.

Effets de l'adénovirus-OSM dans un cadre tumoral

Dans ces expériences, des tumeurs OSRGA ont été implantées au contact du tibia des rats, puis un adénovirus-OSM a été injecté en im dans la patte contra-latérale à la dose de $1 \cdot 10^9$ particules infectieuses. La dose maximale de $5 \cdot 10^9$ particules infectieuses en im dans ce modèle tumoral a été écartée pour cause de toxicité lors d'expériences préliminaires (non montré), indiquant que l'OSM serait plus toxique dans un cadre tumoral que non tumoral. Le premier effet visible de l'OSM est une perte de poids des animaux, observée dès le 2^e jour après injection (Figure 4A). Cette cachexie, due à un hypermétabolisme des lipides et des protéines, a déjà été décrite comme consécutive à la production d'OSM par la rate lors du développement tumoral (Barton and Murphy, 2001). Cette perte de poids permet donc indirectement de confirmer l'efficacité de l'injection et de la production d'OSM chez ces rats. Au fur et à mesure de l'expérience, les animaux reprennent du poids, celui-ci restant tout de même inférieur au groupe contrôle, pour enfin retrouver un poids équivalent 20 jours après injection.

Le second paramètre suivi est le volume tumoral. La figure 4B montre que l'OSM n'a aucun effet sur la progression du volume tumoral comparé au groupe contrôle (injecté avec un adénovirus-GFP). Mais si l'augmentation du volume tumoral est identique avec ou sans OSM, l'analyse des tibias révèle des différences importantes. Les tibias des rats ont été prélevés à la fin de l'expérience (j21 après injection des virus) et visualisés par photographie et radiographie (Figure 4C), ou par des coupes transversales obtenues par microscanner (Figure 4D). On peut alors observer une formation osseuse ectopique en surface du tibia et au contact de la tumeur. En présence d'OSM, cet os néoformé présente une morphologie et une architecture différente de celui observé avec des tumeurs sans OSM. La répartition de cet os néoformé autour du tibia n'est pas régulière et a une architecture « anarchique ». L'OSM ne modifie donc pas le volume tumoral mais a une incidence sur la formation osseuse consécutive au développement tumoral, qui semble anormale ou imparfaite. Ce volume osseux ectopique néoformé a ensuite été quantifié dans différentes conditions (Figure 4E). L'OSM ne modifie pas le volume osseux ectopique par rapport au contrôle GFP. Un traitement au zolédronate (Zol), molécule capable d'inhiber l'activité des ostéoclastes et donc la résorption osseuse, augmente au contraire le volume osseux ectopique, comme cela a déjà été montré au sein du laboratoire (Heymann et al., 2005), et ce que le Zol soit administré seul ou en association avec l'OSM. En revanche, la mesure de la surface osseuse rapportée au volume osseux ectopique (BS/BV) montre que l'OSM augmente cette surface osseuse ectopique, et ce même en présence de Zol (Figure 4F).

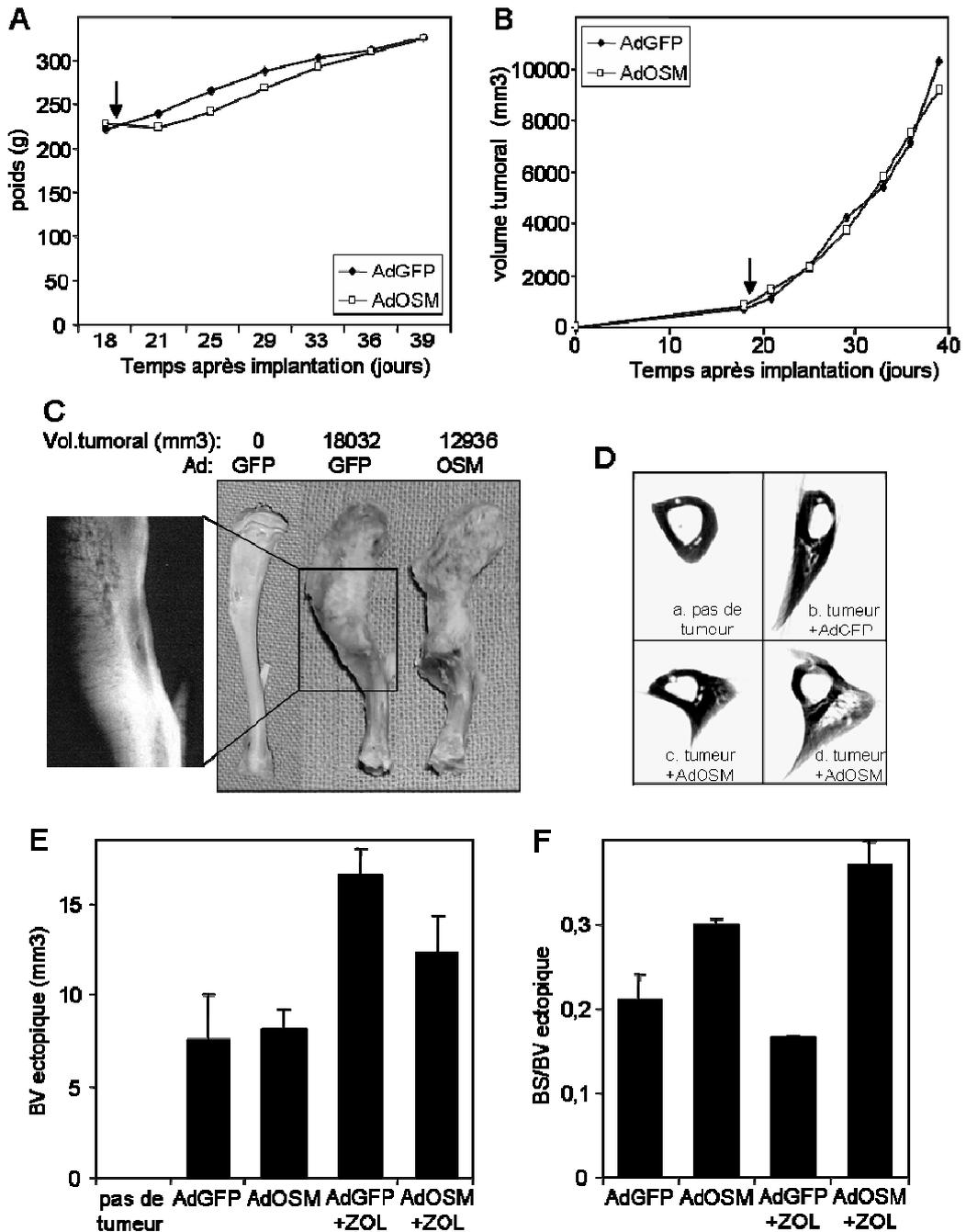


Figure 4: Effets d'un adénovirus-OSM sur le développement tumoral

A/ mesure du poids des rats. B/ évolution du volume tumoral. C/ photographies et radiographie de tibias sains ou porteurs de tumeur. D/ coupes transversales de tibias au niveau de la tumeur. E/ Mesure du volume osseux ectopique. F/ Mesure de la surface osseuse rapportée au volume osseux ectopique

Ces résultats indiquent tout d'abord que pour un même volume osseux ectopique, l'OSM modifie sa forme en augmentant sa surface, mais également que cet effet est lié principalement aux ostéoblastes normaux ou transformés. En effet, sans activité ostéoclastique (en présence de Zol), l'OSM augmente toujours ce rapport surface/volume osseux ectopique.

Effet d'un traitement associant OSM et PKC412 sur le développement tumoral

Puisque l'OSM associée à la Sts ou au PKC412 induit l'apoptose des cellules OSRGA in vitro, nous avons envisagé un protocole associant une injection d'adénovirus-OSM comme décrite précédemment avec un traitement au PKC412, l'analogue de la Sts utilisé in vivo. Le lendemain de l'infection adénovirale, les rats ont reçu une dose de PKC412 (30mg/kg) ou de placebo par voie orale, puis six jours/ sept jusqu'à la fin de l'expérience. Cette forte dose de PKC412 a été déterminée par une expérience antérieure comme n'ayant aucun effet sur la progression tumorale. Il y avait donc quatre groupes de six animaux : contrôle, PKC412, adénovirus-OSM et PKC412+adénovirus-OSM. Les volumes tumoraux ont été mesurés trois fois par semaine pendant trois semaines et sont représentés sur le graphique suivant (Figure 5A).

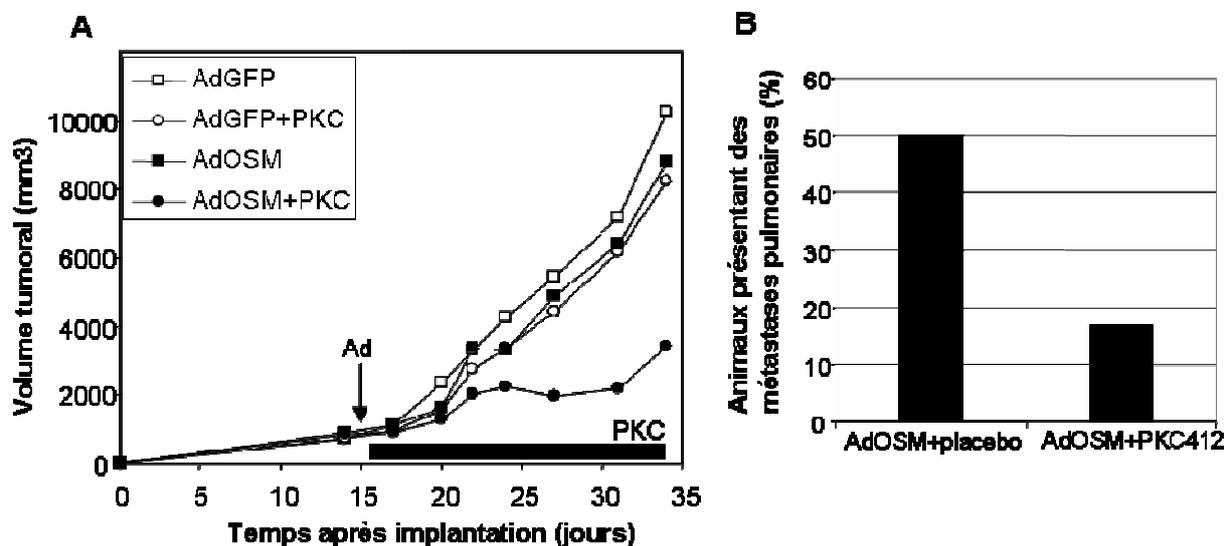


Figure 5: Progression du volume tumoral (A) et des métastases pulmonaires (B) au cours d'un traitement associant l'adénovirus-OSM et le PKC412.

On peut observer que les traitements OSM seul ou PKC412 seul n'ont aucun effet sur le volume tumoral, qui est comparable au groupe contrôle. Par contre, dans le groupe ayant reçu le traitement OSM+PKC412, la progression du volume tumoral est ralentie, les volumes tumoraux à la fin de l'expérience étant environ trois fois inférieurs à ceux mesurés dans le groupe contrôle. Par ailleurs, ce traitement n'a montré aucune toxicité particulière, hormis une perte de poids consécutive à l'injection de l'adénovirus-OSM et déjà observée.

A la fin de l'expérience, les animaux ont été sacrifiés et les poumons prélevés afin de rechercher d'éventuelles métastases. Dans le groupe traité à l'OSM seul, 50% des animaux avaient développé des métastases pulmonaires, alors que dans le groupe traité par l'association OSM+PKC412, ces métastases n'ont été détectées que chez un seul rat, soit 16,7 % (Figure 5B).

Conclusion / Discussion

Dans cette étude, nous avons tout d'abord montré que l'OSM exerçait un effet important sur la biologie de l'os dans des conditions non pathologiques. Après infection par un adénovirus-OSM dans le muscle tibial d'un animal sain, les activités phosphatase alcaline et TRAP mesurées dans le serum se sont révélées fortement réduites. Ceci est le reflet d'une activité ostéoblastique et d'une activité ostéoclastique ralenties, affectant très probablement le remodelage osseux assuré par ces deux types cellulaires. Ces effets cellulaires se traduisent par une modification de la structure osseuse, puisque différentes mesures ont montré une réduction du volume osseux trabéculaire. Le nombre de travées osseuses est réduit, alors que l'espace situé entre ces travées est augmenté. Ces observations ressemblent à celles faites dans une pathologie osseuse bien connue : l'ostéoporose. Mais dans cette maladie, la perte de masse osseuse est principalement due à un remodelage osseux trop important et à une activité accrue des ostéoclastes, ce qui ne semble pas être le cas dans notre étude, puisque l'activité TRAP est réduite par le traitement à l'OSM. Des études supplémentaires, notamment en histomorphométrie, sont maintenant nécessaires afin de confirmer la réduction du nombre d'ostéoblastes et ostéoclastes. Les effets d'une injection d'adénovirus-OSM *in vivo* dans le genou des souris ont été largement étudiés dans le cadre de pathologies inflammatoires, notamment dans la polyarthrite rhumatoïde (de Hooge et al., 2003; de Hooge et al., 2002; Langdon et al., 2000). La plupart des travaux ont montré un effet pro-inflammatoire de l'OSM associé à une destruction du cartilage et des articulations, avec induction des MMPs (Li et al., 2001) et de RANKL. Par ailleurs, De Hooge et collaborateurs (de Hooge et al., 2002) ont mis en évidence une apposition osseuse au périoste, avec stimulation de RANKL et de l'OPG par l'OSM, mais sans stimulation des ostéoclastes. Dans notre étude où l'OSM a une activité systémique, cette cytokine ne stimulerait pas non plus la résorption, contrairement à ce qui a été montré *in vitro* dans un modèle de calvaria, où l'OSM stimulait l'expression de RANKL et l'ostéoclastogénèse (Palmqvist et al., 2002). Il semble donc évident que l'OSM exerce un rôle direct sur les ostéoblastes et indirect sur les ostéoclastes, et affecte le remodelage osseux. Cependant, les effets positifs ou négatifs sur la balance apposition / résorption semble fonction du contexte inflammatoire et du site de production de l'OSM, local ou systémique. Nos travaux se sont ensuite orientés vers des situations pathologiques, utilisant le modèle d'ostéosarcome de rat OSRGA. Dans ce modèle, la tumeur se développe au contact du tibia en 7 à 10 jours, et l'adénovirus-OSM a été injecté en intra-musculaire environ 15 jours après

l'implantation. La production d'OSM, qui se traduit par une perte de poids dès les premiers jours après injection, ne semble pas modifier la progression tumorale, les volumes étant identiques à ceux du groupe contrôle. Par contre, la substance osseuse néoformée à la surface du tibia suite au développement tumoral est très différente lors d'un traitement à l'OSM, elle ne se développe pas de façon uniforme et homogène autour de l'os, mais plutôt de manière anarchique. Ainsi, la surface de cet os ectopique est augmentée par rapport aux animaux non traités, et cet effet semble incriminer une diminution d'activité ostéoblastique plutôt que l'activation des ostéoclastes. En effet, l'augmentation de la surface osseuse ectopique par l'OSM est insensible au Zol, un puissant inhibiteur des ostéoclastes utilisé notamment pour le traitement de l'ostéoporose. Ces résultats, ajoutés aux observations précédentes, indiquent que l'OSM affecte le remodelage osseux, conduisant à une structure osseuse imparfaite. Ceci est notamment visible lors du développement de tumeurs osseuses pendant lequel la prolifération cellulaire et le remodelage sont très intenses.

Dans l'optique d'une utilisation thérapeutique et aux vues des résultats obtenus lors des études *in vitro*, nous avons mis au point un protocole associant l'OSM, délivrée sous forme adénovirale, et le PKC412, analogue de la Sts utilisé *in vivo*. Avant de débiter les expérimentations animales, des études *in vitro* sur les capacités du PKC412 à induire l'apoptose en synergie avec l'OSM ont été réalisées. Celles-ci ont confirmé que le PKC412 avaient les mêmes propriétés que la Sts, à savoir une réduction de viabilité et une activation de la caspase-3, mais avec une dose optimale dix fois supérieure (1 μ M / 100nM). Une première expérience a alors été réalisée, qui n'est pas présentée ici, afin de déterminer la dose de PKC412 à utiliser. Selon les concentrations préconisées, deux doses ont été testées: 5 et 30 mg/kg. Aucune n'a montré d'effet significatif sur la progression du volume tumoral, ni de toxicité. Nous avons par conséquent choisi la plus forte de ces doses, 30 mg/kg, pour la suite des expériences. L'association OSM + PKC412 a alors été testée sur 6 rats, en comparaison d'animaux contrôles, ou traités avec l'un ou l'autre de ces deux agents. Le suivi du volume tumoral a montré une progression moins importante des tumeurs avec le traitement associant OSM et PKC412, de même qu'un nombre réduit d'animaux développant des métastases pulmonaires. Ces résultats sont très encourageants, mais sont encore très préliminaires et nécessitent de nouvelles investigations. Cette expérience est à nouveau en cours de réalisation, dans le but de confirmer les premiers résultats, et d'apporter de nouveaux éléments. Il serait intéressant d'analyser plus précisément les tumeurs, et notamment de rechercher la présence de cellules apoptotiques dans les conditions OSM+PKC412 grâce au test Tunnel. De plus, un plus grand nombre d'animaux permettrait des analyses statistiques

plus fiables. En ce qui concerne le protocole, les améliorations possibles sont assez restreintes: les doses sont déjà très importantes, et le site d'injection optimisé. Seule la séquence: infection adénovirale/ administration du PKC412 peut être modifiée. Un temps plus long entre ces deux étapes pourrait être plus efficace.

Les perspectives qu'offrent ces résultats sont multiples. La confirmation sur un modèle autre que le modèle OSRGA, comme par exemple sur le modèle d'ostéosarcome de souris POS, dont nous disposons au laboratoire, serait un élément important pour valider notre étude.

Par la suite, il serait intéressant d'associer l'OSM non plus avec le PKC412, mais avec un agent de chimiothérapie plus classique et utilisé dans le traitement des ostéosarcomes, tel que l'ifosfamide, le méthotrexate, la doxorubicine ou le cisplatine. Une étude récente a démontré que ces deux derniers agents agissent en synergie avec la protéine p53 (Ganjavi et al., 2006). En effet, l'introduction de p53 par un adénovirus dans des ostéosarcomes ayant une protéine p53 mutée et ne répondant pas correctement à la chimiothérapie a permis de les sensibiliser très fortement à la doxorubicine ou au cisplatine. On peut alors penser que ces molécules pourraient agir en synergie avec l'OSM qui active la protéine p53. Des tests *in vitro* seront tout d'abord nécessaires afin de confirmer un effet synergique et une induction d'apoptose par ces agents. Par la suite, des combinaisons pourraient être testées sur le modèle d'ostéosarcome OSRGA. L'avantage de cette thérapie serait entre autres de réduire les doses d'agent de chimiothérapie administrées, et ainsi leur forte toxicité.

