

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DE MÉDECINE ET PHARMACIE

ÉCOLE DOCTORALE DE BIOLOGIE-SANTÉ

BIOLOGIE DE L'INTERLEUKINE-34 ET RÔLE DANS LA PATHOGENÈSE DE L'OSTÉOSARCOME

THÈSE DE DOCTORAT

Biologie – Médecine – Santé
Biologie Cellulaire et Moléculaire

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Aude SÉGALINY

Le 29 octobre 2014, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs

M. LECRON Jean-Claude

Professeur des Universités, Praticien hospitalier, Poitiers

M. MUELLER Christopher

Directeur de recherche, CNRS, Strasbourg

Examineurs

Mme BOISSON-VIDAL Catherine

Directrice de recherche, CNRS, Paris

M. JACQUES Yannick

Directeur de recherche, CNRS, Nantes

M. FLEURY Fabrice

Professeur des Universités, CNRS, Nantes

Directeur de thèse

M. HEYMANN Dominique

Professeur des Universités, Praticien hospitalier, Nantes

À ma tante, Anne

À mon cousin, Arnaud

À mon grand-père, André

Remerciements



**Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et
Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives
INSERM UMR957**



UNIVERSITE DE NANTES

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et thérapie des tumeurs osseuses primitives (LPRO), INSERM UMR957.

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse, **Dominique Heymann**, pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse (une belle thèse* !) au sein de son laboratoire. Le choix de départ n'a certes pas été simple mais sache que je n'ai jamais regretté ma décision ! Merci d'avoir dirigé ce travail de thèse pendant ces trois courtes années, merci pour tes précieux conseils et pour m'avoir fait part de ton expérience et de tes nombreuses qualités scientifiques (« Je ne suis pas inquiet » !), notamment pour les soumissions des articles ! Merci pour ta patience lors de nos discussions scientifiques « brainstorming » et pour m'avoir fait confiance en me laissant expérimenter certaines idées ! Je retiendrai certaines maximes comme « un papier écrit est un papier publié », qui sera désormais mon adage ! Merci pour tout.

Je voudrais également remercier :

Messieurs **Jean-Claude Lecron** et **Christopher Mueller** qui me font un grand honneur en acceptant de rapporter ce travail de thèse.

Madame **Catherine Boisson-Vidal** pour avoir accepté d'être examinatrice au sein de mon jury de thèse, et pour les travaux que nous avons réalisés en collaboration sur l'angiogenèse.

Monsieur **Fabrice Fleury** et monsieur **Yannick Jacques** pour avoir accepté de juger ce travail de thèse en faisant partie de mon jury, mais également pour les discussions constructives que nous avons pu avoir au cours de mes comités de thèse. Je tenais particulièrement à remercier le Dr. Yannick Jacques pour nos travaux collaboratifs sur les diverses études d'affinités.

Tous les soutiens financiers, et plus particulièrement la Région des Pays de la Loire qui a financé ce travail de thèse à travers le projet CIMATH2.

Tous les membres du laboratoire, présents ou des années précédentes, que j'ai pu rencontrer, pour leur gentillesse, leur bonne humeur et leur soutien : **Amélie** (Ex-colloc du bureau 144 bis !), **Audrey R** (La reine des MSCs, impressionnante dans son rôle de Dark Vador en salle nude ! Merci de d'avoir embêté Mathias avec moi, je te fais confiance pour continuer sur cette lancer machiavélique !), **Benoît** (Qui fait de la concurrence à Fred niveau biblio !), **David** (Aucune pou-belle ne t'aura résisté!), **Eric, Florian** (As-tu breveté ta méthode express de congélation de cellules ?), **François G, Gaëlle, Jimmy** (L'expatrié de retour, on aura soutenu presque en même temps après avoir partagé plusieurs encadrants !), **Julien T** (Merci de m'avoir montré la transplantation et surtout les injections intra-péniennes pour ma culture personnelle, tu manies le pénis de rat mieux que personne...), **Julien S, Kosei** (Pour ton fameux « oooh », je crois que tu es celui qui aura le plus reproduit ses manips!), **Laurent** (Le roi de la débrouille, aussi doué en bricolage qu'en cuisine, et qui fait de supers meringues et de délicieuses confitures !), **Luis** (Le chilien le plus zen du monde qui ne se déplace jamais sans sa tribue ! À bientôt peut-être sur la côte Ouest...), **Manue, Marie-Françoise, Marie-Hélène, Marta** (une autre espagnole super, je suis ravie de t'avoir rencontrée ! Tu es sans conteste la fille la plus sportive que je connaisse-désolée camille. Ton énergie à toute heure du jour et de la nuit m'impressionnera toujours !), **Mathias** (Pour toutes tes blagues qui m'ont bien fait rire, tes petits mots sur mon PBS-désolée de te décevoir mais ce n'est pas le cas! Tu n'auras pas réussi à m'enfermer dans la réserve! Merci pour tes conseils d'homme- ce terme est peut-être exagéré vu la petitesse de l'engin...- qui a la main verte avec les cellules et fait du cytoo mieux que personne. Mais n'oublie pas, tout ce qui est petit n'est pas forcément mignon !). **Meadhbh** (Avec ton prénom et sa prononciation qui nous ont laissés dubitatifs au départ! Merci pour ces discussions passionnantes mi-anglaises, mi-françaises selon nos humeurs, et pour partager ma passion de l'Australie !), **Nathalie** (Bon courage pour ta thèse, j'espère qu'elle sera à ta hauteur !), **Olivier** (Le grand chbeb qui nous faisait bien marrer), **Pierre G, Soizic** (Pour nos luttes communes avec BG pour faire ressortir PERK et à comprendre où il était passé!), **Stéphane** (Merci de m'avoir fait découvrir la modélisation bioinformatique, c'est passionnant!), **Steven** (pour nos discussions rock'n roll et pour m'avoir fait découvrir ta Brière natale avec cette superbe promenade en chaland dans les marais !), **Thierry** (le tueur de brebis), **Thibaud** (Pour ces discussions très agréables que l'on a pu avoir, et tes précieux conseils scientifiques ou concernant le postdoc entre autres ! Dommage que tu ne sois pas arrivé plus tôt ! Mais par contre je t'en veux toujours pour m'avoir tuée un nombre incalculable de fois et ce de façon sournoise au laser game !), **Thulan, Véréna, Yannick**. Toutes mes excuses à ceux que j'ai pu oublier sur le coup, et que je remercie également.

La future génération de diplômés, **Audrey L. Romain**, et **Pierre A.** Audrey, ma blondasse difforme (tu comprendras), pour ta bonne humeur quotidienne et ton sourire Colgate ! S'il y a bien deux trucs que tu as de gros, ce sont le cœur et le cerveau ! Merci d'avoir supporté mes crises de pipite aigue et merci de m'avoir invitée à l'île aux moines (malgré cette persistance rétinienne que j'ai toujours suite à la baignade nocturne de Régis, et le fait que tu aies perdu un pied dans l'histoire !), ainsi que pour tous ces congrès partagés (cf. plus loin !), on a vraiment passé de bons moments ! Romain, alias le politicien, l'homme en bleu-blanc-rouge (jusqu'à la tasse de thé). Le premier je pense à avoir fait le coup de la panne de centri dans un L3 ! Merci pour tes nombreux services informatiques au service de la communauté, je crois que tout le monde reconnaît tes qualités de monteur (en tout bien tout honneur, bien évidemment). N'abandonne pas le footing, tu as du potentiel, et qui sait ça te servira peut-être un jour pour rattraper ton cheval ! Pierre (qu'on continuera toujours à appeler Pierre Avril malgré qu'il soit l'unique Pierre désormais), merci de partager mon humour vaseux (je ne te décerne pas la palme des blagues pourries, cet honneur étant réservé à Régis) ainsi qu'une bonne partie de mon répertoire musical ! Je crois que je t'ai battu dans l'organisation express de mariage (dans la catégorie non-conventionnel)...

L'autre génération de thésards, future relève du labo : **Benjam**, **Camille**, et **Marie-Astrid** ! Camille et Marie, les nouvelles profs d'histo ! Camille, essaie de ne pas trop déconcentrer les étudiants, surtout qu'ils risquent de te demander des autographes quand ils verront que c'est toi qui es affichée sur le mur de la Fac ! Et si jamais tu en as marre, tu pourrais bientôt te reconvertir en coach sportif ! Marie, car on se comprend dans la famille des interleukines (on comprend surtout notre douleur d'ailleurs, *private comment*) ! Surtout ne lâche rien, tu es sur la (les) bonne(s) voie(s), tu vas les valider ces marquages IHC, c'est toi la pro (*interleukin power!* 34, 36 ou 38, même combat). Garde bien précieusement la plaque magique, car elle pourra te servir là où tu l'attendras le moins ! Rien à voir mais il paraît que *Tupperware* commence à trembler car tu pourrais ouvrir ta propre société rien qu'avec votre stock perso ! Benjam, mon dernier colloc de bureau, prends bien soin de notre petit bananier surtout ! Mille mercis pour ton aide informatique, que ça soit de façon générale au sein du laboratoire, ou plus personnellement ! Les voies de l'informatique resteront définitivement impénétrables pour moi, j'aurai du écrire un bouquin avec tous les bugs possibles ! Merci en tout cas de m'avoir empêchée de balancer mon ordi par la fenêtre et pour ton aide et tes nombreux conseils dans ce domaine... L'informatique aurait eu raison de moi si je ne t'avais pas croisé ! Mais j'ai bien progressé je trouve (en partie grâce à toi) ! Tu sais maintenant ce qu'il te reste à faire (à ne pas faire en fait surtout !) pour dans deux ans ! Et surtout garde ton âme de « Tigrou », tu es quelqu'un de fantastique, ne t'énerve pas pour des futilités (pas comme j'ai pu le faire). Et peut-être que Dlx4 contrôle bien l'IL-34 qui sait... Vive les « 4 », pire que les « 2 » cf Fred ! La suite aux prochaines aventures (vive bp1 et le Northern Blot!).

Anne-Laure, ma deuxième « compagne » de thèse ! C'est la reine du BTP en culture cell, j'ai toujours admiré ces coupes minutieuses de complexes ! Il y aura du niveau pour te remplacer...Bon courage Kévin ! Je suis très contente de t'avoir rencontrée, tu auras été ma première voisine de bureau avec BG et également une de mes premières confidentes au labo (même si nous n'avons pas beaucoup dormi lors du premier forum des doctorants ! D'ailleurs tu auras pu constater l'évolution entre cette première discussion et la décision du mariage...). Merci pour les bons moments passés à tes côtés, et t'inquiète, on va bientôt l'arroser avec de bons vieux mojitos cette thèse !

Annie, Pierre L et Sandrine, nos voisins de bureau dont la (trop) bonne humeur quotidienne fait vibrer les murs ! Merci de nous avoir enfermés régulièrement dans notre bureau (un message pour que l'on reste bosser plus longtemps?). Annie, merci pour toutes ces supers discussions que l'on a pu avoir sur la vie en générale, j'ai vraiment apprécié ces courts moments de break ! Pierre, pour m'avoir tenue compagnie pendant les heures tardives au labo !

Audrey L, Franck et François L, le meilleur groupe de tourisme ! Je n'oublierai pas notre vîée à Prague (et, bien sûr, toutes les conférences !). Merci François pour tous tes conseils ici ou à l'étranger, tes trucs et astuces dans divers domaines ! Le roi de la débrouille, il y a un business parallèle à explorer ! Franck, le maffioso du labo, l'homme qui est né avec sa moustache (mais qui tend à disparaître ces derniers temps! Pourquoi tu la caches dans ta barbe ?). Je ne sais pas si ce sont nos racines italiennes qui font que nous avons le même appétit, mais en tout cas sans toi je me serai sentie seule à table (cochon grillé, brochettes géantes, et ne parlons pas de notre penchant pour certaines boissons que je ne citerai pas ici !).