Enfin, une approche différente est en cours de développement au laboratoire. Il s'agit non plus d'injecter l'OSM sous forme adénovirale dans la patte contra-latérale à la tumeur, mais d'injecter des cellules tumorales OSRGA modifiées par la technique lentivirale pour produire constitutivement de l'OSM. Cette lignée a été récemment établie au laboratoire et présente plusieurs avantages. Tout d'abord, les cellules tumorales peuvent être injectées dans la cavité médullaire du fémur, la tumeur se développe alors à partir de la moelle osseuse et non en surface de l'os, ce qui est plus proche du développement tumoral observé chez l'homme. De plus, l'OSM est produite par la tumeur directement au site tumoral, et de façon continue tout au long du traitement, alors que dans le cas d'une infection adénovirale, l'OSM n'est vraisemblablement produite que pendant une semaine. Ces expérimentations pourraient apporter de nouveaux éléments concernant le potentiel thérapeutique de l'OSM dans le traitement des ostéosarcomes.

II/ L'ostéolyse associée aux tumeurs osseuses : rôle de la triade moléculaire OPG/RANK/RANKL

Introduction

Le développement d'une tumeur osseuse telle que l'ostéosarcome affecte rapidement l'équilibre entre apposition et résorption, conduisant généralement à l'apparition de plages ostéolytiques. Ces deux phénomènes, prolifération tumorale et résorption osseuse, participent à la mise en place d'un cercle vicieux. En effet, les cellules tumorales sécrètent des facteurs solubles, tels que des cytokines et des facteurs de croissance, qui vont stimuler les cellules stromales et les ostéoblastes. Ceux-ci vont alors produire une molécule-clé dans l'activation des ostéoclastes, RANKL (RANK Ligand), capable de se lier à son récepteur RANK (Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B) présent à leur surface. L'interaction RANKL-RANK est responsable de l'activation et de la différenciation des pré-ostéoclastes en ostéoclastes matures. Ces cellules, en dégradant l'os, vont permettre le relargage de facteurs de croissance, comme le TGF β ou les BMPs, qui vont à leur tour agir sur les cellules tumorales et stimuler leur prolifération. Les conséquences de ce cercle vicieux sont donc à la fois une prolifération tumorale accrue et une destruction osseuse associée. Un axe de recherche consiste donc à bloquer cette stimulation RANKL-RANK afin d'empêcher l'activation ostéoclastique et la résorption osseuse, et ainsi "briser" le cercle vicieux. Il existe un antagoniste naturel au récepteur RANK: l'OPG (Ostéoprotégérine), récepteur soluble capable de se fixer à RANKL et d'empêcher sa liaison à RANK, faisant de l'OPG une molécule antirésorptive. Des dérégulations dans la balance OPG/RANKL ont été observées dans de nombreuses pathologies ostéolytiques, notamment dans l'ostéosarcome ou dans le développement de métastases de carcinomes prostatiques et mammaires, conduisant à une modification de la balance apposition / résorption en faveur de la destruction de l'os. Des études visant à inhiber cette résorption osseuse ont été menées en utilisant soit l'OPG, soit des constructions RANK-Fc, et sont présentées dans la revue suivante. Dans le cadre de l'utilisation de l'OSM dans la prise en charge de l'ostéosarcome, il serait intéressant de lui associer un traitement antirésorptif. Cela permettrait d'enrayer les deux versants du cercle vicieux: la prolifération tumorale (via l'OSM) et l'ostéolyse associée (via une molécule antirésorptive).

Revue II

“RANKL/RANK/OPG : nouvelles cibles thérapeutiques des tumeurs osseuses et de l’ostéolyse associée”, BBA, Mai 2004.

La découverte de la triade moléculaire OPG/RANK/RANKL a permis de mieux comprendre les mécanismes de communication entre les ostéoblastes et les ostéoclastes. L’interaction de RANKL avec son récepteur RANK joue un rôle déterminant dans l’activation des ostéoclastes et dans l’initiation de la résorption osseuse. A l’inverse, l’OPG est un récepteur soluble de RANKL capable d’inhiber la fixation de RANKL à RANK, mais également capable d’agir directement sur les cellules ostéoclastiques pour moduler leur activité. Diverses études ont montré une dérégulation du système OPG/RANK/RANKL lors de pathologies tumorales malignes associées au développement de lésions osseuses. C’est notamment le cas dans le myélome multiple, le développement de métastases osseuses secondaires à un cancer du sein ou de la prostate, ou lors de la progression de tumeurs osseuses primitives telles que les Tumeurs à Cellules Géantes (TCG) et l’ostéosarcome. Une augmentation du ratio RANKL/OPG est observée au cours de ces pathologies, stimulant l’activité ostéoclastique et favorisant ainsi l’ostéolyse.

Cette triade OPG/RANK/RANKL représente donc une cible potentielle pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques dans le traitement de pathologies ostéolytiques malignes. Des études portant sur des modèles animaux de tumeurs osseuses secondaires (métastases issues de carcinomes mammaires et prostatiques) ont montré que l’OPG ou le récepteur RANK soluble pouvait inhiber l’hypercalcémie maligne et le développement de métastases ostéolytiques. Une étude clinique en phase I utilisant l’OPG a été entreprise. Les résultats révèlent notamment que les patients atteints de myélome multiple ou de carcinome mammaire et traités par de l’OPG recombinante montrent une suppression des lésions osseuses associées au développement tumoral. La construction RANK-Fc démontre également des effets thérapeutiques prometteurs dans des modèles animaux de carcinome prostatique et de myélome multiple, avec une diminution des lésions osseuses et du volume tumoral. Cependant, quelques publications mettent en évidence l’absence d’effets de l’OPG et de RANK-Fc sur l’évolution du volume tumoral, et même, la possibilité d’une action pro-tumorale de l’OPG via l’inhibition des mécanismes d’apoptose des cellules tumorales médiés par TRAIL dans certaines pathologies malignes.

Si les bénéfices cliniques constatés sur les modèles animaux sont transposables à l'homme, l'utilisation de l'OPG et de RANK-Fc pourrait être envisagée dans le traitement de patients atteints de tumeurs osseuses pour lesquels les traitements conventionnels ont échoué. Néanmoins, le potentiel thérapeutique de ces molécules est à nuancer et leur utilisation dans le traitement de pathologies tumorales primitives telles que l'ostéosarcome nécessite une étude plus approfondie.

Review

RANKL/RANK/OPG: new therapeutic targets in bone tumours and associated osteolysis

Y. Wittrant, S. Théoleyre, C. Chipoy, M. Padrines, F. Blanchard, D. Heymann*, F. Rédini

*Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, Faculté de Médecine, INSERM ESPRI,
1 rue Gaston Veil, 44035 Nantes cedex 1, France*

Received 2 April 2004; accepted 19 May 2004
Available online 17 June 2004

Abstract

The emergence of the molecular triad osteoprotegerin (OPG)/Receptor Activator of NF- κ B (RANK)/RANK Ligand (RANKL) has helped elucidate a key signalling pathway between stromal cells and osteoclasts. The interaction between RANK and RANKL plays a critical role in promoting osteoclast differentiation and activation leading to bone resorption. OPG is a soluble decoy receptor for RANKL that blocks osteoclast formation by inhibiting RANKL binding to RANK. The OPG/RANK/RANKL system has been shown to be abnormally regulated in several malignant osteolytic pathologies such as multiple myeloma [MM, where enhanced RANKL expression (directly by tumour cells or indirectly by stromal bone cells or T-lymphocytes)] plays an important role in associated bone destruction. By contrast, production of its endogenous counteracting decoy receptor OPG is either inhibited or too low to compensate for the increase in RANKL production. Therefore, targeting the OPG/RANK/RANKL axis may offer a novel therapeutic approach to malignant osteolytic pathologies. In animal models, OPG or soluble RANK was shown both to control hypercalcaemia of malignancy and the establishment and progression of osteolytic metastases caused by various malignant tumours. To this day, only one phase I study has been performed using a recombinant OPG construct that suppressed bone resorption in patients with multiple myeloma or breast carcinoma with radiologically confirmed bone lesions. RANK-Fc also exhibits promising therapeutic effects, as revealed in animal models of prostate cancer and multiple myeloma. If the animal results translate to similar clinical benefits in humans, using RANK-Fc or OPG may yield novel and potent strategies for treating patients with established or imminent malignant bone diseases and where standard therapeutic regimens have failed.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: RANK; OPG; Tumour

Contents

1. Introduction	50
1.1. Involvement of RANKL/OPG in malignant bone diseases	50
1.1.1. Myeloma	51
1.1.2. Skeletal metastases	52
1.1.3. Giant cell tumour of bone (GCT)	52
1.2. The vicious cycle	53
1.3. New therapeutic strategies based on OPG or RANK-Fc use	54
1.3.1. Therapeutic applications of OPG	54
1.3.2. Therapeutic applications of RANK-Fc	54

* Corresponding author. Tel.: +33-2-40-41-28-45; fax: +33-2-40-41-28-60.
E-mail address: dominique.heyman@sante.univ-nantes.fr (D. Heymann).

2. Conclusion	55
Acknowledgements	55
References	56

1. Introduction

The invasion of bone tissue by a benign or malignant tumour, primary or secondary, rapidly affects the balance between bone resorption and apposition. In some rare cases, tumour development leads to osteoformation without osteolysis, as in some forms of osteosarcoma or osteoblastic metastasis predominating in patients with prostatic adenocarcinoma. In most cases, the skeletal manifestation of malignancy is focal osteolysis. This imbalance in favour of bone resorption can result from the acquisition of new cellular properties by bone cells: increase in the proteolytic activity, alteration in local or humoral factors expression. One hypothesis is that genomic instability of tumour cells (bone metastases, bone sarcoma, giant cell tumours) might cause mutations that affect critical cellular properties. Another hypothesis is the building of an environment favouring bone resorption (essential cyst) [1]. Whatever the causes and the mechanisms, tumour-induced osteolysis is responsible for high morbidity. Severe bone pain remains the first symptom, as revealed in the majority of benign tumours and in 60% to 70% of bone metastases, pathological fractures, nerve compression syndromes (paralysis) and profound hypercalcaemia (in secondary tumours only). Osteolysis must occur before tumour cells can grow and invade the mineralised bone. Although *in vitro* studies demonstrated that breast cancer cells can directly resorb bone [2], the majority of evidence shows that the primary mechanism responsible for bone destruction in patients with cancer is tumour-mediated stimulation of osteoclastic bone resorption. Osteoclasts appear to be the primary bone-resorbing cells both in normal and pathological states. Increased osteoclastic bone resorption results from both increased osteoclast generation and induction of pre-existing osteoclast to resorb bone. Tumour products can either stimulate osteoclast formation locally in the bone microenvironment or systemically through production of hormones such as parathyroid hormone-related protein (PTH-rP), the mediator of the humoral hypercalcaemia of malignancy. Other factors produced by tumour cells that can stimulate osteoclastic bone resorption include interleukin-1 (IL-1), IL-6, tumour necrosis factor- α (TNF- α) and macrophage inflammatory protein-1- α (MIP-1 α) [3]. These agents, released into the bone microenvironment, act on osteoblastic stromal cells to enhance the production of osteoclast activating factors. Most notable of these is Receptor Activator of NF- κ B Ligand (RANKL), which is a recent addition to the TNF gene family. Ample data from the literature highlight the

critical role of RANKL in mediating tumour-induced bone destruction, in both primary and secondary bone tumours. Therefore, the development of therapeutic agents disrupting the interactions of RANKL and its cognate receptor RANK represents promising new options for the treatment of patients with primary and secondary bone tumours.

1.1. Involvement of RANKL/OPG in malignant bone diseases

RANKL is a potent osteoclastogenic factor that, in combination with macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), induces osteoclast formation *in vitro*. RANKL is expressed as a membrane-bound protein on the surface of osteoblasts, osteocytes and marrow stromal cells [4]. In addition, activated T cells secrete RANKL as a soluble molecule [5]. Furthermore, most osteotropic factors such as IL-1, IL-11, prostaglandin E₂ and 1,25-(OH)₂D₃ induce osteoclast formation by binding to marrow stromal cells, which in turn express increased levels of soluble or membrane forms of RANKL. RANKL then binds to its receptor RANK, present at the surface of osteoclast precursors and mature osteoclasts, inducing osteoclast formation and activation [6]. RANKL activity can be blocked by the soluble decoy receptor osteoprotegerin (OPG), resulting in prevention of bone resorption [7]. OPG, a recently described member of the TNF receptor superfamily, is produced by a lot of cell types, such as bone-marrow stromal cells and osteoblasts, and blocks the fusion/differentiation stage of osteoclast precursors, rather than the proliferation stage, by binding to RANKL. Thus, the RANKL/RANK/OPG system produced by the bone microenvironment represents important and final cytokines of osteoclast biology, the ratio RANKL to OPG regulating in fine the orientation to bone formation or bone resorption. In the case of tumour-associated osteolysis, several studies have implicated the cytokines RANKL and OPG as essential regulators of tumour–bone interactions (osteolytic bone metastases, humoral hypercalcaemia of malignancy) [8].

Modulation of RANKL and OPG expression has been reported in several bone tumours where osteolysis occurs (Table 1). In a prospective immunohistochemical study, Good et al. [9] demonstrated that primary benign and malignant bone tumours and metastasis were positive for RANKL (13 cases of 16). More recently, Grimaud et al. [10] demonstrated by RT-PCR and ELISA that the RANKL/OPG ratio was significantly increased in patients suffering from severe tumour-associated osteolysis compared to healthy

Table 1
Malignant metabolic bone diseases with involvement of the RANKL/OPG system

Pathology	References
• Expression of RANKL by bone tumors	[9]
• RANKL/OPG ratio is increased in severe osteolysis	[10]
• RANKL/OPG expression in multiple myeloma	[12–15]
• Disturbance in the OPG/RANKL balance in the bone marrow environment of myeloma cells	[11,16,17]
• OPG in serum of patients with multiple myeloma	[18,19]
• OPG may be a survival factor for human myeloma cells	[33]
• RANKL/OPG ratio as a novel prognostic index in multiple myeloma	[21]
• RANKL in adult T-cell leukaemia cells	[22]
• RANKL expression in skeletal metastases	[23]
• OPG and RANKL expression in the management of patients with skeletal metastases	[24]
• RANKL expression by stromal cells in breast cancer	[25]
• RANKL/OPG in breast cancer metastases	[26]
• RANKL expressed by prostate cancer skeletal metastases	[27,46]
• RANKL expressed by carcinoma cell lines	[47]
• RANKL expressed in human neuroblastoma	[48]
• OPG in human prostate cancer	[30]
• RANKL in cancer-associated osteolytic lesions	[25]
• RANKL/OPG in Giant Cell Tumor	[34–36]
• RANKL expression in chondroblastoma	[37]
• RANKL in hypercalcemia	[47]

tissues. Moreover, in the same study, RANKL expression was demonstrated immunohistochemically in primary malignant bone tumours (osteosarcoma and chondrosarcoma) and in Giant Cell Tumor (Fig. 1). OPG was shown to co-localize with RANKL, suggesting that OPG expression may reflect a homeostatic mechanism of the skeleton to counterbalance the increased bone resorption.

1.1.1. Myeloma

The OPG/RANKL system has been widely studied in multiple myeloma-induced osteolysis. Multiple myeloma (MM) is a plasma cell malignancy that develops in the bone marrow and characterized by the development of osteolytic bone lesions associated with bone pain, hypercalcemia and pathological fractures. Three cell types are involved in this pathology: myeloma cells, bone marrow stromal cells and osteoclasts. Several data from the literature have reported that myeloma cells are able to induce an imbalance in the OPG/RANKL system in bone environment, and that this is responsible for osteolysis observed in patients. Immunohistochemical staining of bone marrow biopsies from patients with MM shows an increase of RANKL and a reduction of OPG expression [11]. Roux et al. [12] reported that RANKL is overexpressed in stromal cells at the interface of MM with normal bone marrow elements. However, there is controversy as to whether myeloma cells directly express RANKL [11–17]. In addition to increasing RANKL expression, MM-infiltrated bone marrow exhibits decreased production of the natural RANKL inhibitor OPG. Serum OPG levels were shown to be reduced in patients with multiple myelo-

ma with lytic bone disease [18,19]. Two mechanisms are involved in this process. First, cell-to-cell contacts between myeloma cells, bone marrow stromal cells and osteoblasts inhibit OPG expression and production by stromal cells, as evidenced by co-culture experiments [11,16]. Second, syndecan-1, a transmembrane proteoglycan that is highly expressed at the surface of myeloma cells, binds and sequesters OPG through interaction with the heparin-binding domain of the OPG protein [20]. OPG is thereby internalised and degraded within the lysosomal compartment of myeloma cells. Thus, inhibition of OPG production

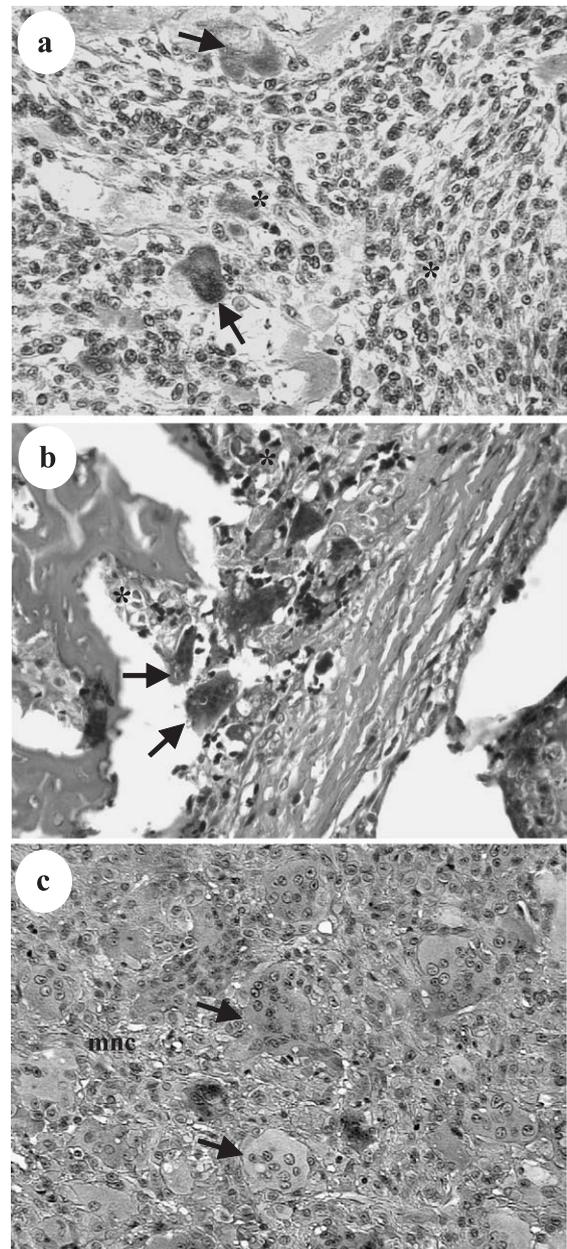


Fig. 1. Osteolysis associated with primary bone tumours. Osteosarcoma (a: human, b: rat): intense remodelling activity (arrows: osteoclasts) on tumour tissue contact (star); (c) GCT: multinucleated osteoclast-like giant cells (arrows) and mononucleated cells (mnc). Original magnification, $\times 40$.

by myeloma cells, both at transcriptional and posttranslational levels, is associated with increased expression of RANKL in MM and disrupts the RANKL/OPG ratio in favour of the osteoclastogenesis factor RANKL. In a recent study, Terpos et al. [21] demonstrate that the RANKL/OPG ratio is increased in MM and correlates with markers of bone resorption, osteolytic lesions and markers of disease activity, thus confirming for the first time in humans the importance of RANKL/OPG in the development of bone disease. The authors therefore propose soluble RANKL/OPG ratio as a predictive survival index in multiple myeloma. In another hematologic malignancy, adult T-cell leukaemia cells from patients with hypercalcaemia strongly expressed the transcripts of the RANKL gene and induced in vitro the differentiation of human hematopoietic precursor cells into osteoclasts in the presence of M-CSF [22]. Direct contact between adult T-leukaemia cells and hematopoietic precursor cells was essential for the differentiation, suggesting that T-leukaemia cells induce the differentiation of hematopoietic precursor cells to osteoclasts through RANKL expressed on their surface.

1.1.2. Skeletal metastases

RANKL involvement is also demonstrated in the case of skeletal metastases secondary to breast and prostate carcinoma. Indeed, the development of osteolytic bone metastases and humoral hypercalcaemia of malignancy are frequent clinical complications of breast and prostate carcinoma, and both disorders involve an excessive activation of osteoclast via the RANKL-RANK interaction. Huang et al. [23] have investigated the expression of RANKL by in situ hybridisation and immunohistochemistry in the skeletal lesions of 16 patients with carcinomas that had metastasised to the bone. Both RANKL mRNA and protein were present in more than 90% of metastatic tumour cells in adenocarcinoma lesions (from breast, prostate, lung or thyroid origin). With regard to the measurement of soluble RANKL, few studies have measured this ligand in the circulation of patients with malignant disease [24], although there is abundant evidence that RANKL mRNA is expressed in cells derived from the breast cancer stroma [25]. Results from this study and others suggest that the RANKL/OPG ratio is variable depending on the phenotype of the prostate cancer cells [26,27]. Other studies have reported that prostate cancer cells were shown to produce both OPG and RANKL, enabling then to influence bone metabolism through inhibition (OPG) and stimulation (RANKL) of osteoclastogenesis [28–30]. Immunohistochemical studies suggest that both OPG and RANKL are present in vivo in prostatic cancers, with higher levels of OPG detected in bone metastases than in primary tumours and metastases from non-osseous sites [29]. Few studies have determined OPG levels in patients with metastatic disease to the bone. In a recent study from Lipton et al. [19], the serum OPG levels were measured in patients with solid tumours and metastatic diseases. The results showed that, although some patients have significant levels of circulating OPG, these

concentrations do not approach the level that would be expected to counterbalance the elevated RANKL production, thus suppressing osteoclast function. Jung et al. [31] examined the serum level of OPG, in relation with the tumor dissemination, in patients with prostate cancer. These authors showed that increased serum OPG is a marker of bone metastatic spread in prostate cancer patients. The same team recently studied the behaviour and diagnostic usefulness of RANKL and OPG in the serum of patients with prostate cancer [32]. While OPG was increased in patients with bone metastases, as previously demonstrated, RANKL levels did not differ among the control and prostate cancer groups. In this case, serum OPG but not RANKL indicates disrupted osteoclastogenesis in patients with prostate cancer and bone metastatic spread and could be used as a marker for bone metastases. Thus, the OPG/RANKL ratio showed behaviour similar to that of OPG.

OPG further affects cancer cells, suppressing TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand)-induced tumour cell apoptosis by binding to TRAIL. This was demonstrated with conditioned medium from co-cultures of MG63 cells with myeloma cells, which had a reduced effect on TRAIL-induced apoptosis, reflecting the decreased concentrations of OPG in co-cultures of myeloma cells with bone cells [33]. From these experiments, OPG may be considered as a survival factor for myeloma cells. The same results and conclusions were reported in Holen's study using prostate cancer cells: a strong negative correlation was observed between levels of endogenously produced OPG in the medium and the capacity of TRAIL to induce apoptosis in cells that produced high levels of OPG [30]. In relation with this activity, it has been hypothesized that the ability to produce OPG by cancer cells would confer them a survival advantage.

1.1.3. Giant cell tumour of bone (GCT)

RANKL/OPG involvement in bone tumours has also been demonstrated in GCT of bone, a rare primary osteolytic tumour characterized by massive bone destruction at the epiphysis of long bones. Histologically, it is characterized by a large number of multinucleated giant cells, macrophage-like and stromal-like mononuclear cells. There is no evidence that tumour cells themselves are capable of bone destruction. It appears instead that the tumour cells of GCT act by promoting osteoclastogenesis. However, the expression of OPG, RANK and RANKL seems to be cell type-dependent in GCT [34,35]. The ratio of RANKL and OPG gene expression in tumour cells may thus determine local osteoclastogenesis. Concurrently, the study of Miyamoto et al. [36] confirms that spindle-shaped stromal cells secrete a soluble factor that could be soluble RANKL, which supports osteoclast-like cell formation in GCT. RANKL was also shown to be expressed in chondroblastoma, where its involvement in osteoclastic giant cell recruitment had been suggested [37].

Altogether, data from the literature highlight the RANKL/OPG ratio's important role in malignant bone

diseases. Normal stromal cells maintain the stable RANKL/OPG ratio that is required for normal bone remodelling. Stromal cells derived from GCT overexpress RANKL, which results in an increased RANKL/OPG ratio, which in turn results in an excessive development of large multinucleated osteoclasts. Myeloma and some forms of breast carcinoma produce PTH-rP which induces RANKL and inhibits OPG production, thus resulting in an increased RANKL-to-OPG ratio that favours osteolysis and humoral hypercalcaemia of malignancy. By contrast, decreased or non-modified RANKL and increased OPG production in prostate carcinoma result in a reduced RANKL/OPG ratio and may favour an osteoblastic tumour growth pattern.

1.2. The vicious cycle

Histological analysis of osteolytic bone metastases indicates that the bone destruction is mediated by the osteoclasts rather than directly by tumour cells. The interaction between tumour cells, tumour-derived humoral factors and the bone marrow microenvironment is crucial for the initiation and promotion of skeletal malignancies. These observations suggest a vicious cycle driving the formation of osteolytic

bone tumours [38,39] (Fig. 2): tumour cells secrete soluble factors in bone (such as hormones, cytokines and growth factors), among them PTH-rP, which stimulates osteoclastic bone resorption through indirect RANKL production by osteoblastic stromal cells [40–45]. However, other data showed that tumour cells can produce themselves RANKL, acting directly on osteoclast differentiation and activation, as reported in multiple myeloma [14], prostate cancer [46], carcinoma cell lines [47] or human neuroblastoma [48]. RANKL expressed by stromal cells or directly by cancer cells can then bind to its cognate receptor RANK at the surface of osteoclast precursors and, in the presence of M-CSF, enhances the differentiation and fusion of these cells to produce functional multinucleated osteoclasts. Osteoclastic resorption in turn releases growth factors from the bone matrix, which can activate the tumour cells. In particular, Transforming growth factor-beta (TGF-β) is abundant in bone matrix and released as a consequence of osteoclastic bone resorption [49]. In addition to its rich stores of TGF-β, bone contains other growth regulatory factors that may act as tumour growth factors, including bone morphogenetic proteins (BMP), heparin-binding fibroblast growth factors, and insulin-like growth factor I [50]. In this model, RANKL has

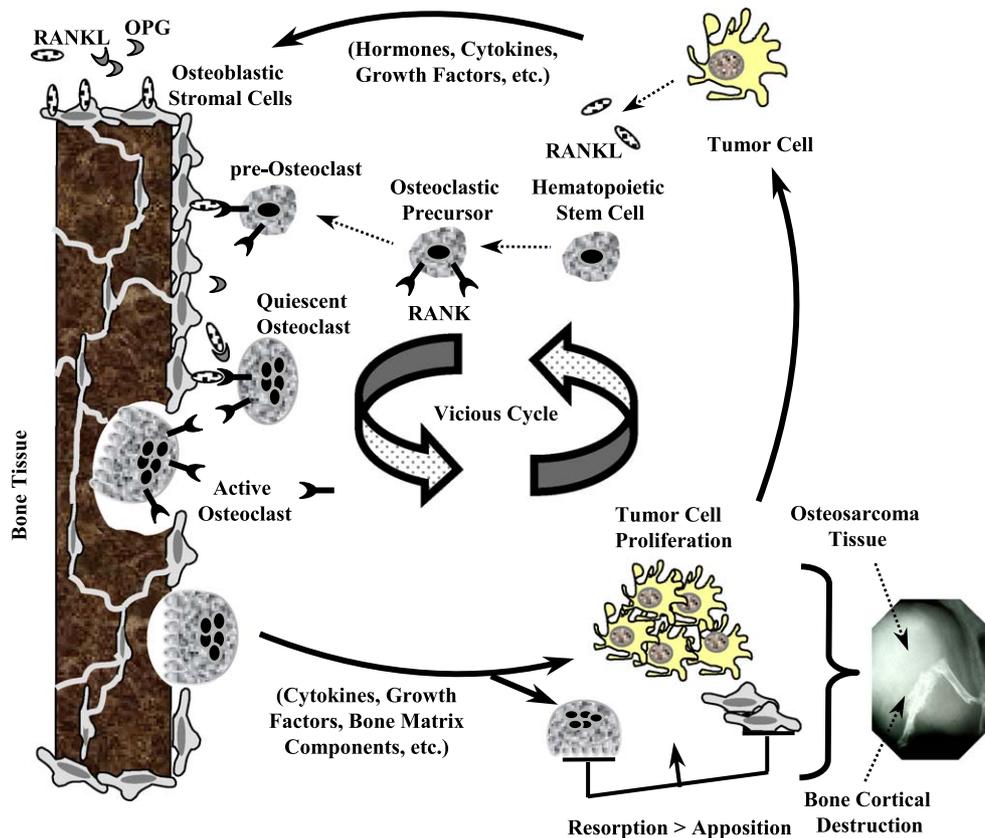


Fig. 2. Schematic representation of the tumour cell proliferation and osteolysis vicious cycle. Tumour cells may release soluble mediators such as cytokines, growth factors that act on osteoblastic stromal cells. The stromal cells produce RANKL, which binds to its cognate receptor RANK expressed on osteoclast precursors, enhancing the formation of active osteoclasts that carry out bone resorption. Occasionally, tumour cells have also been reported to directly release a soluble form of RANKL. Active osteoclasts then release growth factors, cytokines or bone matrix components stored in the bone matrix that in turn activate tumour cell proliferation. The vicious cycle thus induces both tumour cell proliferation and bone resorption.

been described as the final effector of osteoclastogenesis. The consequences of this vicious cycle are an increased tumour cell proliferation paralleled with an imbalance of bone formation/bone resorption ratio in favour of bone destruction. An experimental model of rat transplantable osteosarcoma [51] allows extending the “seed and soil” hypothesis to primary bone tumours, as development of local osteosarcoma tissue together with enhanced bone cortical destruction adjacent to the tumour can be observed in this model (Fig. 2).

1.3. New therapeutic strategies based on OPG or RANK-Fc use

Osteolysis and tumour cell accumulation can be interrupted by inhibiting any of the vicious cycle’s member, including specifically neutralizing antibodies to PTH-rP and more effective osteoclast inhibitors. Advances in osteoclast biology and pathophysiology have helped towards defining putative therapeutic targets to attack tumour-induced osteolysis. Potential therapeutic agents are being studied, including RANKL antagonists (Table 2). Based on the studies of Simonet et al. [7] and Yasuda et al. [52], OPG has unambiguously been confirmed to act as a potent anti-resorptive molecule *in vivo*. Therefore, as the majority of malignant bone diseases are characterized by enhanced bone resorption due to increased osteoclastic number and/or activity, it has been hypothesized that OPG also would be beneficial for treating animals with experimentally induced malignant bone diseases (Table 2). OPG was first shown to exhibit hypocalcaemic effects in normal mice and in hypercalcaemic nude mice carrying tumors associated with humoral hypercalcaemia of malignancy [53]. OPG was then studied for its activity in a syngeneic tumour model of humoral hypercalcaemia of malignancy. It was shown to block tumour-induced increase in bone resorption and hypercalcaemia and

to reduce osteoclast activity. However, it had no effect on tumour size, tumour-induced cachexia or PTH-rP levels [54].

1.3.1. Therapeutic applications of OPG

In myeloma bone disease, OPG-Fc prevents the development of osteolytic bone lesions in 5T2 and 5T33 multiple myeloma bearing animals [14,56,57]. These changes are associated with a preservation of the cancellous bone loss induced by myeloma cells and an inhibition of osteoclast formation. In an animal model of prostate cancer (CaP), CaP cells were injected both intratibially and subcutaneously in the same mice, followed by administration of OPG [46]. OPG completely prevented the establishment of mixed osteolytic/osteoblastic tibial tumours, but it had no effect on subcutaneous tumour growth. The same conclusions were reported by Yonou et al. [58], indicating that human recombinant OPG decreased the CaP prostate burden selectively in bone, suppressed the progression of established tumour lesions and prevented the development of new lesions. Honore et al. [59] showed that OPG blocked bone cancer-induced skeletal destruction, skeletal pain and pain-related neurochemical reorganization of the spinal cord. One year later, the same team demonstrated that administration of OPG halted further bone destruction, reduced ongoing and movement-evoked pain and reversed several aspects of the neurochemical reorganization of the spinal cord in a mouse model of osteolytic 2472 sarcoma cells injected into the intramedullary space of the femur [60]. In the case of GCT, which represents a paradigm for the direct stimulation of osteoclast formation and activity by tumour stromal cells, *in vitro* OPG treatment potently and dose-dependently inhibited resorption of bone slices by GCT and could also inhibit the formation of multinucleated osteoclasts from precursors within the GCT [61]. To date, a single study has been reported in patients with osteolytic bone tumours: a randomised, double-blind, double-dummy, active-controlled, single dose, dose escalation study was conducted to determine the safety and effect on bone resorption of recombinant OPG in patients with multiple myeloma or breast carcinoma with radiologically confirmed lytic bone lesions [62]. The results showed that a single dose of recombinant OPG suppressed bone resorption as indicated by a rapid, sustained and profound decrease of urinary NTX/creatinine in multiple myeloma and breast cancer patients, and that recombinant OPG was well tolerated.

1.3.2. Therapeutic applications of RANK-Fc

As reported previously in the case of prostate cancer and multiple myeloma [30,33] but also in Jurkat cells [63], OPG prevents TRAIL-mediated apoptosis of tumour cells. It could be therefore hypothesized that the clinical use of OPG may prevent TRAIL-mediated apoptosis of tumour cells. Thus, methods for blocking RANKL activity, other than OPG, may be important. For this purpose, soluble RANK-Fc was used in a model of prostate cancer and was shown to diminish tumour-induced osteoblastic lesions, and

Table 2
Therapeutic strategies based on OPG/RANK/RANKL triad

Pathology	References
• OPG prevents and reverses hypercalcaemia malignancy	[53,54]
• Inhibition of osteoclastogenesis and tumor growth in osteopetrotic mice by OPG	[55]
• OPG inhibits osteolysis in multiple myeloma and increases survival in a murine model	[56,57]
• OPG inhibits human prostate cancer burden in bone in an immunodeficient mice model	[58]
• Serum OPG as a marker of bone metastatic spread in prostate cancer	[31]
• OPG inhibits osteoclastogenesis and prevents prostate tumor growth	[46]
• Single dose OPG in patients with bone metastases from multiple myeloma	[62]
• Inhibition of cancer-induced skeletal destruction by OPG	[59]
• OPG diminishes advanced bone cancer pain	[60]
• RANK-Fc: a therapeutic antagonist for RANKL in myeloma	[65,66]
• sRANK-Fc diminishes tumor volume in prostate cancer	[64]

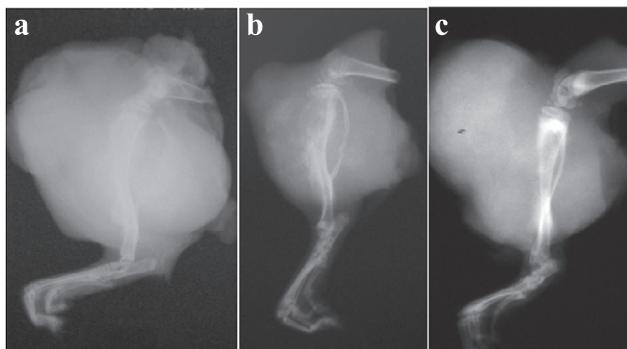


Fig. 3. Radiographs of osteosarcoma-bearing Sprague–Dawley rats, treated or not with adeno (Ad)-RANK-Ig. Osteosarcoma tumours were implanted contiguous to the tibia of male Sprague–Dawley rats on day 0. Eighteen days after, the rats were injected in an intra-portals situation with empty adenovirus (b) or with Ad-RANK-Ig (c), and compared to controls (a). Note the intense bone apposition at the metaphysis of long bones in Ad-RANK-Ig treated rats (c).

decreased serum prostate-specific antigen levels and tumour volume in the bone [64]. In myeloma, a recent study from Sordillo and Pearce [65] reported that administration of RANK-Fc caused a marked reduction in tumour burden and serum paraprotein in the severe combined immunodeficiency (SCID)-hu-MM mouse model of human MM. This was associated to limited bone destruction, restoration of OPG and reduction in RANK-L expression in the xenograft. In another recent study, Oyajobi and Mundy [66] tested the effectiveness of antagonists of RANKL and MIP-1alpha bioactivities (RANK-Fc and neutralizing monoclonal anti-MIP-1alpha antibody) on osteolysis and tumour burden in a mouse model in which murine myeloma 5TGM1 cells are injected intravenously into syngeneic mice. The results demonstrated that RANK-Fc and anti-MIP-1alpha antibody inhibited the development and progression of osteolytic lesions and significantly reduced tumour load assessed by serum monoclonal paraprotein titers. In a model of rat transplantable osteosarcoma, we developed new therapeutic approaches of primary bone tumours, and among them RANK-Fc delivery by gene therapy. The animals treated with the RANK-Fc construct exhibit higher bone apposition at the metaphysis of long bones, as shown by radiological analyses (Fig. 3c), than controls treated with empty adenovirus (Fig. 3a and b: tumour controls). In this case, RANK-Fc inhibits the tumour induced-osteolysis but is not sufficient to decrease the tumour burden. In a therapeutic approach, RANK-Fc may be associated with anti-tumour drugs to stop both the tumour proliferation and the tumour-associated osteolysis. Overall, these studies demonstrate the effectiveness of RANK-Fc in inhibiting bone resorption in different models of malignant osteolytic pathologies and the upside of using RANK-Fc, which cannot interfere with TRAIL-mediated cancer cell apoptosis. Another approach lies in using novel OPG-like peptidomimetics that restore bone loss *in vivo* by facilitating a defective RANKL–RANK receptor complex,

thus modulating RANK–RANKL signalling pathways and altering the biological functions of RANKL–RANK receptor complex [67]. Therefore, these OPG derived small molecules can be used to develop more useful therapeutic agents in bone diseases.