Ben, Marco et Valérie, la team histo, version cours! Merci de nous avoir donné l'opportunité de pouvoir faire les TDs d'histo, et de nous avoir fait confiance pour la gestion de nos cours ! C'était également une belle expérience. Une petite mention spéciale au gossbo pharmaco, continue de porter la « check » veste et tout se passera bien ! Ben, avec qui on passe d'une discussion ou d'un débat hyper sérieux à une conversation totalement improbable pour finir sur une bonne rigolade ! Un grand merci à Valérie pour m'avoir initiée au clonage et appris à produire des lentivirus, merci pour ta franchise, tes nombreux conseils et ta gentillesse.

Bénédicte, merci d'avoir partagé l'accès à cette grotte sombre coupée du reste du monde qu'est la pièce du confocal, et un grand merci en particulier pour m'avoir aidée dans le screening de tous les anticorps en IF ! Et également merci pour le bananier, qui a bien grandi et s'épanouit visiblement bien dans notre bureau (petit bananier deviendra grand!). Continue d'embêter Mathias, il adooooore ça (surtout le rose, ça lui va bien au teint !).

Béné et **Fred B**, pour notre congrès chez les Limougeauds dans ma petite clio (j'espère que nous n'aurez pas eu trop peur !), continuez à profiter des JFBTMs comme il se doit ! Béné, merci pour toutes ces discussions en s122 et tes conseils pour l'organisation des mariages ! Ta réputation s'est avérée exacte, tu es vraiment super organisée et rigoureuse ! Je te souhaite beaucoup de bonheur avec ton biomec, j'espère qu'il assurera ! Fred, merci d'être toujours motivé pour organiser les différents événements, comme la fête de la science ! J'espère que vous réaliserez avec le labo d'autres belles journées comme celle du dimanche 21 septembre.

Bérenghère, alias BG, euh pardon docteur Gobin (Comment tu t'appelles ? Docteur Bérenghère ! Dis où c'est chez toi ? En salle 123 !), mon mentor (surtout pour le vivo, tu restes une maîtresse incontestée dans le domaine, tu en as maté des C57 rebelles !). Je crois définitivement qu'avec Dominique il faut maîtriser le WB (pffouah moins de 6 gels, c'est qu'dalle !! et en plus tu coupes même pas tes membranes en au moins trois morceaux !). La salle 123 est un peu triste sans toi, même s'il y a eu une immigration espagnole importante ! Merci pour tous ces bons moments de rigolade, et tes conseils pour ma thèse ! Merci de partager notre amour des m...os avec A-L!

Céline, Florian, Jérôme, Julie C et Rachel, la team histo, version technique ! Merci pour toute l'aide que vous pouvez nous apporter au quotidien, et un grand merci également à titre personnel pour avoir appris l'histo à vos côtés ! Un grand merci à Céline pour avoir formé Joséphine aux coupes de pattes de souris, à Jérôme pour son aide dans la validation des anticorps « at the little onion », et à Rachel qui nous a bien dépannés dans un moment de rush et qui a assuré, même si elle devait fournir de l'énergie pour deux !

Cyril, qui n'est pas vraiment du labo mais vient squatter le MEB de temps en temps, et **Laëtitia**, qui passe nous faire parfois un petit coucou (dommage tu commençais à rester de plus en plus avec nous !). Merci d'avoir apporté un peu de fraîcheur ainsi que pour ces bons moments passés en dehors, même si je crois que nous avons peut-être vécu ensemble l'ultime futsal de Cyril et le dernier laser game de Laëtitia...

Françoise, Fred L et Guylaine, merci pour votre gentillesse et votre bonne humeur, et pour la gestion (pas simple) de nos petites bêtes ! J'ai beaucoup apprécié nos différentes discussions scientifiques (et autres)! Fred, même si tu as toujours un mot drôle ou un nouveau surnom à me donner quand tu rentres dans le bureau, je ne te remercie pas d'avoir tué ma plante avec le super parfum de Benjam (par contre, elle attend toujours sa remplaçante, ça ne sert à rien de t'enfuir au Japon)!

Gilles, merci de m'avoir donné l'opportunité de découvrir la recherche, ce stage en Australie fut l'une des plus belles expériences de ma vie.

Gwenola, même si ça commence à dater, je n'ai pas oublié les bons moments que l'on a partagés ! Merci de m'avoir initiée à différentes techniques à mon arrivée au laboratoire, notamment la cytométrie, et de m'avoir aidée à gérer les nombreux clones de Régis (tiens j'ai oublié de te remercier pour ce petit cadeau de bienvenue que tu nous avais laissé Régio, des dizaines de plaques 96 puits à observer puits par puits !) mais aussi à analyser mes centaines de colonies ! Et tout ça dans la bonne humeur bien sûr!

Les stagiaires, en particulier **Joséphine** qui ne pouvait plus se passer de notre laboratoire depuis le BTS ! Ce fut très agréable de t'avoir comme stagiaire, toujours souriante et motivée, tu as fait du bon boulot ! Je te souhaite plein de bonnes choses pour la suite, continue comme ça, et surtout ne perds pas ta motivation.

Julie C, alias Ju, que j'ai rejointe lors du grand déménagement, avec qui on a installé ce petit bureau sympa, et qui m'a beaucoup manquée quand elle m'a abandonnée dans le bureau... D'ailleurs désolée mais ton bureau est beaucoup moins nickel depuis que je suis dessus, il y a un certain laisser-aller depuis ton départ de façon générale dans le bureau 144 ! Merci pour tous ces bons moments partagés, nos pauses thés... tu as su mettre ta touche de princesse dans ce labo, et il en reste toujours des traces un an après ! D'ailleurs tu étais un peu la reine de l'histo et personne n'a osé enlever cette magnifique coupe de crâne de souris colorée au trichrome qui reste, artistiquement et techniquement, une des plus belles colorations de l'U957 !

Julie T, mon premier mentor avant BG, alias Juju, ou rilette (tu comprendras ce que je veux dire, rappelle toi quartier St Mihe!) ou encore Rafiki (pour tous tes conseils et ces discussions empreintes de sagesse !). Avec ton rire unique repérable à l'autre bout du couloir et ta petite démarche si bien imitée par Marco ! Autres traits caractéristiques : toujours en débardeur même en hiver (je ferai bien une blague...) avec les pouces dans le jean et les fidèles converses ! Merci pour tous ces délires que nous avons pu avoir, surtout en culture, merci de m'avoir initiée au devenir de prof d'histo, et d'avoir été là pour moi surtout lors de cette première année ! Ta bonne humeur restera inégalable !

Kévin, alias Kéké (après le kéké des plages, le kéké de l'U957...). Sincèrement, même si tu as certainement les plus grosses chevilles de tout le labo (tu as aussi pris des bras depuis quelques temps !), un des mes regrets est que tu ne sois pas arrivé plus tôt... Personne ne porte sa blouse en relevant le col aussi bien que toi (woow le beau gosse... ça titre !!). Tu as su remonter (ou pas), le niveau humoristique du labo, en tous cas tu m'auras bien fait rigoler ! Même si tu es aussi extrêmement mauvais joueur (et ultra compétiteur ! mais c'est aussi ce côté perfectionniste qui fait que tes manips sont nickels avec des marquages hypers propres-merci Mr INOS !) ça va vraiment me manquer ces petites sessions mots croisés ... Je te laisse en souvenir THE S122's pen (si Régis ne l'a pas encore embarqué dans sa blouse ... euh sa quoi ?!?).

Lidia, mi querida español, mi compañera de tesis doctoral. Je suis ravie d'avoir partagé ces 3 ans de thèse avec toi, qu'est-ce qu'on a pu en faire des choses... Les petites virées sur les plages de Vendée ou les visites de Saint-Malo, Paris mais aussi Chartres (la ville de ma jeunesse !) lors de notre première année, jusqu'aux McFlurries pris lors de nos pauses rédactions cet été au labo ! Merci de m'avoir accompagnée pour défier les dieux du western blot, d'avoir partagé des soirées culture dans ta salle 123 pendant que j'étais en 122, d'avoir joué les survivors au laboratoire le we, ça faisait plaisir de traverser le couloir pour venir se changer les idées « Hey mademoiselle, vous êtes charmante ! ». Je reste bluffée par ton apprentissage de la langue française en un temps record, tu maîtrises bien tous les rudiments et les subtilités de la langue maintenant, ça en est impressionnant (mais je suis restée nulle avec mon « rrrr »)!

Marguerite, pour avoir partagé avec moi la complexité de l'IL-34 ! Bon courage pour la suite, et ne t'inquiète pas, si l'IL-34 fait des choses bizarres, c'est normal !

Martine, ma petite Martinette, toujours bienveillante (« fais voir ta main, il faut que tu mettes de la crème c'est plus possible ! »), et qui a un peu été notre mère à tous avec la gestion des primers, du réseau et de tellement de choses ! J'ai adoré commencer mes journées en t'entendant crier après nos bêtises, insulter le thermoclient et récemment maudire ton « bio-mec » qui t'a un peu déçue ! On n'aura jamais vu autant de dynamisme un matin à 8h, surtout en débardeur et armée d'un aspirateur dans le bureau du chef ! Un grand merci, tu auras été un pilier incontestable du laboratoire, et j'ai adoré te côtoyer (ma « deuxième maman » !).

Eric, mon « poteau » (le vrai, hein, pas le faux-ami que je me suis fait une fois en allant courir), encore une belle rencontre ! Le seul mec que je connaisse qui parte camper à l'arrache dans son hamac mais qui se nourrit de homards et de coquillages, et dont les filles disent « oh non papa encore du homard » ! Le Mac Gyver en tout genre, qui aura remis au goût du jour la salle 108 avec pleins de petits trucs et astuces... Dommage que tu ne sois pas arrivé plus tôt, tu m'aurais montré comment éviter de screener 150 colonies (je te sens sourire d'ici !). D'ailleurs la bio mol a connu son pic d'activité lorsque tu étais là, et la salle est redevenue bien calme désormais (sauf les éternels serial cloneurs). Merci aussi pour nos grands débats philosophiques sur la vie, la société ... Ta force de vie est exemplaire.

Régis, Régio, Reg alias chou chou (je t'aurais ton dernier surnom pour te préserver, mais sache que j'en rigole encore, d'ailleurs quand je serai parti tu seras « soulagé d'un gros poids* »)! Désolée d'avoir lancé malgré moi la blague des origines de Régis qui te suivra encore quelques temps je pense ! Merci pour ton soutien, ton aide et ton implication sur ce projet, même si rien n'a été simple et que tu finis avec quelques séquelles : neurones grillés, quelques cheveux en moins... (mais siii l'IL-34 a d'autres récepteurs ! et elle se fixe aussi au M-CSF ! aaaaah)! Et ce n'est pas fini (pour moi si, mais ça continue pour toi, prépare toi !). Même si ça n'a toujours pas été

concluant (c'est ça aussi la vraie science n'est-ce pas!), nous avons réalisé une belle synergie sur certaines manips (la fameuse manip de stim sur deux lignées en parallèle où l'on a à peine assez de 4 bras, et surtout les manips macrophages ! Je pense que je te manquerai quand même un peu au moins lors des fameux calculs de mix1, mix2... Souviens-toi, « on n'est jamais assez fort pour ce calcul* !! ». Et ne t'inquiète pas je suis sûre que tout ça servira un jour...J'en profite pour te remercier également pour ton dévouement au laboratoire (offres de sérums, nouveaux frigos, dépannage de facs en tous genres...mais aussi thés et café !), et pour les supers booms de Régio, inégalables et déraisonnables, j'en aurai vécu 3 (dont l'année où j'étais ta dyslexie souviens-toi !). Merci également pour tous ces bons moments au labo et en dehors, pour cette belle amitié qui nous lie, j'espère pour longtemps... Je suis heureuse de finir ma thèse sur cette bonne nouvelle te concernant, et je te souhaite plein de bonheur pour la suite !

Séverine et **Céline**, mes ex-colocataires du bureau 107 (j'ai du partir, trois blondes dans le même bureau ça faisait bien trop !). Un très grand merci à vous deux pour vos conseils et votre aide pour le microCT et l'histo ! Céline, faire une poche avec toi est un réel plaisir, le temps passe vite !