2. Conclusion

Skeletal complications of malignancies are catastrophic clinical events. Understanding the molecular mechanisms responsible for osteoclast activation in osteolytic primary and secondary bone tumours should lead to development of novel therapeutic approaches for these highly morbid and potentially fatal pathologies. Several factors, including IL-1, IL-6, PTH-rP, RANK Ligand and MIP-1alpha, have been involved in mediating the enhanced osteoclast formation and bone destruction in patients with neoplasia. The discovery and characterization of the RANKL/RANK/OPG system has implicated RANKL and OPG as important and final mediators of deregulated bone resorption, a characteristic feature of osteolytic bone metastases and humoral hypercalcemia of malignancy. Enhanced RANKL expression plays an important role in bone destruction in patients with myeloma. RANKL is either produced directly by tumour cells or its production (by stromal bone cells or T-lymphocytes) is induced indirectly by tumour cells through secretion of PTH-rP and other cytokines. By contrast, production of the endogenous counteracting decoy receptor OPG is either inhibited or inappropriately low to compensate for the increase in RANKL.

In animal models, OPG or soluble RANK is able to control humoral hypercalcaemia of malignancy effectively, as well as the establishment and progression of osteolytic metastases caused by various malignant tumours, and to prevent cancer-induced skeletal pain and bone loss associated with immobilization. A first study assessing the beneficial effects of OPG in human multiple myeloma has been performed and reported, showing that the *in vitro* effects of OPG can be extrapolated to the *in vivo* setting in MM patients. Beyond OPG, RANK-Fc exhibits promising therapeutic effects, as shown in animal models of prostate cancer and multiple myeloma. If the animal data translate into a similar clinical benefit in humans, RANK-Fc together with OPG may become novel potent strategies to treat patients with established or imminent malignant bone diseases in whom standard therapeutic regimens have failed.

Acknowledgements

This work was supported by a CReS INSERM, No. 4CR06F, by a grant from the French Ministry of Research and Technology (TS/02 2 0044) and by a grant from the Loire-Atlantique Committee of the Ligue Contre le Cancer. S. Théoleyre and Y. Wittrant received fellowships, respec-

tively, from the Loire-Atlantique Committee of the Ligue Contre le Cancer and from the Région des Pays de Loire.

References

- [1] M.H. Weber, D. Goltzman, P. Kostenuik, S. Rabbani, G. Singh, W.C. Duivenvoorden, F.W. Orr, Mechanisms of tumor metastasis to bone, *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 10 (2000) 281–302.
- [2] G. Eilon, G.R. Mundy, Direct resorption of bone by human breast cancer cells in vitro, *Nature* 276 (1978) 726–728.
- [3] T.A. Guise, G.R. Mundy, Cancer and bone, *Endocr. Rev.* 19 (1998) 18–54.
- [4] D.L. Lacey, E. Timms, H.L. Tan, M.J. Kelley, C.R. Dunstan, T.L. Burgess, R. Elliott, A. Colombero, G. Elliott, S. Scully, H. Hsu, J. Sullivan, H. Hawkins, E. Davy, C. Capparelli, A. Eli, Y.X. Qian, S. Kaufman, I. Sarosi, V. Shalhoub, G. Senaldi, J. Guo, J. Boyle, W.J. Boyle, Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation, *Cell* 93 (1998) 165–176.
- [5] Y.Y. Kong, U. Feige, I. Sarosi, B. Bolon, A. Tafuri, S. Morony, C. Capparelli, J. Li, R. Elliott, S. McCabe, T. Wong, G. Campagnuolo, E. Moran, E.R. Bogoch, G. Van, L.T. Nguyen, P.S. Ohashi, D.L. Lacey, E. Fish, W.J. Boyle, J.M. Penninger, Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand, *Nature* 402 (1999) 304–309.
- [6] N. Nakagawa, M. Kinoshita, K. Yamaguchi, N. Shima, H. Yasuda, K. Yano, T. Morinaga, K. Higashio, RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253 (1998) 395–400.
- [7] W.S. Simonet, D.L. Lacey, C.R. Dunstan, M. Kelley, M.S. Chang, R. Luthy, H.Q. Nguyen, S. Wooden, L. Bennett, T. Boone, G. Shimamoto, M. DeRose, R. Elliott, A. Colombero, H.L. Tan, G. Trail, J. Sullivan, E. Davy, N. Bucay, L. Renshaw-Gegg, T.M. Hughes, D. Hill, W. Pattison, P. Campbell, S. Sander, G. Van, J. Tarpley, P. Derby, R. Lee, W.J. Boyle, Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density, *Cell* 89 (1997) 309–319.
- [8] E. Grimaud, F. Rédini, D. Heymann, Osteoprotegerin: a new therapeutic agent for the treatment of bone disease, *Drug Discov. Today* 6 (2001) 1241–1242.
- [9] C.R. Good, R.J. O’Keefe, J.E. Puzas, E.M. Schwarz, R.N. Rosier, Immunohistochemical study of receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANK-L) in human osteolytic bone tumors, *J. Surg. Oncol.* 79 (2002) 174–179.
- [10] E. Grimaud, L. Soubigou, S. Couillaud, P. Coipeau, A. Moreau, N. Passuti, F. Gouin, F. Rédini, D. Heymann, Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL)/osteoprotegerin (OPG) ratio is increased in severe osteolysis, *Am. J. Pathol.* 163 (2003) 2021–2031.
- [11] N. Giuliani, R. Bataille, C. Mancini, M. Lazzaretti, S. Barillé, Myeloma cells induce imbalance in the osteoprotegerin/osteoprotegerin ligand system in the human bone marrow environment, *Blood* 98 (2001) 3527–3533.
- [12] S. Roux, V. Meignin, J. Quillard, G. Meduri, A. Guiochon-Mantel, J.P. Feraud, E. Milgrom, X. Mariette, RANK (receptor activator of nuclear factor-kappaB) and RANKL expression in multiple myeloma, *Br. J. Haematol.* 117 (2002) 86–92.
- [13] A.N. Farrugia, G.J. Atkins, L.B. To, B. Pan, N. Horvath, P. Kostakis, D.M. Findlay, P. Bardy, A.C. Zannettino, Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand expression by human myeloma cells mediates osteoclast formation in vitro and correlates with bone destruction in vivo, *Cancer Res.* 63 (2003) 5438–5445.
- [14] P.I. Croucher, C.M. Shipman, J. Lippitt, M. Perry, K. Asosingh, A. Hijzen, A.C. Brabbs, E.J. van Beek, I. Holen, T.M. Skerry, C.R. Dunstan, G.R. Russell, B. Van Camp, K. Vanderkerken, Osteoprotegerin inhibits the development of osteolytic bone disease in multiple myeloma, *Blood* 98 (2001) 3534–3540.
- [15] O. Sezer, U. Heider, C. Jakob, J. Eucker, K. Possinger, Human bone marrow myeloma cells express RANKL, *J. Clin. Oncol.* 20 (2002) 353–354.
- [16] R.N. Pearce, E.M. Sordillo, S. Yaccoby, B.R. Wong, D.F. Liao, N. Colman, J. Michaeli, J. Epstein, Y. Choi, Multiple myeloma disrupts the TRANCE/osteoprotegerin cytokine axis to trigger bone destruction and promote tumor progression, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 11581–11586.
- [17] N. Giuliani, S. Colla, R. Sala, M. Moroni, M. Lazzaretti, S. La Monica, S. Bonomini, M. Hojden, G. Sammarelli, S. Barillé, R. Bataille, V. Rizzoli, Human myeloma cells stimulate the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) in T lymphocytes: a potential role in multiple myeloma bone disease, *Blood* 100 (2002) 4615–4621.
- [18] C. Seidel, O. Hjertner, N. Abildgaard, L. Heickendorff, M. Hjorth, J. Nielsen, J.S. Nielsen, H. Hjorth-Hansen, A. Waage, A. Sundan, M. Borset, Serum osteoprotegerin levels are reduced in patients with multiple myeloma with lytic bone disease, *Blood* 98 (2001) 2269–2271.
- [19] A. Lipton, S.M. Ali, K. Leitzel, V. Chinchilli, L. Witters, L. Engle, D. Holloway, P. Bekker, C.R. Dunstan, Serum osteoprotegerin levels in healthy controls and cancer patients, *Clin. Cancer Res.* 8 (2002) 2306–2310.
- [20] T. Standal, C. Seidel, O. Hjertner, T. Plesner, R.D. Sanderson, A. Waage, M. Borset, A. Sundan, Osteoprotegerin is bound, internalised and degraded by multiple myeloma cells, *Blood* 100 (2002) 3002–3007.
- [21] E. Terpos, R. Szydlo, J.F. Apperley, E. Hatjiharissi, M. Politou, J. Meletis, N. Viniou, X. Yataganas, J.M. Goldman, A. Rahemtulla, Soluble receptor activator of nuclear factor kappaB ligand-osteoprotegerin ratio predicts survival in multiple myeloma: proposal for a novel prognostic index, *Blood* 102 (2003) 1064–1069.
- [22] K. Nosaka, T. Miyamoto, T. Sakai, H. Mitsuya, T. Suda, M. Matsuoka, Mechanism of hypercalcemia in adult T-cell leukemia: overexpression of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand on adult T-cell leukemia cells, *Blood* 99 (2002) 634–640.
- [23] L. Huang, Y.Y. Cheng, L.T.C. Chow, M.H. Zheng, S.M. Kumta, Tumour cells produce receptor activator of NF-kB ligand (RANKL) in skeletal metastases, *J. Clin. Pathol.* 55 (2002) 877–878.
- [24] L.M. Demers, Bone markers in the management of patients with skeletal metastases, *Cancer* 97 (2003) 874–879.
- [25] S. Kitazawa, R. Kitazawa, RANK ligand is a prerequisite for cancer-associated osteolytic lesions, *J. Pathol.* 198 (2002) 228–236.
- [26] H.R. Park, S.K. Min, H.D. Cho, D.H. Kim, H.S. Shin, Y.E. Park, Expression of osteoprotegerin and RANK ligand in breast cancer bone metastasis, *J. Korean Med. Sci.* 18 (2003) 541–546.
- [27] Y. Lee, E. Schwarz, M. Davies, M. Jo, J. Gates, J. Wu, X. Zhang, J.R. Lieberman, Differences in the cytokine profiles associated with prostate cancer cell induced osteoblastic and osteolytic lesions in bone, *J. Orthop. Res.* 21 (2003) 62–72.
- [28] B.L. Lin, C.P. Tarnowski, J. Zhang, E. Rohn, A.H. Patel, M.D. Morris, E.T. Keller, Bone metastatic LNCaP-derived C4-2B prostate cancer cell line mineralises in vitro, *Prostate* 47 (2001) 212–221.
- [29] J.M. Brown, E. Corey, Z.D. Lee, L.D. True, T.J. Bun, M. Tondravi, R.L. Vessela, Osteoprotegerin and RANK ligand expression in prostate cancer, *Urology* 57 (2001) 611–616.
- [30] I. Holen, P.I. Croucher, F.C. Hamdy, C.L. Eaton, Osteoprotegerin (OPG) is a survival factor for human prostate cancer cells, *Cancer Res.* 62 (2002) 1619–1623.
- [31] K. Jung, M. Lein, K. von Hösslin, B. Brux, D. Schnorr, S.A. Loening, P. Sinha, Osteoprotegerin in serum as a novel marker of bone metastatic spread in prostate cancer, *Clin. Chem.* 47 (2001) 2061–2063.
- [32] K. Jung, C. Stephan, A. Semjonow, M. Lein, D. Schnorr, A. Loening, Serum osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor-kappa B Ligand as indicators of disturbed osteoclastogenesis in patients with prostate cancer, *J. Urol.* 170 (2003) 2302–2305.
- [33] C.M. Shipman, P.I. Croucher, Osteoprotegerin is a soluble decoy receptor for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo2 ligand and can function as a paracrine survival factor for human myeloma cells, *Cancer Res.* 63 (2003) 912–916.

- [34] G.J. Atkins, D.R. Haynes, S.E. Graves, A. Evdokiou, S. Hay, S. Bouralexis, D.M. Findlay, Expression of osteoclast differentiation signals by stromal elements of giant cell tumors, *J. Bone Miner. Res.* 15 (2000) 640–649.
- [35] L. Huang, J. Xu, D.J. Wood, M.H. Zheng, Gene expression of osteoprotegerin ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF- κ B in giant cell tumor of bone, *Am. J. Pathol.* 156 (2000) 761–767.
- [36] N. Miyamoto, Y. Higuchi, M. Tajima, M. Ito, M. Tsurudome, M. Nishio, M. Kawano, A. Sudo, A. Uchida, Y. Ito, Spindle-shaped cells derived from giant-cell tumor of bone support differentiation of blood monocytes to osteoclast-like cells, *J. Orthop. Res.* 18 (2000) 647–654.
- [37] L. Huang, Y.Y. Cheng, L.T. Chow, M.H. Zheng, S.M. Kumta, Receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) is expressed in chondroblastoma: possible involvement in osteoclastic giant cell recruitment, *Mol. Pathol.* 56 (2003) 116–120.
- [38] D. Goltzman, Osteolysis and cancer, *J. Clin. Invest.* 107 (2001) 1219–1220.
- [39] J.M. Chirgwin, T.A. Guise, Molecular mechanisms of tumor–bone interactions in osteolytic metastases, *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 10 (2000) 159–178.
- [40] N. Chikatsu, Y. Takeuchi, Y. Tamura, S. Fukumoto, K. Yano, E. Tsuda, E. Ogata, T. Fujita, Interactions between cancer and bone marrow cells induce osteoclast differentiation factor expression and osteoclast-like cell formation in vitro, *Biochem. Biophys. Commun.* 267 (2000) 632–637.
- [41] M. Perez, S. Migliaccio, A. Taranta, C. Festuccia, L. Orru, M. Brama, M. Bologna, T. Faraggiana, R. Baron, A. Teti, Melanoma cells stimulate osteoclastogenesis, c-*Src* expression and osteoblast cytokines, *Eur. J. Cancer* 37 (2001) 629–640.
- [42] R.J. Thomas, T.A. Guise, J.J. Yin, J. Elliott, N.J. Horwood, T.J. Martin, M.T. Gillespie, Breast cancer cells interact with osteoblasts to support osteoclast formation, *Endocrinology* 140 (1999) 4451–4458.
- [43] A.T. Mancino, V.S. Klimberg, M. Yamamoto, S.C. Manolagas, E. Abe, Breast cancer increases osteoclastogenesis by secreting M-CSF and upregulating RANKL in stromal cells, *J. Surg. Res.* 100 (2001) 18–24.
- [44] T. Ohshiba, C. Miyaura, M. Inada, A. Ito, Role of RANKL-induced osteoclast formation and MMP-dependent matrix degradation in bone destruction by breast cancer metastasis, *Br. J. Cancer* 88 (2003) 1318–1326.
- [45] K. Fizazi, J. Yang, S. Peleg, C.R. Sikes, E.L. Kreimann, D. Daliani, M. Olive, K.A. Raymond, T.J. Janus, C.J. Logothetis, G. Karsenty, N.M. Navone, Prostate cancer cells-osteoblast interaction shifts expression of growth/survival-related genes in prostate cancer and reduces expression of osteoprotegerin in osteoblasts, *Clin. Cancer Res.* 9 (2003) 2587–2597.
- [46] J. Zhang, J. Dai, Y. Qi, D.L. Lin, P. Smith, C. Strayhorn, A. Mizokami, Z. Fu, J. Westman, E.T. Keller, Osteoprotegerin inhibits prostate cancer-induced osteoclastogenesis and prevents prostate tumor growth in the bone, *J. Clin. Invest.* 107 (2001) 1235–1244.
- [47] M. Nagai, S. Kyakumoto, N. Sato, Cancer cells responsible for humoral hypercalcemia express mRNA encoding a secreted form of ODF/TRANCE that induces osteoclast formation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269 (2000) 532–536.
- [48] T. Michigami, M. Ihara-Watanabe, M. Yamazaki, K. Ozono, Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) is a key molecule of osteoclast formation for bone metastasis in a newly developed model of human neuroblastoma, *Cancer Res.* 61 (2001) 1637–1644.
- [49] T.A. Guise, J.M. Chirgwin, Transforming growth factor-beta in osteolytic breast cancer bone metastases, *Clin. Orthop.* 415 (2003) S32–38.
- [50] B. Blum, J. Moseley, L. Miller, K. Richelsoff, W. Haggard, Measurement of bone morphogenetic proteins and other growth factors in demineralized bone matrix, *Orthopedics* 27 (2004) S161–S165.
- [51] J.-P. Thiéry, B. Perdereau, R. Gongora, G. Gongora, A. Mazabraud, Un modèle expérimental d'ostéosarcome chez le rat: II. L'ostéosarcome greffable du rat, *Sem. Hôp. Paris* 58 (1982) 1686–1689.
- [52] H. Yasuda, N. Shima, N. Nakagawa, K. Yamaguchi, M. Kinosaki, S. Mochizuki, A. Tomoyasu, K. Yano, M. Goto, A. Murakami, E. Tsuda, T. Morinaga, K. Higashio, N. Udagawa, N. Takahashi, T. Suda, Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 3597–3602.
- [53] T. Akatsu, T. Murakami, K. Ono, M. Nishikawa, E. Tsuda, S.I. Mochizuki, N. Fujise, K. Higashio, K. Motoyoshi, M. Yamamoto, N. Nagata, Osteoclastogenesis inhibitory factor exhibits hypocalcemic effects in normal mice and in hypercalcemic nude mice carrying tumors associated with humoral hypercalcemia of malignancy, *Bone* 23 (1998) 495–498.
- [54] C. Capparelli, P.J. Kostenuik, S. Morony, C. Starnes, B. Weimann, G. Van, S. Scully, M. Qi, D.L. Lacey, C.R. Dunstan, Osteoprotegerin prevents and reverses hypercalcemia in a murine model of humoral hypercalcemia of malignancy, *Cancer Res.* 60 (2000) 783–787.
- [55] D.R. Clohisy, M.L. Ramnaraine, S. Scully, M. Qi, G. Van, H.L. Tan, D.L. Lacey, Osteoprotegerin inhibits tumor-induced osteoclastogenesis and bone tumor growth in osteopetrotic mice, *J. Orthop. Res.* 18 (2000) 967–976.
- [56] P.I. Croucher, C.M. Shipman, B. Van Camp, K. Vanderkerken, Bisphosphonates and osteoprotegerin as inhibitors of myeloma bone disease, *Cancer* 97 (2003) 818–824.
- [57] K. Vanderkerken, E. De Leenheer, C. Shipman, K. Asosingh, A. Willems, B. Van Camp, P. Croucher, Recombinant osteoprotegerin decreases tumor burden and increases survival in a murine model of multiple myeloma, *Cancer Res.* 63 (2003) 287–289.
- [58] H. Yonou, N. Kanomata, M. Goya, T. Kamijo, T. Yokose, T. Hasebe, K. Nagai, T. Hatano, Y. Ogawa, A. Ochiai, Osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor decreases human prostate cancer burden in human adult bone implanted into nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice, *Cancer Res.* 63 (2003) 2096–2102.
- [59] P. Honore, N.M. Luger, M.A. Sabino, M.J. Schwei, S.D. Rogers, D.B. Mach, P.F. O'keefe, M.L. Ramnaraine, D.R. Clohisy, P.W. Mantyh, Osteoprotegerin blocks bone cancer-induced skeletal destruction, skeletal pain and pain-related neurochemical reorganization of the spinal cord, *Nat. Med.* 6 (2000) 521–528.
- [60] N.M. Luger, P. Honore, M.A.C. Sabino, M.J. Schwei, S.D. Rogers, D.B. Mach, D.R. Clohisy, P.W. Mantyh, Osteoprotegerin diminishes advanced bone cancer pain, *Cancer Res.* 61 (2001) 4038–4047.
- [61] G.J. Atkins, S. Bouralexis, D.R. Haynes, S.E. Graves, S.M. Geary, A. Evdokiou, A.C. Zannettino, S. Hay, D.M. Findlay, Osteoprotegerin inhibits osteoclast formation and bone resorbing activity in giant cell tumors of bone, *Bone* 28 (2001) 370–377.
- [62] J.J. Body, P. Greipp, R.E. Coleman, T. Facon, F. Geurs, J.P. Ferman, J.M. Harousseau, A. Lipton, X. Mariette, C.D. Williams, A. Nakanishi, D. Holloway, S.W. Martin, C.R. Dunstan, P.J. Bekker, A phase I study of AMG-0007, a recombinant osteoprotegerin construct, in patients with multiple myeloma or breast carcinoma related bone metastases, *Cancer* 97 (2003) 887–892.
- [63] J.G. Emery, P. McDonnell, M.B. Burke, K.C. Deen, S. Lyn, C. Silverman, E. Dul, E.R. Appelbaum, C. Eichman, R. DiPrinzio, R.A. Dodds, I.E. James, M. Rosenberg, J.C. Lee, P.R. Young, Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 14363–14367.
- [64] J. Zhang, J. Dai, Z. Yao, Y. Lu, W. Dougall, E.T. Keller, Soluble receptor activator of nuclear factor kappaB Fc diminishes prostate cancer progression in bone, *Cancer Res.* 63 (2003) 7883–7890.
- [65] E.M. Sordillo, R.N. Pearce, RANK-Fc: a therapeutic antagonist for RANKL in myeloma, *Cancer* 97 (2003) 802–812.
- [66] B.O. Oyajobi, G.R. Mundy, Receptor activator of NF- κ B ligand, macrophage inflammatory protein-1 α , and the proteasome: novel therapeutic targets in myeloma, *Cancer* 97 (2003) 813–817.
- [67] X. Cheng, M. Kinosaki, M. Takami, Y. Choi, H. Zhang, R. Murali, Disabling of RANK receptor complex by novel osteoprotegerin like peptidomimetics restores bone loss in-vivo, *J. Biol. Chem.* 84 (2004) 274–277.

CONCLUSION GENERALE

Le tissu osseux est un tissu conjonctif complexe en perpétuel remaniement, reposant sur l'équilibre de deux mécanismes: la formation et la résorption osseuse. Tout déséquilibre entre ces processus est à l'origine de pathologies qui peuvent être ostéocondensantes ou ostéolytiques, bénignes ou malignes. L'ostéosarcome est la plus fréquente des tumeurs osseuses primitives, dérive des ostéoblastes, et est très souvent associée à une ostéolyse. Les traitements actuels, qui consistent en une résection chirurgicale de la tumeur et en une polychimiothérapie (associant principalement le méthotrexate, le cisplatine, la doxorubicine et l'ifosfamide), ont permis d'améliorer les taux de survie des patients. Mais la forte toxicité des molécules de chimiothérapie utilisées, souvent mal tolérées chez les jeunes patients, dont la médiane d'âge est de 18 ans, ainsi que le mauvais pronostic associé à la détection de métastases pulmonaires, font qu'il est nécessaire de développer de nouvelles thérapies des ostéosarcomes.

L'Oncostatine M est une cytokine de la famille de l'Interleukine-6 identifiée par ses propriétés antiprolifératives sur la lignée de mélanome A375, faisant de cette cytokine un candidat intéressant pour l'élaboration de nouveaux traitements de l'ostéosarcome. Son rôle dans la biologie des ostéosarcomes et du tissu osseux en général ayant été très peu étudié, l'objectif de cette thèse était de mieux connaître les effets de l'OSM sur la prolifération, la différenciation et la viabilité des cellules tumorales issues d'ostéosarcomes mais aussi des cellules osseuses saines environnantes (ostéoblastes matures et cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse).

Dans la première partie de ce travail, nous avons tout d'abord pu confirmer que l'OSM réduit la prolifération de nombreux types cellulaires, qu'ils soient tumoraux ou non (OSRGA / ostéoblastes matures), peu ou très différenciés (MG63 / OSRGA). Cet effet antiprolifératif implique vraisemblablement la protéine p21^{WAF1}, comme cela avait été démontré précédemment dans la lignée MG63 (Bellido et al., 1997; Bellido et al., 1998). Il est apparu par la suite que ceci était indépendant du rôle joué sur la différenciation cellulaire, puisque l'OSM semblait exercer des effets différents selon le stade de maturation de la cellule. Stimulatrice de l'expression de marqueurs ostéoblastiques tel que la phosphatase alcaline sur les cellules MG63, l'OSM s'est au contraire montrée inhibitrice sur des cellules plus différenciées, comme les ostéoblastes matures ou la lignée OSRGA. Notre première conclusion a été de penser que l'OSM inhibait la différenciation ostéoblastique sur ces cellules matures, les menant dans un état de maturation intermédiaire. Cependant la détection d'un marqueur glial, mais également ostéocytaire, la GFAP, après traitement par l'OSM, a balayé notre hypothèse. L'OSM modifiait le statut de différenciation des cellules de type

ostéoblastique en les conduisant soit vers un phénotype glial (transdifférenciation) soit vers un phénotype ostéocytaire (différenciation terminale). La deuxième hypothèse semble aujourd'hui la plus plausible, d'autres marqueurs ostéocytaires ayant été détectés après des traitements à l'OSM de plus longue durée. De plus, le concept de différenciation terminale ostéocytaire correspond mieux avec les résultats obtenus lors de la deuxième partie de ce travail.

Notre étude s'est ensuite orientée vers les effets de l'OSM sur la viabilité des cellules osseuses tumorales ou non. Il est apparu que cette cytokine avait la capacité de sensibiliser les cellules d'ostéosarcomes, mais également d'autres types de cellules tumorales (issues de carcinomes coliques ou mammaires par exemple), à l'apoptose induite par divers agents de mort, tels que la Staurosporine, les UV ou la privation de sérum. Cet effet sensibilisateur est médié par une augmentation du ratio Bax / Bcl-2, et nécessite l'activation des facteurs de transcription p53 et STAT5. Ces deux protéines, phosphorylées par l'OSM, sont responsables de l'induction de Bax et de la réduction de Bcl-2 respectivement. De plus, p53 et STAT5 sont associés de façon constitutive dans les cellules d'ostéosarcome, formant un complexe protéique très certainement composé également d'autres molécules de type coactivateurs ou corépresseurs. Le rôle crucial de p53 dans l'effet pro-apoptotique de l'OSM est de plus appuyé par le fait qu'aucune cellule ayant une p53 déficiente (nulle ou mutée), ne soit sensible à l'apoptose induite par l'OSM et la Sts. Malheureusement, la majorité des ostéosarcomes humains présentent un p53 déficiente, ce qui crée une résistance innée à cette combinaison OSM+Sts. L'objectif serait alors de réinduire une protéine p53 fonctionnelle dans ces cellules tumorales afin de les sensibiliser à ce traitement.

Il existe un lien étroit entre différenciation terminale et apoptose, ce qui laisse envisager que l'OSM induirait plutôt une différenciation ostéocytaire que gliale. De plus, p53 semble jouer un rôle très important dans le contrôle de la différenciation ostéoblastique. En effet, plusieurs études ont montré que p53 freine l'engagement des cellules souches de la moelle osseuse dans cette voie, réduit l'expression de facteurs de transcription clés de cette lignée (Ostérix, Cbfa1) et ainsi l'ostéoblastogénèse. A l'inverse, une absence de p53 permet aux cellules de se différencier plus rapidement, de proliférer plus intensément, et est corrélée avec l'apparition massive de tumeurs osseuses. Par contre, cette différenciation est imparfaite, puisque p53 est nécessaire à l'expression de marqueurs terminaux des ostéoblastes, et donc à une différenciation complète. Tout ceci laisse à penser que p53 est impliquée non seulement dans la sensibilisation à l'apoptose par l'OSM via l'induction de Bax, mais également dans la différenciation terminale observée. Les perspectives qu'offrent ces résultats sont larges,

notamment l'implication de p53 dans la perte des marqueurs ostéoblastiques, dans la différenciation ostéocytaire et dans la régulation de l'apoptose de ces cellules encore mal connues et qui représentent la majorité des cellules osseuses.

Du point de vue mécanistique, l'étude des voies de signalisation activées par l'OSM a révélé une grande diversité et une complexité dans leurs rôles respectifs. En tant que cytokine de la famille de l'IL-6, l'OSM active plusieurs voies de transduction, tels que les facteurs de transcription STATs, les kinases ERK1/2, Akt et PKC δ . Grâce à l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques des kinases et de dominants négatifs des STATs, l'implication de ces voies dans les effets de l'OSM a pu être en partie élucidée. Il est alors apparu que STAT3 était nécessaire à l'expression de la GFAP, alors que PKC δ était impliquée dans la réduction des marqueurs ostéoblastiques. Dans la deuxième étude, nous avons identifié STAT5 comme étant responsable de la réduction de Bcl-2, les kinases jouant au contraire un rôle anti-apoptotique. Les mécanismes moléculaires plus précis de ces différentes modulations restent à élucider, et notamment le lien entre PKC δ , p53 et perte des marqueurs ostéoblastiques. Bien que candidats potentiels, les HDACs ne semblent pas impliqués dans les nombreux effets inhibiteurs de l'OSM, sur l'expression des marqueurs ostéoblastiques ou de Bcl-2 par exemple. De même, les voies de survie impliquant PKC δ et Akt nécessitent de nouvelles expérimentations, au niveau de mTOR ou BAD par exemple. Les différentes voies de signalisation et leurs rôles respectifs dans les effets de l'OSM sont résumés dans la figure 11.

Dans leur ensemble, ces résultats obtenus *in vitro* indiquent que l'OSM stimule la différenciation ostéoblastique jusqu'au stade terminal d'ostéocyte, tout en modifiant l'équilibre des molécules de l'apoptose en faveur des protéines pro-apoptotiques. Ce nouvel état, plus instable, est néanmoins contrebalancé par l'activation de signaux de survie, via les kinases PKC δ et Akt, empêchant le déclenchement du processus d'apoptose en l'absence d'autres signaux.

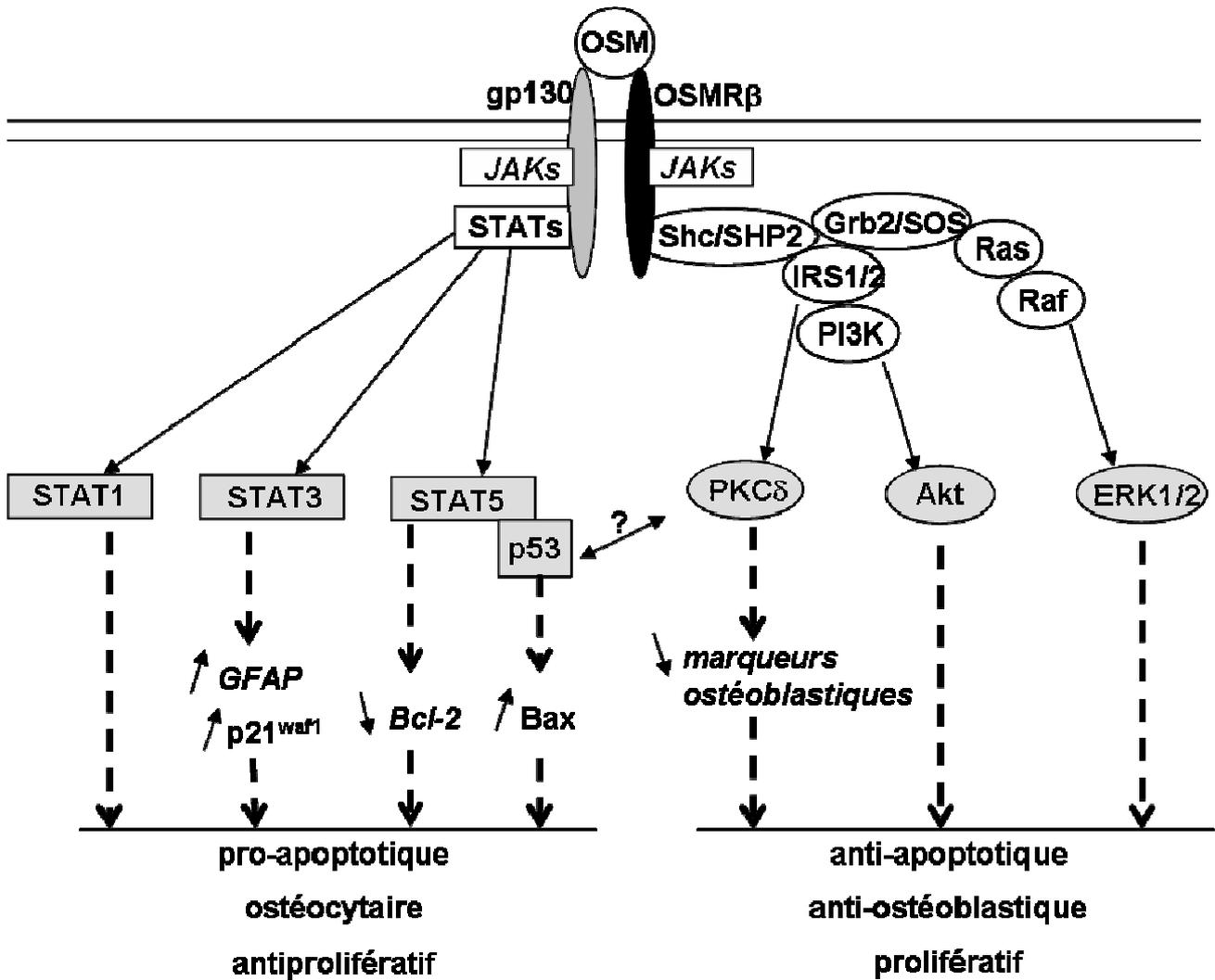


Figure 11: Voies de signalisation activées par l'OSM et leur implication dans les effets observés

L'induction d'apoptose observée avec la combinaison OSM+Sts a conduit à l'élaboration d'un protocole d'expérimentation animale utilisant le modèle d'ostéosarcome de rat OSRGA correspondant à la lignée cellulaire testée in vitro. Le but de ce travail était d'obtenir, grâce aux propriétés anti-prolifératives et de sensibilisation à la mort de l'OSM, un ralentissement de la croissance tumorale chez les animaux traités. Ceci a effectivement été observé; mais cette étude, bien que très encourageante, reste néanmoins préliminaire et demande à être confirmée et complétée par des travaux complémentaires: étude sur un autre modèle tumoral, effet sur la dissémination métastatique, étude histologique des tumeurs osseuses. Si cela est confirmé, nos résultats viendront appuyer les études réalisées par Ouyang et collaborateurs sur les lignées de carcinome pulmonaire et de mélanome montrant un rôle anti-métastatique de l'OSM, qui réduit in vitro la capacité invasive de ces cellules et la production de MMPs, et in vivo la formation de foyers métastatiques (Ouyang et al., 2006). Dans ce cadre, l'OSM représenterait une molécule d'autant plus intéressante dans l'élaboration de protocoles thérapeutiques: antiproliférative, antimétastatique et sensibilisatrice à l'apoptose.