Mes « **vieux** » amis, en particulier nos « témouines » pour leur soutien sans faille sur tous les plans ! Merci d'être là au quotidien, les moments difficiles de cette année ont été beaucoup plus faciles à surmonter avec vous à nos côtés ! Et merci pour cet EVJF d'anthologie, ça a été très sympathique de « s'envoyer en l'air » tous ensemble ! Un grand merci au général Loulou pour avoir accompli sa mission plus que parfaitement, ton aide a vraiment été précieuse (ce cordonnier a vraiment été au top, et je n'aurai jamais pensé un jour jouer les filles de l'air de cette façon !).

Ma famille, et surtout mes parents, Frédéric et **Martine**, je vous dédie cette thèse, qui est indirectement le fruit de votre travail... Je ne vous remercierai jamais assez pour tout ce que vous avez fait pour nous depuis toutes ces années, vous avez vraiment été des parents exemplaires. Merci de m'avoir soutenue dans mes différents choix, aussi surprenants eussent-ils été, de m'avoir laissée prendre mes propres décisions sans jamais porter aucun jugement. Merci d'avoir toujours été présents lorsque nous avons eu besoin de vous, merci du fond du cœur... J'espère un jour pouvoir donner une éducation aussi belle et aussi complète à mes enfants, et je souhaite qu'ils puissent avoir une enfance aussi heureuse que la mienne ! Je vous aime de tout mon cœur...

Enfin, je voudrai dédicacer cette thèse à la personne fantastique qui partage ma vie (et partagera aussi mon nom officiellement dans quelques jours !), et qui me soutient chaque jour, **Audrey...** Merci d'être toujours là pour surmonter ces différentes épreuves, et ne t'inquiète pas, cette semaine riche en émotions va bien se dérouler ! Merci pour ce quotidien merveilleux à tes côtés, chaque jour est une nouvelle aventure, et mêmes les mauvais jours valent la peine d'être vécus à tes côtés... Je tenais également à te dire que je n'ai jamais regretté ma décision, même si c'est sûr que ça n'a pas été la chose la plus facile ! Bientôt un nouveau départ vers une contrée lointaine, mais je ne suis pas inquiète ça sera une belle aventure, car nous partons ensemble ! Avec tout mon amour et toute ma tendresse...

Sommaire

Liste des figures.....	I
Liste des tableaux	IV
Abréviations	V
Synthèse bibliographique	1
I. Récepteurs à activité tyrosine kinase, phosphatase et protéoglycanes.....	1
1. Généralités sur les récepteurs.....	1
2. Les récepteurs à activité tyrosine kinase et leurs cytokines	2
2.1. La famille des récepteurs à activité tyrosine kinase	2
2.2. Le M-CSFR : un récepteur à activité tyrosine kinase de type III	14
3. Les récepteurs à activité tyrosine phosphatase (RPTPs)	22
3.1. Généralités sur les protéines tyrosines phosphatases (PTPs)	22
3.2. La famille des PTPs.....	22
3.3. Les RPTPs : activation et signalisation	24
4. Les protéoglycanes : des régulateurs majeurs de l'activation des récepteurs membranaires.....	25
4.1. Les glycosaminoglycanes	25
4.2. Les protéoglycanes	26
II. L'interleukine-34 au sein de l'axe M-CSF/ M-CSFR	29
1. Les cytokines : généralités	29
2. La lignée myéloïde	29
2.1. Les différentes cellules de la lignée myéloïde.....	29
2.2. Les macrophages résidents ou activés	31
3. Le Macrophage Colony-Stimulating Factor (ou M-CSF).....	33
3.1. Caractérisation, structure et isoformes	33
3.2. Récepteurs et mode d'action	35
3.3. Distribution tissulaire, expression et rôle au sein de l'organisme	37
4. Découverte de l'interleukine-34: biologie comparée avec sa cytokine jumelle, le M-CSF.....	43
4.1. Caractérisation, structure et isoformes	43
4.2. Mode d'action/ voies de signalisation	45
4.3. Distribution tissulaire / expression dans l'organisme	48
4.4. Phénotype des souris KO IL-34 : comparaison	49
4.5. IL-34 : homéostasie tissulaire, immunité et inflammation.....	51
4.6. Régulation de la synthèse et de l'expression de l'IL-34.....	55
5. Conclusion : importance de l'IL-34 au sein de l'axe M-CSF/M-CSFR ?	56
III. Tissu osseux et pathologies associées : cas particulier de l'ostéosarcome	57
1. Le tissu osseux : un tissu dynamique en équilibre	57
1.1. Description.....	57
1.2. Le remodelage physiologique de l'os	65
1.3. Dérèglement de la balance apposition/résorption osseuse et pathologies.....	68
2. L'ostéosarcome	70
2.1. Description de la pathologie.....	70
2.2. Etablissement du cercle vicieux entre cellules tumorales et leur microenvironnement.....	77
Objectifs de la thèse	79

Chapitre 1 : rôle de l'interleukine-34 dans la pathogenèse de l'ostéosarcome .. 81

I. Introduction et rationnel de l'étude.....	81
1. Généralités : importance du microenvironnement tumoral	81
2. L'angiogenèse tumorale.....	82
2.1. Les acteurs de l'angiogenèse tumorale	82
2.2. Rôle du M-CSF dans l'angiogenèse	85
3. Recrutement leucocytaire sur la tumeur et polarisation des TAMs	85
3.1. TAMs et progression tumorale.....	85
4. Importance du M-CSF dans l'ostéosarcome et rôle de sa cytokine jumelle ?	88
II. Article n°1, résultats principaux et résultats complémentaires	90
1. Article 1 : International Journal of Cancer (en révision)	90
2. Figures supplémentaires de l'article et résultats complémentaires	104
2.1. Expression de l'IL-34 dans l'ostéosarcome	104
2.2. Rôle pro-tumoral de l'IL-34 dans un modèle murin d'ostéosarcome	108
2.3. L'IL-34 induit la formation de vaisseaux <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> et l'adhérence des leucocytes sur l'endothélium	112
2.4. Expression du M-CSFR dans les cellules d'ostéosarcome et développement tumoral.....	115
III. Conclusions et discussion	116

Chapitre 2 : le syndécan-1 est un récepteur de l'IL-34 119

I. Introduction et rationnel de l'étude.....	119
1. Les syndécans : des protéoglycanes membranaires complexes	119
1.1. La famille des syndécans : structure et expression tissulaire.....	119
1.2. Fonction des syndécans et signalisation	120
1.3. Le syndécan-1	121
2. Le M-CSFR : un récepteur commun au M-CSF et à l'IL-34	122
3. Le récepteur à activité tyrosine protéine phosphatase beta/zeta (RPTPβ/ζ).....	123
3.1. Identification et structure du RPTPβ/ζ.....	123
3.2. Expression et fonction des différentes formes	124
3.3. Activation et signalisation	124
3.4. Un nouveau récepteur pour l'IL-34.....	125
4. Existence d'autres récepteurs à l'IL-34 ?	125
II. Article n°2, résultats principaux et résultats complémentaires	127
1. Article n°2: BBA Molecular Cell Research (en révision)	127
2. Résultats complémentaires	139
III. Conclusions et discussion	142

Chapitre 3 : l'IL-34 forme une cytokine hétéromérique avec le M-CSF..... 145

I. Introduction et rationnel de l'étude.....	145
1. Le M-CSF et l'IL-34 : des cytokines homodimériques.....	145
2. Compétition pour le M-CSFR : caractérisation de la liaison.....	145
3. Interrelations fonctionnelles entre les deux cytokines ?.....	148
II. Article n°3, résultats principaux et résultats complémentaires	149
1. Article n°3: soumis pour publication.....	149
2. Résultats principaux.....	164
III. Conclusions et discussion	169

Discussion générale et perspectives	173
I. Rôle pro-angiogénique direct et indirect de l'IL-34 : quels acteurs moléculaires ?.....	173
II. Rôle du syndécan-1 dans l'effet pro-angiogénique de l'IL-34 ?	173
III. Rôle de l'IL-34 et du syndécan-1 dans le recrutement et l'adhésion des leucocytes.....	175
IV. Rôle pro-tumoral de l'IL-34 dans l'ostéosarcome : quels récepteurs ?	176
V. Mutations des RTKs et carcinogénèse.....	179
VI. Les inhibiteurs actuels ciblant les RTKs en cancérologie et problèmes posés	179
VII. Implication de l'axe M-CSF/M-CSFR en cancérologie : place de l'IL-34 ?	181
VIII. Ciblage du M-CSFR en cancérologie : les différentes stratégies actuelles	182
IX. Conclusion : ciblage de l'axe M-CSF/IL-34/M-CSFR dans les thérapies futures.....	185
Références bibliographiques	187

Liste des figures

Figure 1 : Les différentes familles de récepteurs à activité tyrosine kinase	3
Figure 2 : Structure générale des RTKs avec l'exemple de l'EGFR, du PDGFR et du complexe EGF/EGFR.....	4
Figure 3 : Activation du domaine kinase des RTKs suite à la fixation du ligand	6
Figure 4 : Activation de la voie MAPK ERK1/2 associée aux RTKs.	8
Figure 5 : Les trois « bras d'activation » principaux de la voie des MAPK : ERK, JNK, p38.	9
Figure 6 : Activation de la voie PI3K par les RTKs et régulations physiologiques.	11
Figure 7 : Boucles de rétrocontrôle régulant l'activation des RTKs.	13
Figure 8 : La famille des RTKs III.	14
Figure 9 : Structure du M-CSFR et de la protéine de fusion oncogénique M-CSFR RBM6.....	16
Figure 10 : Localisation des différentes tyrosines connues pour être phosphorylées lors de l'activation du M-CSFR et schéma des différentes étapes de l'activation du récepteur par le M-CSF.	17
Figure 11 : Les voies de signalisation activées par la liaison du M-CSF sur son récepteur dans la lignée myéloïde.	19
Figure 12 : Représentation schématique des différents types de RPTPs.....	24
Figure 13 : Structure chimique de l'unité disaccharidique composant les chaînes de chondroïtine sulfate/dermatane sulfate (à gauche) et les chaînes d'héparine/héparane sulfate (à droite)	25
Figure 14 : Différenciation de la lignée myéloïdes et en particulier des cellules mononuclées phagocytaires.	30
Figure 15 : Structure tridimensionnelle d'un dimère de M-CSF.	34
Figure 16 : Biosynthèse et localisation des trois formes du M-CSF produit par les cellules.	35
Figure 17 : Inhibition par le récepteur leurre BARE1 de la signalisation induite par la fixation du M-CSF sur le M-CSFR.	36
Figure 18 : Phénotype osseux des souris sauvages ou possédant une mutation inactivatrice sur le gène du M-CSF (<i>CSF-1^{op/op}</i>) ou une inactivation du gène du M-CSFR (<i>CSF-1R^{-/-}</i>).....	38
Figure 19 : Régulation des macrophages et des ostéoclastes par les diverses sources de M-CSF.	39
Figure 20 : Structures de l'IL-34 et du M-CSF.	45
Figure 21 : Structure du M-CSF et de l'IL-34 liées sur le M-CSFR.	46
Figure 22 : Expression de l'IL-34 dans divers tissus.	48
Figure 23 : Structure interne et externe d'un os long.	58
Figure 24 : Os cortical et os trabéculaire.	59
Figure 25 : La différenciation des cellules souches mésenchymateuses et la différenciation ostéoblastique.	59
Figure 26 : Morphologie des cellules ostéoblastiques.	60
Figure 27 : Observation d'un ostéocytes en microscopie électronique à balayage.	61
Figure 28 : La différenciation ostéoclastique.	61
Figure 29 : Morphologie des cellules ostéoclastiques.	62
Figure 30 : La résorption de l'os par l'ostéoclaste activé.	63
Figure 31 : Les différentes étapes du remodelage osseux.	67
Figure 32 : Les ostéosarcomes historiques.....	71
Figure 33 : Déséquilibre du remodelage osseux associé à l'ostéosarcome.....	72
Figure 34 : Aspect histologique des ostéosarcomes.....	72
Figure 35 : Les différentes étapes du diagnostic et de la prise en charge de l'ostéosarcome.	76