Les expérimentations animales ont de plus permis d'étudier les effets de l'OSM sur la biologie osseuse, démontrant une réduction des activités ostéoblastiques et ostéoclastiques, et donc du remodelage osseux. Il en résulte une architecture osseuse altérée au niveau de l'os trabéculaire, avec un volume osseux trabéculaire moins important. Cet effet est vraisemblablement médié par les ostéoblastes, sur lesquels l'OSM agit directement, et atteint indirectement les ostéoclastes, qui sont alors moins stimulés. Contrairement à de précédentes études, l'OSM ne semble donc pas dans notre modèle stimuler la production de RANKL par les ostéoblastes (Palmqvist et al., 2002), puisque l'activité ostéoclastique est réduite, certainement du fait d'une activité ostéoblastique réduite également. Des expériences complémentaires restent nécessaires à l'analyse plus précise de ces effets de l'OSM sur le remodelage osseux.

Si l'on met en parallèle ces observations avec celles obtenues dans les études in vitro, on peut penser que l'OSM, en induisant une différenciation terminale en ostéocytes, réduit le nombre ou l'activité des ostéoblastes, et modifie ainsi la structure de l'os trabéculaire.

Tout au long de ce travail, nous avons montré que l'OSM exerce des effets complexes sur la biologie de l'os, que ce soit au niveau de la prolifération, de la différenciation ostéoblastique ou de l'apoptose des cellules tumorales. Cette molécule possède des propriétés particulières qui en font un agent potentiel de thérapie des ostéosarcomes. Dans le futur, il est probable que la combinaison de différentes approches thérapeutiques constitue le meilleur traitement des ostéosarcomes. Ainsi, une association entre l'OSM et une molécule de chimiothérapie "classique" utilisée à faible dose, mais également avec une molécule anti-résorptive telle que l'OPG, limitant la perte de substance osseuse associée à l'ostéosarcome et potentiellement à l'OSM elle-même, pourrait constituer une thérapie prometteuse des ostéosarcomes.

BIBLIOGRAPHIE

Aarden, E. M., Burger, E. H., and Nijweide, P. J. (1994). Function of osteocytes in bone. *J Cell Biochem* 55, 287-299.

Adams, J. M., and Cory, S. (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281, 1322-1326.

Allouche, M., Delbruck, H. G., Klein, B., Masse, R., Matar, A., Morin, M., Lafuma, J., and Jasmin, C. (1980). Malignant bone tumours induced by a local injection of colloidal radioactive ¹⁴⁴Cerium in rats as a model for human osteosarcomas. *Int J Cancer* 26, 777-782.

Amin, A. R., Ichigotani, Y., Oo, M. L., Biswas, M. H., Yuan, H., Huang, P., Mon, N. N., and Hamaguchi, M. (2003). The PLC-PKC cascade is required for IL-1beta-dependent Erk and Akt activation: their role in proliferation. *Int J Oncol* 23, 1727-1731.

Auernhammer, C. J., Dorn, F., Vlotides, G., Hengge, S., Kopp, F. B., Spoettl, G., Cengic, N., Engelhardt, D., and Weber, M. M. (2004). The oncostatin M receptor/gp130 ligand murine oncostatin M induces apoptosis in adrenocortical Y-1 tumor cells. *J Endocrinol* 180, 479-486.

Auguste, P., Guillet, C., Fourcin, M., Olivier, C., Veziere, J., Pouplard-Barthelaix, A., and Gascan, H. (1997). Signaling of type II oncostatin M receptor. *J Biol Chem* 272, 15760-15764.

Bacci, G., Briccoli, A., Rocca, M., Ferrari, S., Donati, D., Longhi, A., Bertoni, F., Bacchini, P., Giacomini, S., Forni, C., *et al.* (2003). Neoadjuvant chemotherapy for osteosarcoma of the extremities with metastases at presentation: recent experience at the Rizzoli Institute in 57 patients treated with cisplatin, doxorubicin, and a high dose of methotrexate and ifosfamide. *Ann Oncol* 14, 1126-1134.

Barlev, N. A., Liu, L., Chehab, N. H., Mansfield, K., Harris, K. G., Halazonetis, T. D., and Berger, S. L. (2001). Acetylation of p53 activates transcription through recruitment of coactivators/histone acetyltransferases. *Mol Cell* 8, 1243-1254.

Barton, B. E., and Murphy, T. F. (2001). Cancer cachexia is mediated in part by the induction of IL-6-like cytokines from the spleen. *Cytokine* 16, 251-257.

Battle, T. E., and Frank, D. A. (2002). The role of STATs in apoptosis. *Curr Mol Med* 2, 381-392.

Bellido, T., Borba, V. Z., Roberson, P., and Manolagas, S. C. (1997). Activation of the Janus kinase/STAT (signal transducer and activator of transcription) signal transduction pathway by interleukin-6-type cytokines promotes osteoblast differentiation. *Endocrinology* 138, 3666-3676.

- Bellido, T., O'Brien, C. A., Roberson, P. K., and Manolagas, S. C. (1998). Transcriptional activation of the p21(WAF1,CIP1,SDI1) gene by interleukin-6 type cytokines. A prerequisite for their pro-differentiating and anti-apoptotic effects on human osteoblastic cells. *J Biol Chem* 273, 21137-21144.
- Bellido, T., Stahl, N., Farruggella, T. J., Borba, V., Yancopoulos, G. D., and Manolagas, S. C. (1996). Detection of receptors for interleukin-6, interleukin-11, leukemia inhibitory factor, oncostatin M, and ciliary neurotrophic factor in bone marrow stromal/osteoblastic cells. *J Clin Invest* 97, 431-437.
- Bialek, P., Kern, B., Yang, X., Schrock, M., Sosic, D., Hong, N., Wu, H., Yu, K., Ornitz, D. M., Olson, E. N., *et al.* (2004). A twist code determines the onset of osteoblast differentiation. *Dev Cell* 6, 423-435.
- Blair, H. C., Kahn, A. J., Crouch, E. C., Jeffrey, J. J., and Teitelbaum, S. L. (1986). Isolated osteoclasts resorb the organic and inorganic components of bone. *J Cell Biol* 102, 1164-1172.
- Blais, M. E., Louis, I., and Perreault, C. (2006). T-cell development: an extrathymic perspective. *Immunol Rev* 209, 103-114.
- Blanchard, F., Wang, Y., Kinzie, E., Duplomb, L., Godard, A., and Baumann, H. (2001). Oncostatin M regulates the synthesis and turnover of gp130, leukemia inhibitory factor receptor alpha, and oncostatin M receptor beta by distinct mechanisms. *J Biol Chem* 276, 47038-47045.
- Blin-Wakkach, C., Lezot, F., Ghoul-Mazgar, S., Hotton, D., Monteiro, S., Teillaud, C., Pibouin, L., Orestes-Cardoso, S., Papagerakis, P., Macdougall, M., *et al.* (2001). Endogenous Msx1 antisense transcript: in vivo and in vitro evidences, structure, and potential involvement in skeleton development in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 7336-7341.
- Bode, J. G., Ludwig, S., Freitas, C. A., Schaper, F., Ruhl, M., Melmed, S., Heinrich, P. C., and Haussinger, D. (2001). The MKK6/p38 mitogen-activated protein kinase pathway is capable of inducing SOCS3 gene expression and inhibits IL-6-induced transcription. *Biol Chem* 382, 1447-1453.
- Brodie, C., and Blumberg, P. M. (2003). Regulation of cell apoptosis by protein kinase c delta. *Apoptosis* 8, 19-27.
- Brown, T. J., Rowe, J. M., Liu, J. W., and Shoyab, M. (1991). Regulation of IL-6 expression by oncostatin M. *J Immunol* 147, 2175-2180.
- Burfoot, M. S., Rogers, N. C., Watling, D., Smith, J. M., Pons, S., Paonessaw, G., Pellegrini, S., White, M. F., and Kerr, I. M. (1997). Janus kinase-dependent activation of insulin receptor substrate 1 in response to interleukin-4, oncostatin M, and the interferons. *J Biol Chem* 272, 24183-24190.

Candelieri, G. A., Liu, F., and Aubin, J. E. (2001) Individual osteoblasts in the developing calvaria express different gene repertoires.

Chambers, T. J., and Fuller, K. (1985). Bone cells predispose bone surfaces to resorption by exposure of mineral to osteoclastic contact. *J Cell Sci* 76, 155-165.

Chan, H. M., and La Thangue, N. B. (2001). p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds. *J Cell Sci* 114, 2363-2373.

Chandar, N., Campbell, P., Novak, J., and Smith, M. (1993). Dependence of induction of osteocalcin gene expression on the presence of wild-type p53 in a murine osteosarcoma cell line. *Mol Carcinog* 8, 299-305.

Chatterjee-Kishore, M., Wright, K. L., Ting, J. P., and Stark, G. R. (2000). How Stat1 mediates constitutive gene expression: a complex of unphosphorylated Stat1 and IRF1 supports transcription of the LMP2 gene. *Embo J* 19, 4111-4122.

Chauveinc, L., Mosseri, V., Quintana, E., Desjardins, L., Schlienger, P., Doz, F., and Dutrillaux, B. (2001). Osteosarcoma following retinoblastoma: age at onset and latency period. *Ophthalmic Genet* 22, 77-88.

Chavassieux, P. a. M., P. (2003). Histologie et cytologie de l'os normal. *Encycl Méd Chir, Appareil locomoteur* 14-002-A-10.

Chen, S. H., and Benveniste, E. N. (2004). Oncostatin M: a pleiotropic cytokine in the central nervous system. *Cytokine Growth Factor Rev* 15, 379-391.

Cichy, J., Rose-John, S., Potempa, J., Pryjma, J., and Travis, J. (1997). Oncostatin M stimulates the expression and release of the IL-6 receptor in human hepatoma HepG2 cells. *J Immunol* 159, 5648-5653.

Clegg, C. H., Haugen, H. S., Rulffes, J. T., Friend, S. L., and Farr, A. G. (1999). Oncostatin M transforms lymphoid tissue function in transgenic mice by stimulating lymph node T-cell development and thymus autoantibody production. *Exp Hematol* 27, 712-725.

Clegg, C. H., Rulffes, J. T., Wallace, P. M., and Haugen, H. S. (1996). Regulation of an extrathymic T-cell development pathway by oncostatin M. *Nature* 384, 261-263.

Cory, S., and Adams, J. M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2, 647-656.

Darnell, J. E., Jr. (1997). STATs and gene regulation. *Science* 277, 1630-1635.

de Hooge, A. S., van de Loo, F. A., Bennink, M. B., Arntz, O. J., Fiselier, T. J., Franssen, M. J., Joosten, L. A., Van Lent, P. L., Richards, C. D., and van den Berg, W. B. (2003). Growth plate damage, a feature of juvenile idiopathic arthritis, can be induced by adenoviral gene

transfer of oncostatin M: a comparative study in gene-deficient mice. *Arthritis Rheum* 48, 1750-1761.

de Hooge, A. S., van de Loo, F. A., Bennink, M. B., de Jong, D. S., Arntz, O. J., Lubberts, E., Richards, C. D., and van den Berg, W. B. (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, 1733-1743.

Debierre-Grockiego, F. (2004). Anti-apoptotic role of STAT5 in haematopoietic cells and in the pathogenesis of malignancies. *Apoptosis* 9, 717-728.

Deller, M. C., Hudson, K. R., Ikemizu, S., Bravo, J., Jones, E. Y., and Heath, J. K. (2000). Crystal structure and functional dissection of the cytostatic cytokine oncostatin M. *Structure* 8, 863-874.

Derouet, D., Rousseau, F., Alfonsi, F., Froger, J., Hermann, J., Barbier, F., Perret, D., Diveu, C., Guillet, C., Preisser, L., *et al.* (2004). Neuropoietin, a new IL-6-related cytokine signaling through the ciliary neurotrophic factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 4827-4832.

Dhordain, P., Lin, R. J., Quief, S., Lantoine, D., Kerckaert, J. P., Evans, R. M., and Albagli, O. (1998). The LAZ3(BCL-6) oncoprotein recruits a SMRT/mSIN3A/histone deacetylase containing complex to mediate transcriptional repression. *Nucleic Acids Res* 26, 4645-4651.

Dillon, S. R., Sprecher, C., Hammond, A., Bilsborough, J., Rosenfeld-Franklin, M., Presnell, S. R., Haugen, H. S., Maurer, M., Harder, B., Johnston, J., *et al.* (2004). Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice. *Nat Immunol* 5, 752-760.

Douglas, A. M., Grant, S. L., Goss, G. A., Clouston, D. R., Sutherland, R. L., and Begley, C. G. (1998). Oncostatin M induces the differentiation of breast cancer cells. *Int J Cancer* 75, 64-73.

Eskes, R., Desagher, S., Antonsson, B., and Martinou, J. C. (2000). Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol* 20, 929-935.

Fleischer, A., Ghadiri, A., Dessauge, F., Duhamel, M., Rebollo, M. P., Alvarez-Franco, F., and Rebollo, A. (2006). Modulating apoptosis as a target for effective therapy. *Mol Immunol* 43, 1065-1079.

Franz-Odenaal, T. A., Hall, B. K., and Witten, P. E. (2006). Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn* 235, 176-190.

Fuchs, B., and Pritchard, D. J. (2002). Etiology of osteosarcoma. *Clin Orthop Relat Res* 397, 40-52.

Ganjavi, H., Gee, M., Narendran, A., Parkinson, N., Krishnamoorthy, M., Freedman, M. H., and Malkin, D. (2006). Adenovirus-mediated p53 gene therapy in osteosarcoma cell lines: sensitization to cisplatin and doxorubicin. *Cancer Gene Ther* 13, 415-419.

Garcia, R., Bowman, T. L., Niu, G., Yu, H., Minton, S., Muro-Cacho, C. A., Cox, C. E., Falcone, R., Fairclough, R., Parsons, S., *et al.* (2001). Constitutive activation of Stat3 by the Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells. *Oncogene* 20, 2499-2513.

Gearing, D. P., and Bruce, A. G. (1992). Oncostatin M binds the high-affinity leukemia inhibitory factor receptor. *New Biol* 4, 61-65.

Giovannini, M., Djabali, M., McElligott, D., Selleri, L., and Evans, G. A. (1993). Tandem linkage of genes coding for leukemia inhibitory factor (LIF) and oncostatin M (OSM) on human chromosome 22. *Cytogenet Cell Genet* 64, 240-244.

Grant, S. L., and Begley, C. G. (1999). The oncostatin M signalling pathway: reversing the neoplastic phenotype? *Mol Med Today* 5, 406-412.

Grant, S. L., Douglas, A. M., Goss, G. A., and Begley, C. G. (2001). Oncostatin M and leukemia inhibitory factor regulate the growth of normal human breast epithelial cells. *Growth Factors* 19, 153-162.

Green, D. R., and Evan, G. I. (2002). A matter of life and death. *Cancer Cell* 1, 19-30.

Grenier, A., Dehoux, M., Boutten, A., Arce-Vicioso, M., Durand, G., Gougerot-Pocidallo, M. A., and Chollet-Martin, S. (1999). Oncostatin M production and regulation by human polymorphonuclear neutrophils. *Blood* 93, 1413-1421.

Grigoriadis, A. E., Schellander, K., Wang, Z. Q., and Wagner, E. F. (1993). Osteoblasts are target cells for transformation in c-fos transgenic mice. *J Cell Biol* 122, 685-701.

Guschin, D., Rogers, N., Briscoe, J., Witthuhn, B., Watling, D., Horn, F., Pellegrini, S., Yasukawa, K., Heinrich, P., Stark, G. R., and *et al.* (1995). A major role for the protein tyrosine kinase JAK1 in the JAK/STAT signal transduction pathway in response to interleukin-6. *Embo J* 14, 1421-1429.

Haan, C., Hermanns, H. M., Heinrich, P. C., and Behrmann, I. (2000). A single amino acid substitution (Trp(666)-->Ala) in the interbox1/2 region of the interleukin-6 signal transducer gp130 abrogates binding of JAK1, and dominantly impairs signal transduction. *Biochem J* 349, 261-266.

Hadjiargyrou, M., Rightmire, E. P., Ando, T., and Lombardo, F. T. (2001). The E11 osteoblastic lineage marker is differentially expressed during fracture healing. *Bone* 29, 149-154.

- Halfter, H., Lotfi, R., Westermann, R., Young, P., Ringelstein, E. B., and Stogbauer, F. T. (1998). Inhibition of growth and induction of differentiation of glioma cell lines by oncostatin M (OSM). *Growth Factors* 15, 135-147.
- Hauben, E. I., Arends, J., Vandenbroucke, J. P., van Asperen, C. J., Van Marck, E., and Hogendoorn, P. C. (2003). Multiple primary malignancies in osteosarcoma patients. Incidence and predictive value of osteosarcoma subtype for cancer syndromes related with osteosarcoma. *Eur J Hum Genet* 11, 611-618.
- Hauschka, P. V. (1986). Osteocalcin: the vitamin K-dependent Ca²⁺-binding protein of bone matrix. *Haemostasis* 16, 258-272.
- Heath, C., and Cross, N. C. (2004). Critical role of STAT5 activation in transformation mediated by ZNF198-FGFR1. *J Biol Chem* 279, 6666-6673.
- Heinrich, P. C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H. M., Muller-Newen, G., and Schaper, F. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 374, 1-20.
- Hermanns, H. M., Radtke, S., Schaper, F., Heinrich, P. C., and Behrmann, I. (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, 40742-40748.
- Heymann, D., Ory, B., Blanchard, F., Heymann, M. F., Coipeau, P., Charrier, C., Couillaud, S., Thiery, J. P., Gouin, F., and Redini, F. (2005). Enhanced tumor regression and tissue repair when zoledronic acid is combined with ifosfamide in rat osteosarcoma. *Bone* 37, 74-86.
- Heymann, D., and Rousselle, A. V. (2000). gp130 Cytokine family and bone cells. *Cytokine* 12, 1455-1468.
- Hill, P. A. (1998). Bone remodelling. *Br J Orthod* 25, 101-107.
- Hoffman, R. C., Moy, F. J., Price, V., Richardson, J., Kaubisch, D., Frieden, E. A., Krakover, J. D., Castner, B. J., King, J., March, C. J., and Powers, R. (1996). Resonance assignments for Oncostatin M, a 24-kDa alpha-helical protein. *J Biomol NMR* 7, 273-282.
- Horn, D., Fitzpatrick, W. C., Gompper, P. T., Ochs, V., Bolton-Hansen, M., Zarling, J., Malik, N., Todaro, G. J., and Linsley, P. S. (1990). Regulation of cell growth by recombinant oncostatin M. *Growth Factors* 2, 157-165.
- Houzelstein, D., Auda-Boucher, G., Cheraud, Y., Rouaud, T., Blanc, I., Tajbakhsh, S., Buckingham, M. E., Fontaine-Perus, J., and Robert, B. (1999). The homeobox gene Msx1 is expressed in a subset of somites, and in muscle progenitor cells migrating into the forelimb. *Development* 126, 2689-2701.
- Hughes, D. E., Salter, D. M., and Simpson, R. (1994). CD44 expression in human bone: a novel marker of osteocytic differentiation. *J Bone Miner Res* 9, 39-44.

- Hui, W., Rowan, A. D., Richards, C. D., and Cawston, T. E. (2003). Oncostatin M in combination with tumor necrosis factor alpha induces cartilage damage and matrix metalloproteinase expression in vitro and in vivo. *Arthritis Rheum* 48, 3404-3418.
- Hutt, J. A., and DeWille, J. W. (2002). Oncostatin M induces growth arrest of mammary epithelium via a CCAAT/enhancer-binding protein delta-dependent pathway. *Mol Cancer Ther* 1, 601-610.
- Ihn, H., and Tamaki, K. (2000). Oncostatin M stimulates the growth of dermal fibroblasts via a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *J Immunol* 165, 2149-2155.
- Ito, Y., Matsui, T., Kamiya, A., Kinoshita, T., and Miyajima, A. (2000). Retroviral gene transfer of signaling molecules into murine fetal hepatocytes defines distinct roles for the STAT3 and ras pathways during hepatic development. *Hepatology* 32, 1370-1376.
- Itoh, S., Udagawa, N., Takahashi, N., Yoshitake, F., Narita, H., Ebisu, S., and Ishihara, K. (2006). A critical role for interleukin-6 family-mediated Stat3 activation in osteoblast differentiation and bone formation. *Bone* 39, 505-512.
- Jaenisch, R., and Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 33 *Suppl*, 245-254.
- Jain, N., Zhang, T., Kee, W. H., Li, W., and Cao, X. (1999). Protein kinase C delta associates with and phosphorylates Stat3 in an interleukin-6-dependent manner. *J Biol Chem* 274, 24392-24400.
- Jamal, H. H., and Aubin, J. E. (1996). CD44 expression in fetal rat bone: in vivo and in vitro analysis. *Exp Cell Res* 223, 467-477.
- Jeon, E. J., Lee, K. Y., Choi, N. S., Lee, M. H., Kim, H. N., Jin, Y. H., Ryoo, H. M., Choi, J. Y., Yoshida, M., Nishino, N., *et al.* (2006). Bone morphogenetic protein-2 stimulates Runx2 acetylation. *J Biol Chem* 281, 16502-16511.
- Jilka, R. L., Weinstein, R. S., Bellido, T., Parfitt, A. M., and Manolagas, S. C. (1998). Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. *J Bone Miner Res* 13, 793-802.
- Jones, P. A., and Baylin, S. B. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 3, 415-428.
- Jorcyk, C. L., Holzer, R. G., and Ryan, R. E. (2006). Oncostatin M induces cell detachment and enhances the metastatic capacity of T-47D human breast carcinoma cells. *Cytokine* 33, 323-336.
- Kamaraju, A. K., Bertolotto, C., Chebath, J., and Revel, M. (2002). Pax3 down-regulation and shut-off of melanogenesis in melanoma B16/F10.9 by interleukin-6 receptor signaling. *J Biol Chem* 277, 15132-15141.

- Kasantikul, V., and Shuangshoti, S. (1989). Positivity to glial fibrillary acidic protein in bone, cartilage, and chordoma. *J Surg Oncol* 41, 22-26.
- Kashkar, H., Wiegmann, K., Yazdanpanah, B., Haubert, D., and Kronke, M. (2005). Acid sphingomyelinase is indispensable for UV light-induced Bax conformational change at the mitochondrial membrane. *J Biol Chem* 280, 20804-20813.
- Kelekar, A., and Thompson, C. B. (1998). Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol* 8, 324-330.
- Kim, Y. B., Lee, K. H., Sugita, K., Yoshida, M., and Horinouchi, S. (1999). Oxamflatin is a novel antitumor compound that inhibits mammalian histone deacetylase. *Oncogene* 18, 2461-2470.
- Kishimoto, T., Akira, S., and Taga, T. (1992). Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines. *Science* 258, 593-597.
- Klausen, P., Pedersen, L., Jurlander, J., and Baumann, H. (2000). Oncostatin M and interleukin 6 inhibit cell cycle progression by prevention of p27kip1 degradation in HepG2 cells. *Oncogene* 19, 3675-3683.
- Klein, B., Pals, S., Masse, R., Lafuma, J., Morin, M., Binart, N., Jasmin, J. R., and Jasmin, C. (1977). Studies of bone and soft-tissue tumours induced in rats with radioactive cerium chloride. *Int J Cancer* 20, 112-119.
- Knothe Tate, M. L., Adamson, J. R., Tami, A. E., and Bauer, T. W. (2004). The osteocyte. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 1-8.
- Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R. T., Gao, Y. H., Inada, M., *et al.* (1997). Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89, 755-764.
- Kopf, M., Baumann, H., Freer, G., Freudenberg, M., Lamers, M., Kishimoto, T., Zinkernagel, R., Bluethmann, H., and Kohler, G. (1994). Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature* 368, 339-342.
- Korzus, E., Nagase, H., Rydell, R., and Travis, J. (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, 1188-1196.
- Lambert, P. F., Kashanchi, F., Radonovich, M. F., Shiekhattar, R., and Brady, J. N. (1998). Phosphorylation of p53 serine 15 increases interaction with CBP. *J Biol Chem* 273, 33048-33053.

- Langdon, C., Kerr, C., Hassen, M., Hara, T., Arsenault, A. L., and Richards, C. D. (2000). Murine oncostatin M stimulates mouse synovial fibroblasts in vitro and induces inflammation and destruction in mouse joints in vivo. *Am J Pathol* 157, 1187-1196.
- Lee, M. S., Lowe, G. N., Strong, D. D., Wergedal, J. E., and Glackin, C. A. (1999). TWIST, a basic helix-loop-helix transcription factor, can regulate the human osteogenic lineage. *J Cell Biochem* 75, 566-577.
- Lengner, C. J., Steinman, H. A., Gagnon, J., Smith, T. W., Henderson, J. E., Kream, B. E., Stein, G. S., Lian, J. B., and Jones, S. N. (2006). Osteoblast differentiation and skeletal development are regulated by Mdm2-p53 signaling. *J Cell Biol* 172, 909-921.
- Li, W. Q., Dehnade, F., and Zafarullah, M. (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, 3491-3498.
- Liggett, W. H., Jr., Lian, J. B., Greenberger, J. S., and Glowacki, J. (1994). Osteocalcin promotes differentiation of osteoclast progenitors from murine long-term bone marrow cultures. *J Cell Biochem* 55, 190-199.
- Lin, R. J., Nagy, L., Inoue, S., Shao, W., Miller, W. H., Jr., and Evans, R. M. (1998). Role of the histone deacetylase complex in acute promyelocytic leukaemia. *Nature* 391, 811-814.
- Lindberg, R. A., Juan, T. S., Welcher, A. A., Sun, Y., Cupples, R., Guthrie, B., and Fletcher, F. A. (1998). Cloning and characterization of a specific receptor for mouse oncostatin M. *Mol Cell Biol* 18, 3357-3367.
- Linsley, P. S., Kallestad, J., Ochs, V., and Neubauer, M. (1990). Cleavage of a hydrophilic C-terminal domain increases growth-inhibitory activity of oncostatin M. *Mol Cell Biol* 10, 1882-1890.
- Liu, F., Delmas, P.D., Aubin, J.E., and Malaval, L. (2000). Biphasic effect of Oncostatin M on osteoprogenitor differentiation and bone formation in vitro. *J Bone Miner Res* 15:S1-S142.
- Liu, J., Hadjokas, N., Mosley, B., Estrov, Z., Spence, M. J., and Vestal, R. E. (1998). Oncostatin M-specific receptor expression and function in regulating cell proliferation of normal and malignant mammary epithelial cells. *Cytokine* 10, 295-302.
- Lopez-Guerrero, J. A., Lopez-Gines, C., Pellin, A., Carda, C., and Llombart-Bosch, A. (2004). Dereglulation of the G1 to S-phase cell cycle checkpoint is involved in the pathogenesis of human osteosarcoma. *Diagn Mol Pathol* 13, 81-91.
- Lu, Y., Fukuyama, S., Yoshida, R., Kobayashi, T., Saeki, K., Shiraishi, H., Yoshimura, A., and Takaesu, G. (2006). Loss of SOCS3 Gene Expression Converts STAT3 Function from Anti-apoptotic to Pro-apoptotic. *J Biol Chem* 281, 36683-36690.

- Lynch, H. T., Deters, C. A., Hogg, D., Lynch, J. F., Kinarsky, Y., and Gatalica, Z. (2003). Familial sarcoma: challenging pedigrees. *Cancer* 98, 1947-1957.
- Malaval, L., and Aubin, J. E. (2001). Biphasic effects of leukemia inhibitory factor on osteoblastic differentiation. *J Cell Biochem* 81, 63-70.
- Malaval, L., Gupta, A. K., and Aubin, J. E. (1995). Leukemia inhibitory factor inhibits osteogenic differentiation in rat calvaria cell cultures. *Endocrinology* 136, 1411-1418.
- Malaval, L., Liu, F., Vernallis, A. B., and Aubin, J. E. (2005). GP130/OSMR is the only LIF/IL-6 family receptor complex to promote osteoblast differentiation of calvaria progenitors. *J Cell Physiol* 204, 585-593.
- Malik, N., Haugen, H. S., Modrell, B., Shoyab, M., and Clegg, C. H. (1995) Developmental abnormalities in mice transgenic for bovine oncostatin M.
- Malik, N., Kallestad, J. C., Gunderson, N. L., Austin, S. D., Neubauer, M. G., Ochs, V., Marquardt, H., Zarling, J. M., Shoyab, M., Wei, C. M., and et al. (1989). Molecular cloning, sequence analysis, and functional expression of a novel growth regulator, oncostatin M. *Mol Cell Biol* 9, 2847-2853.
- Manolagas, S. C. (2000). Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 21, 115-137.
- McCabe, L. R., Banerjee, C., Kundu, R., Harrison, R. J., Dobner, P. R., Stein, J. L., Lian, J. B., and Stein, G. S. (1996). Developmental expression and activities of specific fos and jun proteins are functionally related to osteoblast maturation: role of Fra-2 and Jun D during differentiation. *Endocrinology* 137, 4398-4408.
- Médico-Chirurgicale, E. (2001). 14-704.
- Meyer, T., Begitt, A., Lodige, I., van Rossum, M., and Vinkemeier, U. (2002). Constitutive and IFN-gamma-induced nuclear import of STAT1 proceed through independent pathways. *Embo J* 21, 344-354.
- Mezey, E., Key, S., Vogelsang, G., Szalayova, I., Lange, G. D., and Crain, B. (2003). Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 1364-1369.
- Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P., and Moll, U. M. (2003). p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell* 11, 577-590.
- Mina, M., Gluhak, J., Upholt, W. B., Kollar, E. J., and Rogers, B. (1995). Experimental analysis of Msx-1 and Msx-2 gene expression during chick mandibular morphogenesis. *Dev Dyn* 202, 195-214.

- Miyajima, A., Kinoshita, T., Tanaka, M., Kamiya, A., Mukoyama, Y., and Hara, T. (2000). Role of Oncostatin M in hematopoiesis and liver development. *Cytokine Growth Factor Rev* 11, 177-183.
- Modur, V., Feldhaus, M. J., Weyrich, A. S., Jicha, D. L., Prescott, S. M., Zimmerman, G. A., and McIntyre, T. M. (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, 158-168.
- Morikawa, Y., Tamura, S., Minehata, K., Donovan, P. J., Miyajima, A., and Senba, E. (2004). Essential function of oncostatin m in nociceptive neurons of dorsal root ganglia. *J Neurosci* 24, 1941-1947.
- Mosley, B., De Imus, C., Friend, D., Boiani, N., Thoma, B., Park, L. S., and Cosman, D. (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.
- Mukoyama, Y., Hara, T., Xu, M., Tamura, K., Donovan, P. J., Kim, H., Kogo, H., Tsuji, K., Nakahata, T., and Miyajima, A. (1998). In vitro expansion of murine multipotential hematopoietic progenitors from the embryonic aorta-gonad-mesonephros region. *Immunity* 8, 105-114.
- Murakami, M., Kamimura, D., and Hirano, T. (2004). New IL-6 (gp130) family cytokine members, CLC/NNT1/BSF3 and IL-27. *Growth Factors* 22, 75-77.
- Murakami, M., Narazaki, M., Hibi, M., Yawata, H., Yasukawa, K., Hamaguchi, M., Taga, T., and Kishimoto, T. (1991). Critical cytoplasmic region of the interleukin 6 signal transducer gp130 is conserved in the cytokine receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 11349-11353.
- Muraoka, M., Konishi, M., Kikuchi-Yanoshita, R., Tanaka, K., Shitara, N., Chong, J. M., Iwama, T., and Miyaki, M. (1996). p300 gene alterations in colorectal and gastric carcinomas. *Oncogene* 12, 1565-1569.
- Naka, T., Narazaki, M., Hirata, M., Matsumoto, T., Minamoto, S., Aono, A., Nishimoto, N., Kajita, T., Taga, T., Yoshizaki, K., *et al.* (1997). Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature* 387, 924-929.
- Nakajima, H., Kim, Y. B., Terano, H., Yoshida, M., and Horinouchi, S. (1998). FR901228, a potent antitumor antibiotic, is a novel histone deacetylase inhibitor. *Exp Cell Res* 241, 126-133.
- Nakamura, K., Nonaka, H., Saito, H., Tanaka, M., and Miyajima, A. (2004). Hepatocyte proliferation and tissue remodeling is impaired after liver injury in oncostatin M receptor knockout mice. *Hepatology* 39, 635-644.

- Nakashima, K., Wiese, S., Yanagisawa, M., Arakawa, H., Kimura, N., Hisatsune, T., Yoshida, K., Kishimoto, T., Sendtner, M., and Taga, T. (1999). Developmental requirement of gp130 signaling in neuronal survival and astrocyte differentiation. *J Neurosci* *19*, 5429-5434.
- Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J. M., Behringer, R. R., and de Crombrughe, B. (2002). The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* *108*, 17-29.
- Narazaki, M., Witthuhn, B. A., Yoshida, K., Silvennoinen, O., Yasukawa, K., Ihle, J. N., Kishimoto, T., and Taga, T. (1994). Activation of JAK2 kinase mediated by the interleukin 6 signal transducer gp130. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 2285-2289.
- Ndubuisi, M. I., Guo, G. G., Fried, V. A., Etlinger, J. D., and Sehgal, P. B. (1999). Cellular physiology of STAT3: Where's the cytoplasmic monomer? *J Biol Chem* *274*, 25499-25509.
- Nicholson, S. E., De Souza, D., Fabri, L. J., Corbin, J., Willson, T. A., Zhang, J. G., Silva, A., Asimakis, M., Farley, A., Nash, A. D., *et al.* (2000). Suppressor of cytokine signaling-3 preferentially binds to the SHP-2-binding site on the shared cytokine receptor subunit gp130. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 6493-6498.
- Niu, G., Heller, R., Catlett-Falcone, R., Coppola, D., Jaroszeski, M., Dalton, W., Jove, R., and Yu, H. (1999). Gene therapy with dominant-negative Stat3 suppresses growth of the murine melanoma B16 tumor in vivo. *Cancer Res* *59*, 5059-5063.
- Nosaka, T., Kawashima, T., Misawa, K., Ikuta, K., Mui, A. L., and Kitamura, T. (1999). STAT5 as a molecular regulator of proliferation, differentiation and apoptosis in hematopoietic cells. *Embo J* *18*, 4754-4765.
- Novotny-Diermayr, V., Zhang, T., Gu, L., and Cao, X. (2002). Protein kinase C delta associates with the interleukin-6 receptor subunit glycoprotein (gp) 130 via Stat3 and enhances Stat3-gp130 interaction. *J Biol Chem* *277*, 49134-49142.
- Okaya, A., Kitanaka, J., Kitanaka, N., Satake, M., Kim, Y., Terada, K., Sugiyama, T., Takemura, M., Fujimoto, J., Terada, N., *et al.* (2005). Oncostatin M inhibits proliferation of rat oval cells, OC15-5, inducing differentiation into hepatocytes. *Am J Pathol* *166*, 709-719.
- Otto, F., Thornell, A. P., Crompton, T., Denzel, A., Gilmour, K. C., Rosewell, I. R., Stamp, G. W., Beddington, R. S., Mundlos, S., Olsen, B. R., *et al.* (1997). *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* *89*, 765-771.
- Ouyang, L., Shen, L. Y., Li, T., and Liu, J. (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*, 197-202.
- Owen, M. (1988). Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci Suppl* *10*, 63-76.

Pacifici, R. (1998). Cytokines, estrogen, and postmenopausal osteoporosis--the second decade. *Endocrinology* *139*, 2659-2661.

Palmqvist, P., Persson, E., Conaway, H. H., and Lerner, U. H. (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*, 3353-3362.

Palumbo, C. (1986). A three-dimensional ultrastructural study of osteoid-osteocytes in the tibia of chick embryos. *Cell Tissue Res* *246*, 125-131.

Pfützner, E., Jahne, R., Wissler, M., Stoecklin, E., and Groner, B. (1998). p300/CREB-binding protein enhances the prolactin-mediated transcriptional induction through direct interaction with the transactivation domain of Stat5, but does not participate in the Stat5-mediated suppression of the glucocorticoid response. *Mol Endocrinol* *12*, 1582-1593.

Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., and Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* *284*, 143-147.

Propper, D. J., McDonald, A. C., Man, A., Thavasu, P., Balkwill, F., Braybrooke, J. P., Caponigro, F., Graf, P., Dutreix, C., Blackie, R., *et al.* (2001). Phase I and pharmacokinetic study of PKC412, an inhibitor of protein kinase C. *J Clin Oncol* *19*, 1485-1492.