Figure 36 : Estimation du nombre de cellules tumorales résiduelles sur une pièce de résection d'un ostéosarcome de la hanche.	77
Figure 37 : Établissement du cercle vicieux entre cellules d'ostéosarcome et cellules ostéoformatrices.	78
Figure 38 : L'angiogenèse tumorale.	83
Figure 39 : Les macrophages associés à la tumeur déclenchent le processus angiogénique.	86
Figure 40 : Recrutement de leucocytes au niveau de l'endothélium et extravasation dans les tissus.	87
Figure 41 : Expression de M-CSF et d'IL-34 dans les lignées d'ostéosarcome.	104
Figure 42 : Supplementary Data 1 de l'article 1.	105
Figure 43 : Supplementary Data 2 de l'article 1.	105
Figure 44 : Supplementary Data 3 de l'article 1.	106
Figure 45 : L'expression du M-CSF et de l'IL-34 peut être induite par les cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IL-1 β de façon dose-dépendante dans la lignée U2OS.	107
Figure 46 : L'expression du M-CSF et de l'IL-34 est induite par les cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IL-1 β dans la lignée HOS de façon temps-dépendante.	107
Figure 47 : Supplementary Data 4 de l'article 1.	108
Figure 48 : Prolifération de la lignée parentale HOS et des lignées modifiées avec le vecteur vide (Mock), avec un vecteur codant pour le M-CSF humain (M-CSF), avec un vecteur codant pour l'IL-34 humaine (IL-34) ou avec un vecteur codant pour le M-CSFR humain (Fms).	109
Figure 49 : Supplementary Data 5 de l'article 1.	109
Figure 50 : Aspects des tumeurs et des métastases pulmonaires après euthanasie des souris.	110
Figure 51 : Exemple de marquage INOS sur une tumeur du groupe contrôle possédant quelques macrophages positifs. Les flèches noires indiquent des macrophages fortement positifs pour INOS.	110
Figure 52 : Analyse du volume osseux au niveau du tibia et du péroné dans l'expérience arrêtée à temps équivalent.	111
Figure 53 : Analyse du volume osseux au niveau du tibia et du péroné dans l'expérience arrêtée à volumes tumoraux équivalents.	112
Figure 54 : Supplementary Data 6 de l'article 1.	113
Figure 55 : Supplementary Data 7 de l'article 1.	113
Figure 56 : Cinétique d'expression du SDF-1 après stimulation au FGF-2, M-CSF et IL-34 et tubulogénèse en présence de l'AMD3100 qui bloque le CXCR4, le récepteur principal du SDF-1.	114
Figure 57 : Les monocytes stimulés au M-CSF ou à l'IL-34 produisent des chimiokines pro-angiogéniques.	114
Figure 58 : Cinétique de développement tumoral de cellules HOS exprimant le récepteur au M-CSF (HOS Fms) ou exprimant le vecteur vide correspondant.	115
Figure 59 : La famille des syndécans.	119
Figure 60 : Le M-CSF et l'IL-34 partagent un récepteur commun, le M-CSFR.	122
Figure 61 : Activation du M-CSFR par le M-CSF et l'IL-34 dans la lignée érythroblastique TF-1 modifiée pour exprimer le récepteur.	122
Figure 62 : Les trois formes de RPTP β/ζ	124
Figure 63 : Supplementary data 1 article 2.	139
Figure 64 : Supplementary data 3 de l'article 2.	140
Figure 65 : Supplementary data 3 de l'article 2.	141
Figure 66 : La fibronectine permet la formation d'un complexe syndécans/intégrines.	143
Figure 67 : Structure tridimensionnelle des cytokines jumelles homodimériques.	145
Figure 68 : Structure de l'IL-34 fixée au niveau des domaines D2-D3 du M-CSFR.	147

Figure 69 : Supplementary Figure 1 de l'article 3.	162
Figure 70 : Supplementary Figure 2 de l'article 3.	165
Figure 71 : Supplementary Figure 3 de l'article 3.	165
Figure 72 : Supplementary Figure 4 de l'article 3.	166
Figure 73 : Supplementary Figure 5 de l'article 3.	167
Figure 74 : Supplementary Figure 6 de l'article 3.	167
Figure 75 : Marquages immunohistochimiques de l'IL-34 sur les coupes de tibia de souris portant la tumeur.	175
Figure 76 : Rôle potentiel du syndécan-1 dans le recrutement, l'adhérence et l'activation des cellules myéloïdes et des cellules endothéliales.	176
Figure 77 : Rôle de l'IL-34 dans le cercle vicieux établi entre l'ostéosarcome et le microenvironnement tumoral.	178
Figure 78 : Les stratégies de ciblage de l'axe M-CSF/IL-34/M-CSFR.....	184

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principaux tissus exprimant le M-CSFR	21
Tableau 2 : Composition et structure des quatre classes de PTPs.	22
Tableau 3 : Expression du M-CSF et de l'IL-34 dans différents organes.....	37
Tableau 4 : Surexpression du M-CSF et de l'IL-34 dans de nombreuses pathologies.....	42
Tableau 5 Comparaison des phénotypes des souris <i>CSF-1R^{-/-}</i> , <i>CSF-1^{op/op}</i> , et <i>IL-34^{LacZ/LacZ}</i>	50
Tableau 6 : Les facteurs permettant le couplage entre la formation et la résorption osseuse.	66
Tableau 7 : Les tumeurs osseuses bénignes et malignes.....	70
Tableau 8 : Les différents types d'ostéosarcomes. D'après (Yarmish <i>et al.</i> 2010).....	73
Tableau 9 : Liste non exhaustive des principaux facteurs stimulant ou inhibant l'angiogenèse.	82
Tableau 10 : Expression comparée du M-CSFR et du RPTP β/ζ dans différents tissus.	124
Tableau 11 : Expression du syndécan-1 membranaire déterminée par cytométrie en flux.....	141
Tableau 12 : Affinités du M-CSF et de l'IL-34 pour le M-CSFR mesurées par différentes techniques.	146

Abréviations

<p>Å: Angström</p> <p>ADN: Acide désoxyribonucléique</p> <p>AMPc: Adénosine monophosphate cyclique</p> <p>Ang-1: Angiopoïétin-1</p> <p>APRIL: A proliferation-inducing ligand</p> <p>AP-1: Activating Protein-1</p> <p>Arg-1: Arginase-1</p> <p>ARN: Acide Ribonucléique</p> <p>ADP/ATP: Adénosine diphosphate/ Triphosphate</p> <p>BAD: Bcl-2-associated death promoter</p> <p>BAFF: B-cell activating factor</p> <p>BARF1: BamH1-a reading frame-1</p> <p>Bcl-2: B-cell lymphoma 2</p> <p>BFU-E: Blast forming unit</p> <p>BMP: Bone morphogenic protein</p> <p>BSP: Bone sialoprotein</p> <p>CA: Carbonic anhydrase-like</p> <p>CCR2: C-C chemokine receptor type 2</p> <p>CDK: Cyclin dependant kinase</p> <p>CFU(-GM): Colony Forming Unit (-Granulocyte Macrophage)</p> <p>CH2: Cdc25 homology region 2</p> <p>CMH: Complexe majeur d'histocompatibilité</p> <p>CNTF: Ciliary neutrophic factor</p> <p>CREB: C-AMP response element-binding protein</p> <p>Csk: C-src kinase</p> <p>CSF: Colony-stimulating factor</p> <p>C-term: Région carboxy-terminale</p> <p>CXCR4: Chemokine receptor type 4.</p> <p>DEG: Delayed Early Gene</p> <p>DFG motif: Motif Asp-Phe-Gly</p> <p>DMP-1: Dentin matrix protein-1</p> <p>DSP: Dual specificity phosphatase</p> <p>DSP/DSTP: Dithio-bis (Succinimidyl Propionate).</p> <p>EBV: Epstein-Barr Virus</p> <p>EC: Ectodomaine</p> <p>EC₅₀: Median effective concentration</p> <p>ECFC: Endothelial colony forming cell</p> <p>ED: Endodomaine</p> <p>EDTA: Acide éthylène diamine tétraacétique</p> <p>EGF: Epidermal Growth Factor</p> <p>EGFR/ErbB: Epidermal Growth Factor Receptor/v-avian erythroblastic leukemia viral oncogen homolog</p> <p>EMR-1 (F4/80): EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1</p>	<p>ERK1/2: Extracellular signal-regulated kinase 1/2</p> <p>ERK5: Extracellular signal-regulated kinase 5</p> <p>EWS: Ewing sarcoma</p> <p>Eya: Eyes absent homolog</p> <p>FAK: Focal Adhesion Kinase</p> <p>FDR: False discovery rate</p> <p>FGF(R): Fibroblast growth factor (receptor)</p> <p>FIRE: Fms-intronic regulatory element</p> <p>FLT3: Fms-like tyrosine kinase 3 receptor</p> <p>FLT3L: FLT3 ligand</p> <p>FMIP: Fms-integrating protein</p> <p>FN: Fibronectin</p> <p>Gab2/3: Grb2-associated binder 2/3</p> <p>GAP: GTPase-activating protein</p> <p>GAG: Glycosaminoglycane</p> <p>Gal: Galactose</p> <p>GalNAc: N-acetylgalactosamine</p> <p>GDP/GTP: Guanosine diphosphate/ triphosphate</p> <p>GEF: Guanine exchange factor</p> <p>GEO: Gene expression omnibus</p> <p>GlcA: Acide glucuronique</p> <p>GlcNAc: N- acetylglucosamine</p> <p>GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony- stimulating factor</p> <p>GMPC: Guanosine monophosphate cyclique</p> <p>GDP/GTP: Guanosine diphosphate/ triphosphate</p> <p>Grb2: Growth receptor binding protein 2</p> <p>GSK3: Glycogen synthase kinase 3</p> <p>Gp130: Glycoprotein 130</p> <p>HER2: Human epidermal growth factor receptor 2</p> <p>HGF(R, MET): Hepatocyte growth factor (receptor)</p> <p>HIF-1α: Hypoxia inductible factor-1α</p> <p>HUVEC: Human umbilical vein endothelial cell</p> <p>IBA-1: Ionized Ca²⁺-binding adaptor protein-1</p> <p>IdoA: Acide iduronique</p> <p>IEG: Immediate Early Gene</p> <p>IFN: Interferon</p> <p>IGF(R): Insulin-like growth factor (receptor)</p> <p>IgG: Immunoglobuline</p> <p>IGF2BP1: Insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 1</p>
--	--

IL-...: Interleukin-...	OSM: Oncostatin M
INOS: Inducible nitric oxide synthase	PAG: Phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains
JAK/STAT: Janus kinase/signal transducers and activators of transcription	PBM: PDZ binding motif
JM: Juxtamembranaire	PDB: Protein data bank
JNK: c-Jun N-terminal kinase	PDGF(R): Platelet-derived growth factor (receptor)
K_D: Constante de dissociation à l'équilibre	PK1: Phosphoinositide-dependent kinase-1
kDa: kiloDalton	PDZ: Post-synaptic density protein 95, drosophila disc large tumor suppressor 1, and zonula occludens-1 protein
KIT (SCFR): Mast/stem cell growth factor receptor	PFA: Paraformaldéhyde
KO: Knocking-out	PGE2: Prostaglandine 2
LDL: Low density lipoprotein	PH: Pleckstrin homology
LIF: Leukemia inhibitory factor	PIGF: Placenta growth factor
LPS: Lipopolysaccharide	PI3K: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
MAM: Meprin, A2, RPTPμ homology	PKB: Protein kinase B (Akt)
MAPK: Mitogen-activated protein kinase	PKC: Protein kinase C
MAYP/PSTPIP2: Macrophage actin-associated and tyrosine-phosphorylated protein	PIP2: Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
MCP-1: Monocyte chemoattractant protein-1	PIP3: Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
M-CSF(R): Macrophage-colony stimulating factor (receptor)	PLCγ: Phospholipase Cγ
MDM2: Mouse double minute 2 homolog (E3 ubiquitin-protein ligase)	PMA: Phorbol-12-myristate-13-acetate
MEC: Matrice extracellulaire	PP2A: Protein phosphatase 2A
MEF2: Myocyte enhancer factor 2	(N)PTP: (Non-receptor) Protein tyrosin phosphatase
MEK1/2: Map-erk-kinase1/2 (MAP2K1/2)	PTPN1: Protein-Tyrosine Phosphatase Non-receptor type 1
MEKK (MAP3K): MAP kinase kinase kinase	PTB: Phosphotyrosine binding domain
MITF: Microphthalmia-associated transcription factor	PTH(rp): Parathormone (relatide protein)
MLK: Mixed-lineage kinase	PTEN: Phosphatase and tensin homolog
MMP: Metalloprotease	PTN: Pleiotrophin
MPK: MAPK phosphatase	qPCR: Quantitative polymerase chain reaction
MSC: Mesenchymal stem cell	RAF: Rapidly accelerated fibrosarcoma
MT1 – MMP: Membrane type 1 matrix metalloprotease	RANK(L): Receptor activator of nuclear factor κ B (ligand) (TRANCE pour TNF-related activation-induced cytokine)
mTor: Mammalian target of rapamycin	RAS: Rat sarcoma
mTORC1/2: mTOR Complex 1/2	RPTP: Receptor protein tyrosin phosphatase
NFATc1: Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1	RSK1/2: Ribosomal S6 kinase
NF-κB: Nuclear factor-kappa B	RTK: Receptor tyrosin kinase
NGF: Nerve growth factor	RUNX2: Runt-related gene 2
NK: Natural killer	SCF: Stem cell factor
OC: Osteocalcin	SDF-1: Stromal cell-derived factor 1 (CXCL-12)
OCP: Précurseur ostéoclastique	SFK: Src family kinase
OMS : Organisation mondiale de la santé	SH2/3: Src homology 2/3
OPG: Osteoprotegerin	
OPN: Osteopontin	

SH3B: Src homology 3 domain binding motif
SOS: Son of sevenless
SPR: Résonance plasmonique de surface
S6K: S6 kinase
TACE: TNF-converting enzyme
TAK1: Transforming growth factor- β -activated kinase 1
TAM: Tumor associated macrophage
TEM: TIE2 expressing macrophage
TIE2: Tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains, angiopoietin receptor
TGF α/β : Transforming growth factor α/β
TLR: Toll-like receptor
TIMP: Tissue inhibitor of metalloproteases
TK: Tyrosine kinase
TM: Transmembrane
TMA: Tissue microarray
TNF- α/β : Tumor necrosis factor- α/β
T/OC: Trophoblast osteoclast
TrkA: Tropomyosin-receptor-kinase A
TRAIL: Tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand
TRAP: Tartrate resistant acidic protein
TrkA: Neurotrophic tyrosine kinase receptor type 1, High affinity nerve growth factor receptor, TRK1-transforming tyrosine kinase protein
VE-PTP: Vascular endothelial protein tyrosine phosphatase
VDR: Vitamin D receptor
VEGF(R): Vascular endothelial growth factor (receptor)
Xyl: Xylose

Synthèse bibliographique

I. Récepteurs à activité tyrosine kinase, phosphatase et protéoglycane

1. Généralités sur les récepteurs

Afin d'assurer leur rôle physiologique, de répondre aux signaux transmis et de s'adapter aux changements qui peuvent avoir lieu dans leur microenvironnement, les cellules doivent être capables de recevoir et d'intégrer les différents messages. Ces communications entre les cellules et leur environnement sont permises grâce à la fixation de molécules (les messagers) sur leurs récepteurs (les effecteurs). En effet, comme le soulignait Ehrlich en 1910 : « **Pour qu'une substance puisse agir, elle doit se fixer** ». Ces récepteurs sont localisés principalement au niveau de la membrane plasmique des cellules, bien qu'il existe aussi des récepteurs intracytoplasmiques comme les récepteurs aux hormones stéroïdes, pouvant être transloqués dans le noyau pour réguler l'expression de gènes. Les récepteurs membranaires possèdent une partie extracellulaire hydrophile, souvent glycosylée qui reconnaît le ligand, une partie hydrophobe transmembranaire qui permet l'enchâssement au sein de la bicouche lipidique de la membrane plasmique, et une partie intracytoplasmique servant à la transduction du signal au sein de la cellule. La fixation du ligand sur son récepteur est spécifique, réversible et implique un grand nombre de liaisons de faible énergie (hydrogènes, ioniques, hydrophobes, de Van der Waals). Ainsi, à l'équilibre, la vitesse de dissociation est égale à la vitesse d'association. La constante de dissociation (K_D) correspond à la concentration en ligand pour laquelle la moitié des récepteurs est occupée, et témoigne donc de l'affinité du récepteur pour son ligand. En général, la fixation du ligand sur son récepteur est dite de forte affinité si la constante K_D est inférieure à 10^{-8} M (10 nM). Il faut noter que les concentrations locales en ligands sont généralement comprises entre 10^{-9} et 10^{-11} M.

Il existe **six types de récepteurs**, porteurs d'une activité enzymatique intrinsèque (les récepteurs à activité kinase ou phosphatase, et les récepteurs à activité guanylyl cyclase) ou non (les récepteurs couplés aux protéines G, les récepteurs type « canal », et les autres récepteurs à cytokines).

Les **récepteurs à activité guanylyl cyclase** sont les récepteurs des peptides natriurétiques, de l'oxyde nitrique, du monoxyde de carbone et des entérotoxines. La fixation du ligand sur la partie extracellulaire induit l'activation de la guanylate cyclase intracellulaire du récepteur, entraînant la synthèse d'un second messager, la GMPc à partir de GTP pour activer des protéines kinases AMPc dépendante (Garbers, Koesling, et Schultz 1994).

Les **récepteurs couplés aux protéines G** à sept domaines transmembranaires dont les protéines G trimériques situées sous la membrane plasmique transduisent et amplifient le signal entre

le récepteur activé par son ligand et les protéines de signalisation intracellulaire, via la production d'AMP cyclique. Ils incluent les récepteurs à chimiokines (ou chémokines) (Bhattacharya, Babwah, et Ferguson 2004) .

Les **récepteurs type « canal ionique »** sont des canaux ioniques ligands dépendants dont l'activité canal dépend de la fixation spécifique d'un ligand. Ces récepteurs peuvent être ionotropiques ou métabotropiques. Dans le premier cas, le récepteur est réellement le pore, et s'ouvre suite à un changement de conformation permis par la fixation du ligand. Au contraire, dans le cas des récepteurs métabotropiques, le récepteur activé par le ligand active un canal indépendant par l'intermédiaire d'effecteurs intracellulaires (Li, Wong, et Liu 2014).

Les **récepteurs cytokiniques** ne portant pas d'activité enzymatique peuvent être divisés en quatre groupes : les récepteurs possédant un ectodomaine de type immunoglobuline (récepteur à l'IL-1 α/β , récepteur à l'IL-18), les membres trimériques de la superfamille du récepteur au TNF (qui comprennent par exemple RANK, les récepteurs à TRAIL, les récepteurs du TNF- α/β), les récepteurs à cytokines de classe I (ou récepteur des hématopoïétines) (Liongue et Ward 2007) ou de classe II (ou récepteur des interférons et de l'IL-10) (Langer, Cutrone, et Kotenko 2004). Les récepteurs à cytokines de classe I/II présentent des structures oligomériques, où une chaîne α spécifique sert à la reconnaissance du ligand tandis qu'une ou deux chaînes (β/γ) servent à la transduction du signal. Ainsi, les récepteurs des interleukines (IL) 2, 4, 7, 9 et 15 sont constitués d'une chaîne spécifique à la cytokine, et de la chaîne γ_c du récepteur à l'IL-2. De plus, les récepteurs à l'IL-2 et à l'IL-15 sont trimériques et partagent également la chaîne β . L'IL-3, l'IL-5 et le GM-CSF se lient sur une chaîne α spécifique, tandis qu'une chaîne β commune sert à la transduction du signal, conduisant à une réponse biologique proche. Les récepteurs de la famille de l'IL-6 ne dérogent pas à cette règle puisqu'ils partagent la chaîne polypeptidique gp130 pour l'IL-6, l'IL-11, le CNTF, l'OSM et le LIF.

2. Les récepteurs à activité tyrosine kinase et leurs cytokines

2.1. La famille des récepteurs à activité tyrosine kinase

2.1.1. Classification et structure

Les protéines kinases sont des enzymes clés de la régulation des divers processus cellulaires. Elles catalysent le transfert d'un groupe phosphate (P) de l'ATP sur un groupe hydroxyle des acides aminés sérine, thréonine et tyrosine. Parmi les 90 gènes identifiés codant pour des protéines à activité tyrosine kinase, 58 codent pour des récepteurs répartis en vingt sous-familles (**Figure 1**) (Robinson, Wu, et Lin 2000). Les plus connues sont les six premières classes, avec les familles de l'EGFR/ErbB (classe I), du récepteur à l'insuline (classe II), du PDGFR (classe III), du FGF (classe IV) du VEGF (classe V) et du récepteur à l'HGF/MET (classe VI).

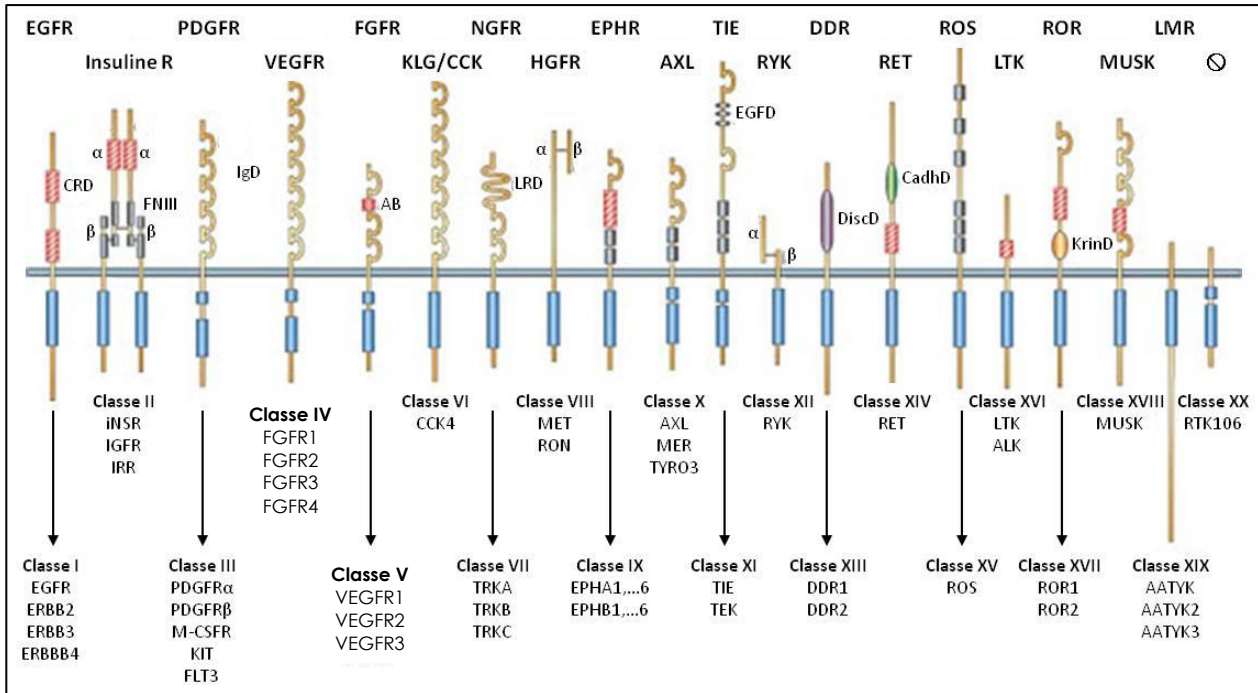


Figure 1 : Les différentes familles de récepteurs à activité tyrosine kinase

α et β désignent deux sous-unités distinctes des récepteurs. AB: domaine acide, CadhD: domaine cadherine, CRD: domaine riche en cystéines, DiscD: domaine discoidine, EGFD: domaine EGF, FNIII: domaine fibronectine de type III, IgD: domaine immunoglobuline, KrinD: domaine kringle, LRD: domaine riche en leucines. Adapté de (Blume-Jensen et Hunter 2001).