Queen, M. M., Ryan, R. E., Holzer, R. G., Keller-Peck, C. R., and Joreyk, C. L. (2005). Breast cancer cells stimulate neutrophils to produce oncostatin M: potential implications for tumor progression. *Cancer Res* *65*, 8896-8904.

Rasclé, A., Johnston, J. A., and Amati, B. (2003). Deacetylase activity is required for recruitment of the basal transcription machinery and transactivation by STAT5. *Mol Cell Biol* *23*, 4162-4173.

Richards, C. D., Brown, T. J., Shoyab, M., Baumann, H., and Gauldie, J. (1992). Recombinant oncostatin M stimulates the production of acute phase proteins in HepG2 cells and rat primary hepatocytes in vitro. *J Immunol* *148*, 1731-1736.

Richards, C. D., Kerr, C., Tanaka, M., Hara, T., Miyajima, A., Pennica, D., Botelho, F., and Langdon, C. M. (1997). Regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in fibroblasts and acute phase proteins in hepatocytes in vitro by mouse oncostatin M, cardiotrophin-1, and IL-6. *J Immunol* *159*, 2431-2437.

Richards, C. D., Langdon, C., Botelho, F., Brown, T. J., and Agro, A. (1996). Oncostatin M inhibits IL-1-induced expression of IL-8 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by synovial and lung fibroblasts. *J Immunol* *156*, 343-349.

- Richards, C. D., Shoyab, M., Brown, T. J., and Gauldie, J. (1993). Selective regulation of metalloproteinase inhibitor (TIMP-1) by oncostatin M in fibroblasts in culture. *J Immunol* *150*, 5596-5603.
- Richon, V. M., Emiliani, S., Verdin, E., Webb, Y., Breslow, R., Rifkind, R. A., and Marks, P. A. (1998). A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 3003-3007.
- Rose, T. M., and Bruce, A. G. (1991). Oncostatin M is a member of a cytokine family that includes leukemia-inhibitory factor, granulocyte colony-stimulating factor, and interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci U S A* *88*, 8641-8645.
- Rose, T. M., Lagrou, M. J., Fransson, I., Werelius, B., Delattre, O., Thomas, G., de Jong, P. J., Todaro, G. J., and Dumanski, J. P. (1993). The genes for oncostatin M (OSM) and leukemia inhibitory factor (LIF) are tightly linked on human chromosome 22. *Genomics* *17*, 136-140.
- Ryoo, H. M., Hoffmann, H. M., Beumer, T., Frenkel, B., Towler, D. A., Stein, G. S., Stein, J. L., van Wijnen, A. J., and Lian, J. B. (1997). Stage-specific expression of Dlx-5 during osteoblast differentiation: involvement in regulation of osteocalcin gene expression. *Mol Endocrinol* *11*, 1681-1694.
- Saito, A., Yamashita, T., Mariko, Y., Nosaka, Y., Tsuchiya, K., Ando, T., Suzuki, T., Tsuruo, T., and Nakanishi, O. (1999). A synthetic inhibitor of histone deacetylase, MS-27-275, with marked in vivo antitumor activity against human tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 4592-4597.
- Schneider, P., and Tschopp, J. (2000). Apoptosis induced by death receptors. *Pharm Acta Helv* *74*, 281-286.
- Schulze, E., Witt, M., Kasper, M., Lowik, C. W., and Funk, R. H. (1999). Immunohistochemical investigations on the differentiation marker protein E11 in rat calvaria, calvaria cell culture and the osteoblastic cell line ROS 17/2.8. *Histochem Cell Biol* *111*, 61-69.
- Schuringa, J. J., Dekker, L. V., Vellenga, E., and Kruijer, W. (2001). Sequential activation of Rac-1, SEK-1/MKK-4, and protein kinase Cdelta is required for interleukin-6-induced STAT3 Ser-727 phosphorylation and transactivation. *J Biol Chem* *276*, 27709-27715.
- Schuringa, J. J., Jonk, L. J., Dokter, W. H., Vellenga, E., and Kruijer, W. (2000). Interleukin-6-induced STAT3 transactivation and Ser727 phosphorylation involves Vav, Rac-1 and the kinase SEK-1/MKK-4 as signal transduction components. *Biochem J* *347 Pt 1*, 89-96.
- Shin, H. I., Divieti, P., Sims, N. A., Kobayashi, T., Miao, D., Karaplis, A. C., Baron, R., Bringhurst, R., and Kronenberg, H. M. (2004). Gp130-mediated signaling is necessary for normal osteoblastic function in vivo and in vitro. *Endocrinology* *145*, 1376-1385.

Sims, N. A., Jenkins, B. J., Quinn, J. M., Nakamura, A., Glatt, M., Gillespie, M. T., Ernst, M., and Martin, T. J. (2004). Glycoprotein 130 regulates bone turnover and bone size by distinct downstream signaling pathways. *J Clin Invest* 113, 379-389.

Stahl, N., Boulton, T. G., Farruggella, T., Ip, N. Y., Davis, S., Witthuhn, B. A., Quelle, F. W., Silvennoinen, O., Barbieri, G., Pellegrini, S., and et al. (1994). Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components. *Science* 263, 92-95.

Stahl, N., Farruggella, T. J., Boulton, T. G., Zhong, Z., Darnell, J. E., Jr., and Yancopoulos, G. D. (1995). Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science* 267, 1349-1353.

Stahle-Backdahl, M., Sandstedt, B., Bruce, K., Lindahl, A., Jimenez, M. G., Vega, J. A., and Lopez-Otin, C. (1997). Collagenase-3 (MMP-13) is expressed during human fetal ossification and re-expressed in postnatal bone remodeling and in rheumatoid arthritis. *Lab Invest* 76, 717-728.

Starr, R., Willson, T. A., Viney, E. M., Murray, L. J., Rayner, J. R., Jenkins, B. J., Gonda, T. J., Alexander, W. S., Metcalf, D., Nicola, N. A., and Hilton, D. J. (1997). A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 387, 917-921.

Stephanou, A., Brar, B. K., Knight, R. A., and Latchman, D. S. (2000). Opposing actions of STAT-1 and STAT-3 on the Bcl-2 and Bcl-x promoters. *Cell Death Differ* 7, 329-330.

Stone, R. M., DeAngelo, D. J., Klimek, V., Galinsky, I., Estey, E., Nimer, S. D., Grandin, W., Lebwohl, D., Wang, Y., Cohen, P., et al. (2005). Patients with acute myeloid leukemia and an activating mutation in FLT3 respond to a small-molecule FLT3 tyrosine kinase inhibitor, PKC412. *Blood* 105, 54-60.

Strand, K., Murray, J., Aziz, S., Ishida, A., Rahman, S., Patel, Y., Cardona, C., Hammond, W. P., Savidge, G., and Wijelath, E. S. (2000). Induction of the urokinase plasminogen activator system by oncostatin M promotes endothelial migration. *J Cell Biochem* 79, 239-248.

Suda, T., Takahashi, N., and Martin, T. J. (1992). Modulation of osteoclast differentiation. *Endocr Rev* 13, 66-80.

Suda, T., Takahashi, N., Udagawa, N., Jimi, E., Gillespie, M. T., and Martin, T. J. (1999). Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 20, 345-357.

Sutherland, M. K., Geoghegan, J. C., Yu, C., Turcott, E., Skonier, J. E., Winkler, D. G., and Latham, J. A. (2004). Sclerostin promotes the apoptosis of human osteoblastic cells: a novel regulation of bone formation. *Bone* 35, 828-835.

Taga, T. (1996). Gp130, a shared signal transducing receptor component for hematopoietic and neuropoietic cytokines. *J Neurochem* 67, 1-10.

- Tai, G., Polak, J. M., Bishop, A. E., Christodoulou, I., and Buttery, L. D. (2004). Differentiation of osteoblasts from murine embryonic stem cells by overexpression of the transcriptional factor osterix. *Tissue Eng* *10*, 1456-1466.
- Takahashi-Tezuka, M., Yoshida, Y., Fukada, T., Ohtani, T., Yamanaka, Y., Nishida, K., Nakajima, K., Hibi, M., and Hirano, T. (1998). Gab1 acts as an adapter molecule linking the cytokine receptor gp130 to ERK mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol* *18*, 4109-4117.
- Tamura, S., Morikawa, Y., and Senba, E. (2003). Localization of oncostatin M receptor beta in adult and developing CNS. *Neuroscience* *119*, 991-997.
- Tanaka-Kamioka, K., Kamioka, H., Ris, H., and Lim, S. S. (1998). Osteocyte shape is dependent on actin filaments and osteocyte processes are unique actin-rich projections. *J Bone Miner Res* *13*, 1555-1568.
- Tanaka, M., Hirabayashi, Y., Sekiguchi, T., Inoue, T., Katsuki, M., and Miyajima, A. (2003). Targeted disruption of oncostatin M receptor results in altered hematopoiesis. *Blood* *102*, 3154-3162.
- Tanaka, T., and Umesaki, N. (2003). Oncostatin M inhibits decidualization of normal human endometrial stromal cells. *Int J Mol Med* *11*, 627-630.
- Tataria, M., Quarto, N., Longaker, M. T., and Sylvester, K. G. (2006). Absence of the p53 tumor suppressor gene promotes osteogenesis in mesenchymal stem cells. *J Pediatr Surg* *41*, 624-632; discussion 624-632.
- Tenzer, A., Zingg, D., Rocha, S., Hemmings, B., Fabbro, D., Glanzmann, C., Schubiger, P. A., Bodis, S., and Pruschy, M. (2001). The phosphatidylinositide 3'-kinase/Akt survival pathway is a target for the anticancer and radiosensitizing agent PKC412, an inhibitor of protein kinase C. *Cancer Res* *61*, 8203-8210.
- Thornborrow, E. C., and Manfredi, J. J. (1999). One mechanism for cell type-specific regulation of the bax promoter by the tumor suppressor p53 is dictated by the p53 response element. *J Biol Chem* *274*, 33747-33756.
- Timmermann, S., Lehrmann, H., Polesskaya, A., and Harel-Bellan, A. (2001). Histone acetylation and disease. *Cell Mol Life Sci* *58*, 728-736.
- Towler, D. A., Rutledge, S. J., and Rodan, G. A. (1994). Msx-2/Hox 8.1: a transcriptional regulator of the rat osteocalcin promoter. *Mol Endocrinol* *8*, 1484-1493.
- Toyosawa, S., Shintani, S., Fujiwara, T., Ooshima, T., Sato, A., Ijuhin, N., and Komori, T. (2001). Dentin matrix protein 1 is predominantly expressed in chicken and rat osteocytes but not in osteoblasts. *J Bone Miner Res* *16*, 2017-2026.

Turner, C. H., and Pavalko, F. M. (1998). Mechanotransduction and functional response of the skeleton to physical stress: the mechanisms and mechanics of bone adaptation. *J Orthop Sci* 3, 346-355.

van Bezooijen, R. L., Roelen, B. A., Visser, A., van der Wee-Pals, L., de Wilt, E., Karperien, M., Hamersma, H., Papapoulos, S. E., ten Dijke, P., and Lowik, C. W. (2004). Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. *J Exp Med* 199, 805-814.

Vasse, M., Pourtau, J., Trochon, V., Muraine, M., Vannier, J. P., Lu, H., Soria, J., and Soria, C. (1999). Oncostatin M induces angiogenesis in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19, 1835-1842.

Virchis, A., Ganeshaguru, K., Hart, S., Jones, D., Fletcher, L., Wright, F., Wickremasinghe, R., Man, A., Csermak, K., Meyer, T., *et al.* (2002). A novel treatment approach for low grade lymphoproliferative disorders using PKC412 (CGP41251), an inhibitor of protein kinase C. *Hematol J* 3, 131-136.

Wadayama, B., Toguchida, J., Shimizu, T., Ishizaki, K., Sasaki, M. S., Kotoura, Y., and Yamamuro, T. (1994). Mutation spectrum of the retinoblastoma gene in osteosarcomas. *Cancer Res* 54, 3042-3048.

Wagner, E. F. (2002). Functions of AP1 (Fos/Jun) in bone development. *Ann Rheum Dis* 61 *Suppl* 2, ii40-42.

Walczak, H., and Krammer, P. H. (2000). The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. *Exp Cell Res* 256, 58-66.

Wang, C., Fu, M., Mani, S., Wadler, S., Senderowicz, A. M., and Pestell, R. G. (2001). Histone acetylation and the cell-cycle in cancer. *Front Biosci* 6, D610-629.

Wang, X., Kua, H. Y., Hu, Y., Guo, K., Zeng, Q., Wu, Q., Ng, H. H., Karsenty, G., de Crombrughe, B., Yeh, J., and Li, B. (2006). p53 functions as a negative regulator of osteoblastogenesis, osteoblast-dependent osteoclastogenesis, and bone remodeling. *J Cell Biol* 172, 115-125.

Wang, Y., Robledo, O., Kinzie, E., Blanchard, F., Richards, C., Miyajima, A., and Baumann, H. (2000). Receptor subunit-specific action of oncostatin M in hepatic cells and its modulation by leukemia inhibitory factor. *J Biol Chem* 275, 25273-25285.

Wang, Z. Q., Ovitt, C., Grigoriadis, A. E., Mohle-Steinlein, U., Ruther, U., and Wagner, E. F. (1992). Bone and haematopoietic defects in mice lacking c-fos. *Nature* 360, 741-745.

Wennberg, C., Hessle, L., Lundberg, P., Mauro, S., Narisawa, S., Lerner, U. H., and Millan, J. L. (2000). Functional characterization of osteoblasts and osteoclasts from alkaline phosphatase knockout mice. *J Bone Miner Res* 15, 1879-1888.

- Westbroek, I., van der Plas, A., de Rooij, K. E., Klein-Nulend, J., and Nijweide, P. J. (2001). Expression of serotonin receptors in bone. *J Biol Chem* 276, 28961-28968.
- Wetterwald, A., Hoffstetter, W., Cecchini, M. G., Lanske, B., Wagner, C., Fleisch, H., and Atkinson, M. (1996). Characterization and cloning of the E11 antigen, a marker expressed by rat osteoblasts and osteocytes. *Bone* 18, 125-132.
- Wittrant, Y., Theoleyre, S., Chipoy, C., Padrines, M., Blanchard, F., Heymann, D., and Redini, F. (2004). RANKL/RANK/OPG: new therapeutic targets in bone tumours and associated osteolysis. *Biochim Biophys Acta* 1704, 49-57.
- Wu, X., McKenna, M. A., Feng, X., Nagy, T. R., and McDonald, J. M. (2003). Osteoclast apoptosis: the role of Fas in vivo and in vitro. *Endocrinology* 144, 5545-5555.
- Xu, M., Nie, L., Kim, S. H., and Sun, X. H. (2003). STAT5-induced Id-1 transcription involves recruitment of HDAC1 and deacetylation of C/EBPbeta. *Embo J* 22, 893-904.
- Yanagisawa, M., Nakashima, K., and Taga, T. (1999). STAT3-mediated astrocyte differentiation from mouse fetal neuroepithelial cells by mouse oncostatin M. *Neurosci Lett* 269, 169-172.
- Yasukawa, H., Misawa, H., Sakamoto, H., Masuhara, M., Sasaki, A., Wakioka, T., Ohtsuka, S., Imaizumi, T., Matsuda, T., Ihle, J. N., and Yoshimura, A. (1999). The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. *Embo J* 18, 1309-1320.
- Yoshimura, A., Ichihara, M., Kinjyo, I., Moriyama, M., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Hara, T., and Miyajima, A. (1996). Mouse oncostatin M: an immediate early gene induced by multiple cytokines through the JAK-STAT5 pathway. *Embo J* 15, 1055-1063.
- Zarling, J. M., Shoyab, M., Marquardt, H., Hanson, M. B., Lioubin, M. N., and Todaro, G. J. (1986). Oncostatin M: a growth regulator produced by differentiated histiocytic lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 9739-9743.
- Zeng, R., Aoki, Y., Yoshida, M., Arai, K., and Watanabe, S. (2002). Stat5B shuttles between cytoplasm and nucleus in a cytokine-dependent and -independent manner. *J Immunol* 168, 4567-4575.
- Zhang, X. G., Gu, J. J., Lu, Z. Y., Yasukawa, K., Yancopoulos, G. D., Turner, K., Shoyab, M., Taga, T., Kishimoto, T., Bataille, R., 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, 1337-1342.

Rôle de l'Oncostatine M dans la biologie de l'os et des ostéosarcomes

Oncostatine M, ostéosarcome, différenciation, apoptose, signalisation

Les traitements actuels des ostéosarcomes nécessitent la mise en place de nouvelles thérapies. L'Oncostatine M (OSM), une cytokine de la famille de l'Interleukine-6 capable de réduire la prolifération de lignées tumorales *in vitro*, est un candidat intéressant pour l'élaboration de nouveaux protocoles thérapeutiques, mais son rôle sur le tissu osseux et les ostéosarcomes demeure mal connu. Le but de cette thèse a été d'étudier les effets de l'OSM sur les cellules osseuses tumorales ou non. Une étude *in vitro* a tout d'abord montré que l'OSM, tout en inhibant la prolifération cellulaire, modifie le stade de différenciation des cellules, les conduisant vers un phénotype ostéocytaire. De plus, l'OSM sensibilise les cellules tumorales à l'apoptose induite par différents agents, dont la Staurosporine. Par la suite, des expérimentations animales ont suggéré que l'OSM pourrait être utilisé comme traitement adjuvant des ostéosarcomes.

Role of Oncostatin M in bone and osteosarcoma biology

Oncostatin M, osteosarcoma, differentiation, apoptosis, signal transduction.

New therapeutic approaches of osteosarcoma need today to be developed, because of the limits of the current treatments. Oncostatin M (OSM), a cytokine of the Interleukin-6 family able to reduce the proliferation of several tumor cell lines *in vitro*, is an interesting candidate for new therapeutic protocols. But its effects on bone tissue are not really known, and the aim of this thesis was to study the role of OSM on bone and osteosarcoma cells. An *in vitro* study has shown that OSM reduces the proliferation of osteosarcoma cells, and modify the state of differentiation, leading to an osteocytic phenotype. Moreover, OSM sensitizes osteosarcoma cells to apoptosis induced by different agents, including Staurosporin. After, *in vivo* experiments using a rat osteosarcoma model suggested that OSM could be used as an adjuvant treatment for osteosarcoma.

CHIPOY Céline

Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives – EA3822 – INSERM ERI7 – Faculté de Médecine, 1 rue G. Veil, 44035 Nantes cedex 01, France.