Ces RTKs sont des récepteurs de type I, possédant un unique domaine transmembranaire séparant la partie extracellulaire du domaine intracellulaire. De manière générale, ceux-ci possèdent un **domaine N-terminal extracellulaire** hautement glycosylé et riche en ponts disulfures qui sert à la reconnaissance du ligand. La composition de ces **ectodomains (EC)** varie entre les vingt classes de RTKs, définissant ainsi la spécificité des ligands : domaines immunoglobulines, riches en leucines ou lysines/cystéines, domaine fibronectine de type III, etc. De plus, ce domaine extracellulaire est impliqué dans la dimérisation du récepteur (**Figure 2**). L'insertion du récepteur dans la membrane est permise grâce à un **domaine transmembranaire (TM)** en hélice α constitué d'une vingtaine d'acides aminés. Ce segment transmembranaire ne joue pas uniquement un rôle d'ancrage, puisque son importance a aussi été montrée dans la formation et la stabilisation du dimère. En effet, une fois mises dans l'environnement lipidique de la membrane, les hélices α s'oligomérisent de façon non-covalente (Arkin 2002). Ainsi, les hélices α des domaines transmembranaires permettent une pré-dimérisation des RTKs au sein de la membrane plasmique, comme démontré dans la famille de l'EGFR (Moriki, Maruyama, et Maruyama 2001). Le **domaine intracytoplasmique** (ou **endodomaine ED**) possède une activité de protéine tyrosine kinase et catalyse la phosphorylation ATP-dépendante de protéines cibles. Il comprend une **région juxtamembranaire (JM)** de 40 à 80 acides aminés, le **domaine à activité tyrosine kinase (TK)** et la **région carboxy-terminale (C-term)**.

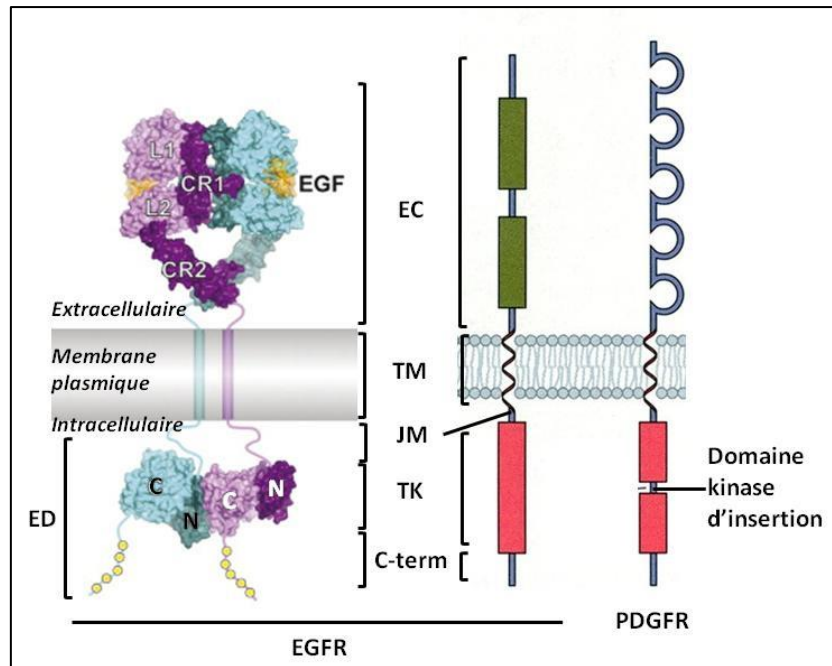


Figure 2 : Structure générale des RTKs avec l'exemple de l'EGFR, du PDGFR et du complexe EGF/EGFR.

Un RTK est composé d'un ectodomaine ou domaine extracellulaire (EC), d'un domaine transmembranaire (TM) et d'un domaine intracellulaire ou endodomaine (ED). L'endodomaine comporte la région juxta-membranaire (JM), le domaine à activité tyrosine kinase (TK) qui peut être divisé en deux par un domaine kinase d'insertion, et le domaine C-terminale (C-term). Le complexe EGF : EGFR de stoechiométrie 2 : 2 présente une symétrie axiale verticale. Les deux monomères de récepteurs sont colorés respectivement en violet et en cyan, et les molécules d'EGF sont représentées en jaune. Les quatre parties de l'ectodomaine sont notées L1/CR1/L2/CR2. Les deux lobes N- et C- des domaines tyrosines kinases intracytoplasmiques forment un dimère asymétrique, et l'interaction d'un lobe C d'un domaine kinase avec un lobe N active le domaine kinase du deuxième lobe C. Les sphères jaunes du domaine C-terminal représentent les résidus tyrosines impliqués dans le recrutement d'autres protéines. Structures extraites des PDB suivants : 11VO, 1NQL (ectodomaine) et 1M14 (domaine kinase). Adapté de (Hubbard et Till 2000) et <http://dc224.4shared.com/doc/DuWSZ5cy/preview.html>.

Le domaine TK est fait de douze sous-domaines, répartis en deux lobes et reliés entre eux par le domaine kinase d'insertion (sous-domaine V) (**Figure 2**). Le domaine TK comprend une boucle d'activation dont l'orientation (et la phosphorylation) détermine l'état actif ou inactif du domaine kinase (**Figure 3**). L'ATP nécessaire à l'activité kinase se loge entre ces deux lobes, et le petit lobe (N, pour N-terminal, sous-domaines I à IV), composé de feuillets β et d'une hélice α , fixe, stabilise et oriente l'ATP complexée aux ions Mg^{2+} . Le grand lobe (C, pour C-terminal, sous-domaines VI à IX) est quant à lui principalement composé d'hélices α , et participe à la chélation de l'ATP par le Mg^{2+} , lie le substrat protéique contenant les tyrosines cibles, et catalyse le transfert du P de l'ATP vers celui-ci (Hubbard et Till 2000). Il faut noter que la taille du domaine TK est relativement constante entre les différents RTKs. Au contraire, la taille et le contenu des domaines l'encadrant (JM, C-term) sont très variables entre les familles de RTKs, leur conférant une spécificité propre dans la génération et la propagation des signaux intracellulaires. Ainsi, le domaine intracellulaire du PDGFR β possède 552 acides aminés, celui de l'EGFR 542 acides aminés, tandis que le FGFR1 en possède 425, et le récepteur TrkA seulement 356. Le nombre de résidus tyrosines

(phosphorylables ou non) ainsi que leur répartition sont également très différents entre les RTKs. En effet, le PDGFR β compte 27 tyrosines (dont 19 phosphorylables) contre seulement 11 pour TrkA (avec 6 tyrosines phosphorylables) (Bradshaw *et al.* 2013). Cependant, une paire de tyrosines très proches l'une de l'autre, et phosphorylées après l'activation des RTKs est retrouvée au niveau de la boucle d'activation chez ces différents membres, et est requise pour la fonctionnalité du récepteur. En effet, des mutations affectant ces tyrosines rendent le domaine kinase inactif, puisque leur activation sert à stabiliser la conformation ouverte de la boucle d'activation et des deux lobes, permettent la liaison de l'ATP et du substrat peptidique (Hubbard et Till 2000). Une troisième tyrosine située un peu en amont joue également un rôle dans le changement de conformation de la boucle d'activation. Seul l'EGFR fait figure d'exception puisqu'il ne possède qu'un résidu tyrosine à cet endroit, et l'activation de cette tyrosine n'est pas essentielle à la fonction kinase du récepteur.

2.1.2. Fonctionnement général

Dans la majorité des cas, la fixation d'un ligand dimérique sur ces récepteurs entraîne le rapprochement ou la stabilisation de deux chaînes réceptrices qui vont alors s'autophosphoryler l'une et l'autre via leur domaine kinase (phosphorylation *trans*). En effet, cette dimérisation non-covalente permet des changements de conformation qui rendent les domaines kinases cytoplasmiques des récepteurs actifs. Un monomère de récepteur va alors *trans*-phosphoryler spécifiquement les tyrosines cytoplasmiques de l'autre monomère (Lemmon et Schlessinger 2010). Cependant, certains récepteurs comme celui de l'insuline existent déjà sous forme dimérique. De plus, certains ligands comme l'EGF sont monomériques (**Figure 2**), et leur fixation induit un changement de conformation qui déplace la boucle intramoléculaire, exposant un domaine de liaison sur le récepteur, entraînant ainsi sa dimérisation (Ogiso *et al.* 2002). La dimérisation peut donc se faire uniquement par contact entre les récepteurs, ou au contraire par contact entre les ligands, comme c'est le cas pour TrkA où l'unique lien entre les monomères de récepteur passe par la dimérisation du NGF (Bradshaw *et al.* 2013). Néanmoins, la dimérisation est généralement un mélange entre ces deux mécanismes. En absence de ligand, la boucle d'activation auto-régule l'activation du récepteur, puisque sa conformation fermée permet d'inhiber l'activité catalytique du récepteur (inhibition en *cis*). La fixation du ligand sur le RTK et sa dimérisation induisent une rotation du lobe N autour du lobe C et du grand axe de la protéine. Ce changement de conformation ouvre le site actif, puisque la boucle d'activation qui masquait le site de fixation à l'ATP avec ses résidus tyrosines se déplace pour permettre la liaison de l'ATP et l'autophosphorylation des résidus tyrosines de la chaîne réceptrice opposée (**Figure 3**). Tout d'abord, la phosphorylation *trans* de résidus tyrosines clés au sein de la boucle d'activation stabilise la conformation ouverte, et rompt les liaisons qui existent entre ces tyrosines et les sites de

liaison aux substrats protéiques, permettant l'accès au lobe C et conférant alors sa pleine activité à la kinase.

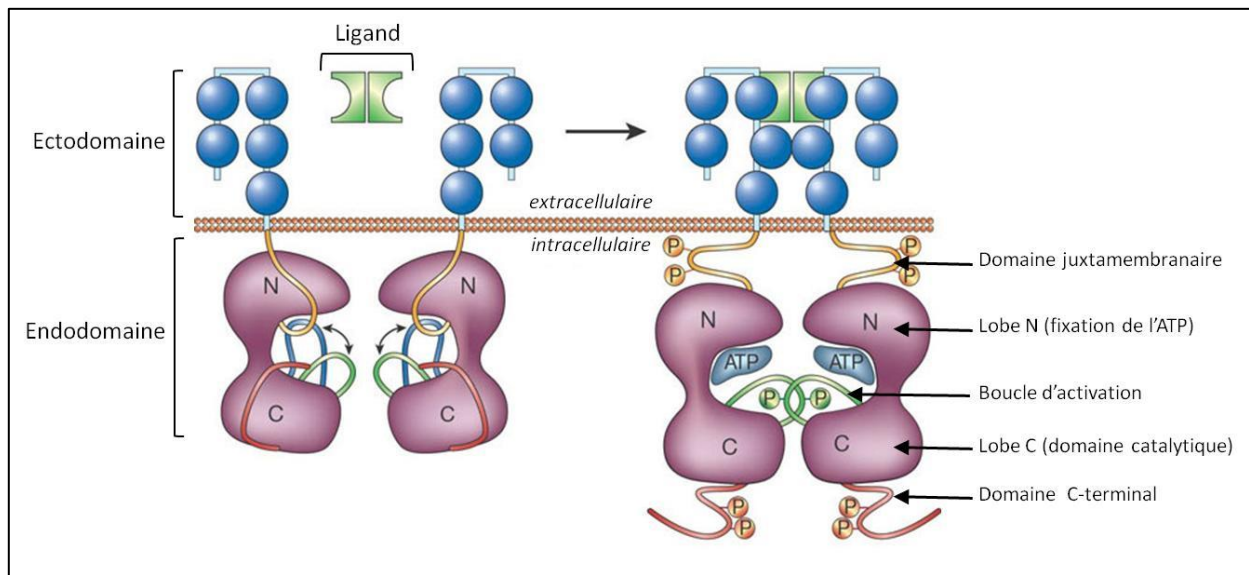


Figure 3 : Activation du domaine kinase des RTK suite à la fixation du ligand

À gauche : En absence d'une stimulation extérieure, le récepteur se trouve dans une conformation « fermée » où son activité kinase est fermement réprimée. La boucle d'activation est en équilibre entre un état fermé (en bleu) et une conformation ouverte (en vert). Les domaines juxtamembranaire et C-terminal jouent également un rôle dans l'inhibition de l'activité kinase et l'accessibilité du substrat. À droite : La dimérisation induite par le ligand suivie de la *trans*-phosphorylation du récepteur entraînent un changement de conformation de la boucle d'activation, et permettent de lever les contraintes stériques exercées par les régions juxtamembranaire et C-terminale. Tiré de (Blume-Jensen et Hunter 2001).

Par ailleurs, l'autophosphorylation du récepteur peut aussi se faire en *cis* sur certains sites des régions JM ou C-term. De plus, certains résidus tyrosines des RTKs ne sont pas phosphorylables alors que d'autres sont phosphorylés par des protéines kinases recrutées sur les tyrosines phosphorylées du récepteur (Hubbard 2002). D'autres types de freins moléculaires de l'activité kinase existent en plus de celui exercé par la boucle d'activation, et la liaison de l'ATP peut aussi être inhibée par les domaines JM (KIT, PDGFR) ou C-term (TIE2). Dans ces deux derniers cas, ces freins moléculaires seront levés par *cis*-phosphorylation du récepteur lors de son changement de conformation engendré par la fixation du ligand (**Figure 3**) (Lemmon et Schlessinger 2010).

La phosphorylation du domaine catalytique des RTKs active et augmente l'activité du domaine kinase, tandis que celle des domaines non-catalytiques crée des sites d'ancrage pour les cibles cytoplasmiques impliquées dans la transduction du signal intracellulaire. Ces tyrosines sont majoritairement localisées au niveau des domaines JM et C-term, et au niveau du domaine kinase d'insertion (Hubbard et Miller 2007). Des protéines sont alors recrutées sur les résidus tyrosines phosphorylés, permettant la liaison, l'activation et la phosphorylation de protéines intracytoplasmiques qui vont alors relayer le signal dans diverses voies d'activation intracellulaire. Ces protéines possèdent des domaines SH2 ou PTB qui reconnaissent les tyrosines phosphorylées du récepteur, et peuvent avoir une activité enzymatique intrinsèque, comme Src ou la phospholi-

pase $C\gamma$, ou servir simplement de protéines adaptatrices pour le recrutement d'autres enzymes, comme Grb2 qui permet l'activation de la voie des MAPK. La formation de complexes protéiques se fait grâce à d'autres domaines comme SH3 capables de reconnaître des motifs protéiques ou phospholipidiques (Pawson 2002). Les protéines recrutées par leur domaine SH2 sont dites « adaptatrices », tandis que celles qui se lient directement au récepteur ou sur la protéine adaptatrice Grb2 par l'intermédiaire de leur domaine PTB sont appelées « protéines d'ancrage ». Ces dernières possèdent un domaine homologue de la pleckstrine (PH) ou un site de myristoylation en position N-terminale permettant leur liaison à la membrane plasmique. Les protéines adaptatrices ou d'ancrage peuvent se partager la fixation sur une même tyrosine phosphorylée, ou une même protéine peut se fixer sur plusieurs résidus du même récepteur, comme Gab1 sur la tyrosine¹⁰⁶⁸ et la tyrosine¹⁰⁸⁶ de l'EGFR. Les récepteurs à l'insuline et au FGF lient un assemblage de protéines, qui une fois phosphorylées servent elles-mêmes de protéines adaptatrices (Liu et Rohrschneider 2002). Les RTKs sont considérés comme des plateformes protéiques, point de départ de nombreux signaux cellulaires, en recrutant sur leur endodomaine soit directement des effecteurs enzymatiques ($PLC\gamma$, PI3K, Src, etc) soit des protéines adaptatrices (Grb2, Shc, etc) qui forment des complexes capables d'activer des enzymes intracellulaires (Ras, etc). Les voies de signalisation activées par les RTKs sont principalement la voie des MAPK, la voie PI3K et celle de Src, ainsi que d'autres voies de signalisation impliquant la $PLC\gamma$, JAK/STAT, etc. Alors que les premières étapes de la transduction du signal qui suivent l'activation du récepteur reposent principalement sur la phosphorylation de tyrosines, la propagation du signal dans les vingt minutes qui suivent repose sur la modification de résidus sérine/thréonine dans la majorité des processus cellulaires, ainsi que sur d'autres processus comme l'ubiquitination, l'acétylation ou la glycosylation (Choudhary et Mann 2010). L'activation des RTKs active des processus physiologiques variés, comme la prolifération cellulaire en favorisant la progression dans le cycle cellulaire grâce à l'activation de la cycline D1 par exemple, ainsi que la transcription et la régulation de gènes activant la prolifération cellulaire et inhibant l'apoptose. Les RTKs sont également impliqués dans la survie et la différenciation cellulaire, la migration, l'adhésion, le remodelage du cytosquelette, etc.

2.1.3. Activation et voies de signalisation associées

2.1.3.i. La voie des MAPK

La voie des MAPK permet d'orienter le devenir de la cellule vers la prolifération, la mort cellulaire ou la différenciation, et favorise la migration et l'angiogenèse. La cascade de signalisation des MAPK se sépare en quatre branches majeures dont celle de ERK1/2, principalement utilisée par les RTKs pour la transduction du signal (**Figure 4**). Après activation du RTK par son ligand, la protéine adaptatrice Grb2 va se fixer par son domaine SH2 aux résidus tyrosines phosphorylés du récepteur et à la protéine adaptatrice SOS par son domaine SH3, elle-même liée au PIP₂ membranaire par son domaine PH. Cette liaison permet l'activation de la petite protéine G sous-membranaire Ras par sa liaison au GTP grâce à SOS, qui est une protéine GEF échangeant le GDP contre un GTP. Ras redevient inactive suite à l'hydrolyse du GTP en GDP par les protéines GAP. Ras oscille donc entre son état actif et inactif, jouant ainsi le rôle « d'interrupteur » des molécules intracellulaires effectrices. Une fois activée, Ras phosphorylée permet la transduction du signal par le recrutement et la phosphorylation des kinases RAF A, B ou C (ou MAP3K) (Cseh, Doma, et Baccharini 2014). RAF activée va alors phosphoryler MEK1 et MEK2 (ou MAP2K1/2) sur les résidus sérine 218/222²¹⁸ et sérine 222/226 de leur boucle d'activation, et MEK1/2 activée catalyse elle-même la phosphorylation de Erk1 et Erk2 (ou MAPK1/2) sur leurs thréonines 202/185 et leurs tyrosines 204/187. Erk1/2 phosphorylée va ensuite être transloquée dans le noyau pour activer des facteurs de transcription qui réguleront la transcription de gènes impliqués dans la survie et la croissance des cellules et leur progression dans le cycle cellulaire, ou bien activer des protéines cytosoliques comme RSK1/2 qui cibleront des effecteurs cytoplasmiques ou seront également transloquées dans le noyau pour agir comme facteur de transcription (Roskoski Jr. 2012).

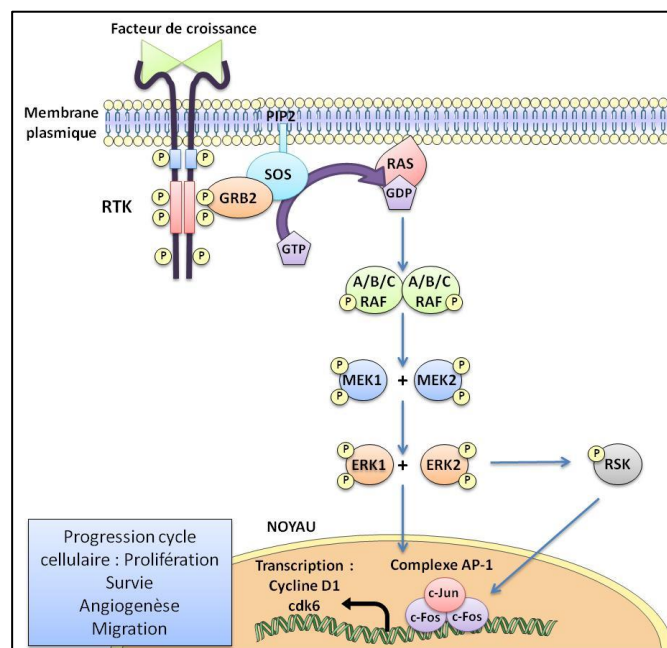


Figure 4 : Activation de la voie MAPK ERK1/2 associée aux RTKs.

Les cibles de ces facteurs de transcription sont des régulateurs transcriptionnels comme STAT, Elk-1, CREB ou encore l'histone H3 qui active la transcription de gènes précoces, dits IEGs comme *c-Fos*, *c-Myc* ou *c-Jun*. L'expression de ces IEGs stimule elle-même l'expression de gènes comme ceux de la cycline D1 ou de CDK6 qui permettent la progression en phase G1 et la transition G1/S. Si l'activation du RTK, et donc de Erk1/2 est maintenue, l'expression des protéines précédentes est stabilisée, comme *c-Fos* qui est phosphorylée sur ses résidus thréonines par RSK1/2 et ERK1/2, et forme avec *c-Jun* le complexe AP-1 qui active également la transcription de gènes cibles (**Figure 4**). La voie des MAPK active également trois autres sous-voies, p38, JNK, et ERK5 (**Figure 5**).

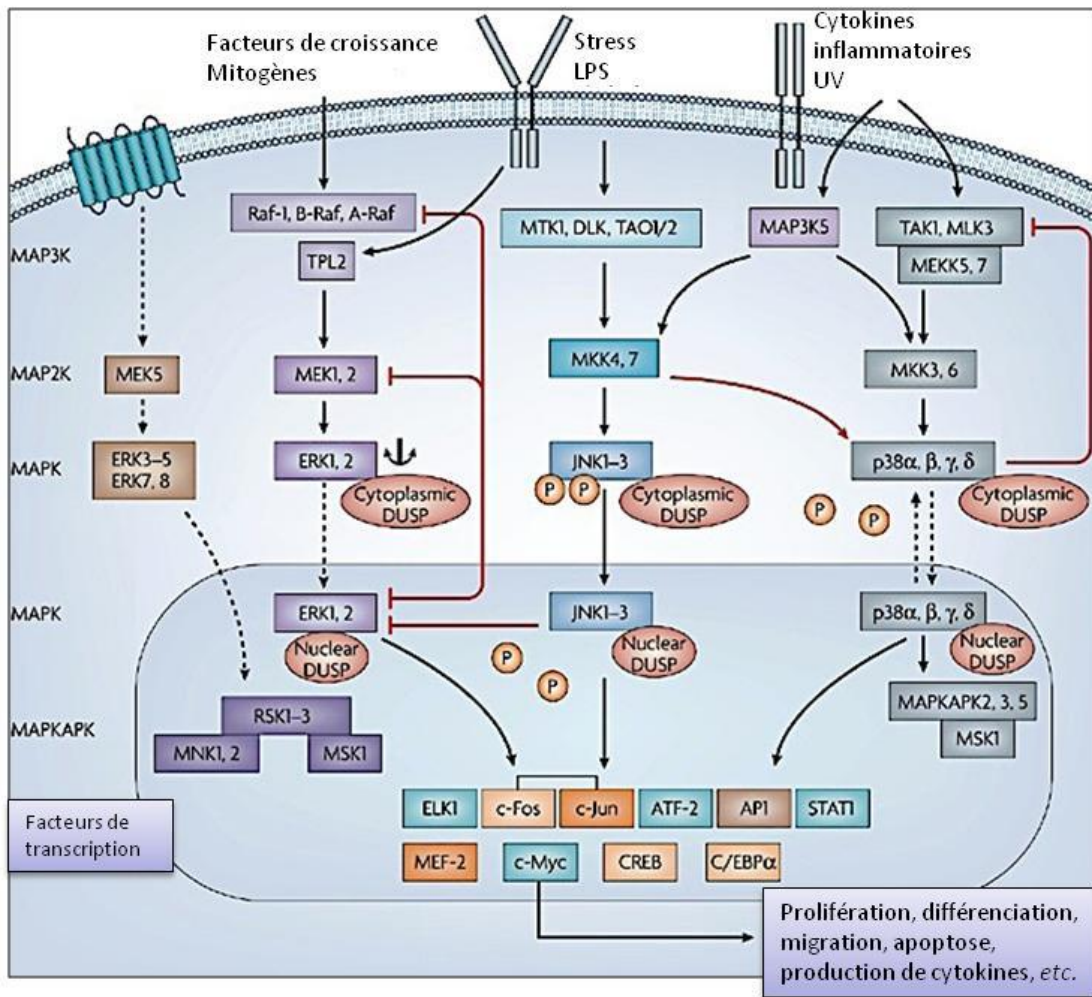


Figure 5 : Les trois « bras d'activation » principaux de la voie des MAPK : ERK, JNK, p38.

Dans le cas des RTKs, la cascade de signalisation est initiée grâce à des protéines adaptatrices et des petites protéines de liaison au GTP non représentées sur ce schéma qui transmettent le signal aux MAP3Ks. Chaque voie possède trois niveaux d'activation : MAP3K, MAP2K et MAPK. Une fois phosphorylées, les MAPKs (ERK, JNK ou p38) transloquent dans le noyau pour activer différentes réponses cellulaires comme la prolifération ou la migration. La plupart des MAPKs sont activées par la phosphorylation duale sur des résidus tyrosines ou thréonines. Le signal est régulé par des phosphatases duales (DUSP sur le schéma) qui déphosphorylent les MAPKs sur leurs résidus tyrosines et thréonines pour les rendre inactives. Les flèches rouges indiquent les boucles de rétrocontrôle ou de communication entre les différentes cascades d'activation. D'après (Jeffrey *et al.* 2007).

Néanmoins, p38 et JNK sont plutôt activées par des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α ou l'IL-1 β après induction d'un stress cellulaire (choc osmotique, hypoxique, stress oxydatif, etc.). Dans le premier cas, p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$ est activée par une MAP2K comme MKK3 ou MKK6, qui a elle-même été activée par une MAP3K comme TAK1, et p38 active la transcription de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, l'angiogenèse, l'inflammation et la production de cytokines immunomodulatrices. Dans le deuxième cas, les MAP3Ks TAK1, MEKK1, ou MLK activent les MAP2Ks MAP2K4 ou MAP2K7, qui activent elles-mêmes JNK1,2 ou 3, conduisant par exemple à l'apoptose ou au développement de cellules du système immunitaire (Raman, Chen, et Cobb 2007). Dans la voie ERK5, WNK1 active MEKK2 et 3, qui phosphoryle MEK5, activant alors ERK5. La translocation dans le noyau de ce dernier régule la survie et la prolifération cellulaire, en activant de la même façon que Erk1/2 la transcription de la cycline D1 par exemple, qui permet la transition G1/S dans le cycle cellulaire. ERK5 possède aussi des substrats plus spécifiques comme la famille des facteurs de transcription MEF2, la protéine pro-apoptotique BAD, la connexine 43, etc. (Cargnello et Roux 2011).

2.1.3.ii. La voie PI3K

Cette voie appelée communément PI3K/Akt contrôle la progression dans le cycle cellulaire et la balance survie cellulaire/apoptose. Son activation favorise la prolifération et la migration cellulaire, le métabolisme du glucose, etc. La PI3K est une « lipide » kinase qui phosphoryle les lipides membranaires via sa sous-unité catalytique p110 (α , β ou δ) une fois recrutée par les deux domaines SH2 de sa sous-unité régulatrice p85 sur les RTKs activés. Le PIP₂ donne alors du PIP₃ par transfert d'un phosphate, et Akt (ou Protéine Kinase B) ainsi que PDK-1 viennent se lier à la membrane, où la PDK-1 est activée par le PIP₃ et phosphoryle Akt. La protéine Akt activée devient alors un carrefour d'activation pour de nombreuses protéines (**Figure 6**), permettant notamment la survie cellulaire en inhibant, ubiquitinant et dégradant des protéines pro-apoptotiques comme BAD, p53 et induisant l'expression de protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 ou même Akt elle-même. De plus, Akt induit également la prolifération cellulaire en stimulant le cycle cellulaire par l'activation des cyclines et l'inhibition des inhibiteurs du cycle cellulaire comme p21 ou p27. Akt permet aussi la transcription de gènes pro-angiogéniques comme ceux du VEGF et de HIF-1 α . Par ailleurs, Akt inhibe le métabolisme du glucose en réprimant la GSK3, et régule également le métabolisme lipidique grâce à mTor (Song, Ouyang, et Bao 2005).

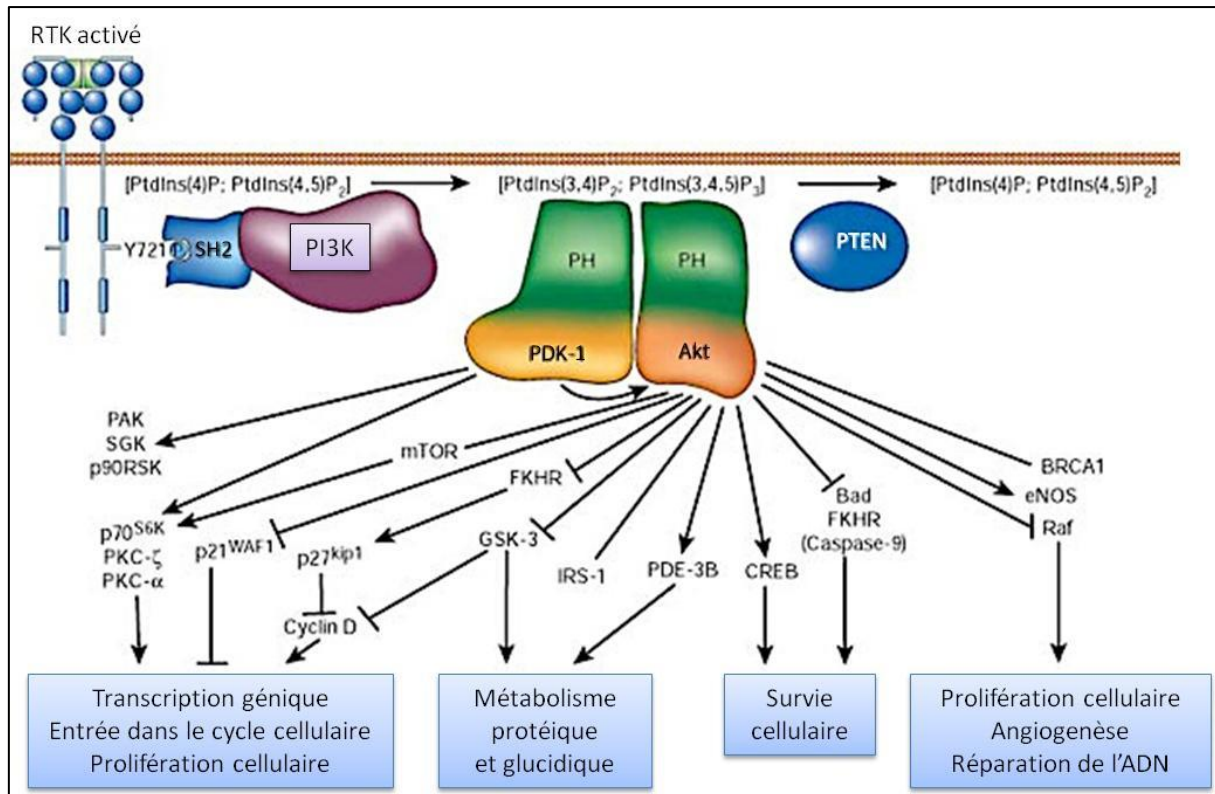


Figure 6 : Activation de la voie PI3K par les RTK et régulations physiologiques.

Adapté de (Blume-Jensen et Hunter 2001).

2.1.3.iii. La voie Src

Le rôle de Src dans la transmission du signal au sein de la cellule a été mis en évidence pour la première fois dans des fibroblastes stimulés au PDGF (Ralston et Bishop 1985). Les tyrosines kinases membres de la famille de Src (SFKs) comme Src, Fyn ou Yes sont activées par les RTKs, et s'associent avec de nombreuses enzymes comme Ras, PI3K, la PLC γ ou encore les FAKs. Les SFKs possèdent donc des fonctions redondantes dans les voies de signalisation intracellulaire décrites ici. Les SFKs sont recrutées sur les RTKs (EGFR, FGFR, IGFR, M-CSFR, HGFR *etc.*) suite à leur activation, et transmettent des signaux mitogènes à l'origine de la synthèse d'ADN, de la survie cellulaire, de remaniements du cytosquelette, de l'adhésion et de la motilité cellulaire, et contrôlent aussi le turn-over du récepteur (Bromann, Korkaya, et Courtneidge 2004). Ces SFKs s'associent via leur domaine SH2 aux résidus tyrosines phosphorylés, ce qui entraîne un changement de conformation des protéines leur conférant leur activité kinase. Cependant, cette activation semble plus complexe puisque Goi *et al.* ont montré qu'elle nécessitait le recrutement des GTPases Ras et Ral. De plus, la protéine tyrosine phosphatase Shp2 semble également jouer un rôle phare dans cette activation puisqu'elle empêche l'accès aux SFKs de leur régulateur négatif, Csk, en déphosphorylant la protéine de liaison à Csk, PAG (Goi *et al.* 2000). Les signaux régulés par les SFKs se font à plusieurs niveaux, puisque ces enzymes inhibent par exemple un régulateur majeur de la synthèse d'ADN, la protéine p53. De la même manière, les SFKs activés augmentent

l'expression du facteur de transcription Myc (Blake *et al.* 1999; Furstoss *et al.* 2002). Les SFKs peuvent également réguler des effecteurs cytoplasmiques comme la PKC δ dont l'inhibition lève la répression transcriptionnelle de certains gènes (Furstoss *et al.* 2002). Par ailleurs, plusieurs études ont démontré que les SFKs pouvaient réguler directement l'activation des RTKs en phosphorylant certains résidus tyrosines, comme les tyrosines 845 et 1101 de l'EGFR (Biscardi *et al.* 1999). De plus, c-Src peut être recrutée au sein de complexes membranaires formés par les intégrines, pour phosphoryler ensuite ces RTKs (Moro *et al.* 2002).

2.1.3.iv. Les autres voies (PLC γ , JAK/STAT)

Le clivage du PIP₂ par la PLC γ donne du diacylglycérol (DAG) qui active la protéine kinase C (PKC), et de l'inositol triphosphate (IP₃) qui entraîne le relargage intracytoplasmique de calcium Ca²⁺ contenu dans le réticulum endoplasmique après fixation sur son récepteur. Cette augmentation de la concentration intracellulaire en calcium active par exemple la calmoduline, qui recrute elle-même RAF pour activer la voie des MAPK. La PKC possède de nombreux substrats, notamment des protéines effectrices de la voie MAPK (Patterson *et al.* 2005).

Certains RTKs sont également capables de fixer sur leurs tyrosines phosphorylées les facteurs de transcription STAT grâce à leur domaine SH2, comme STAT3 sur MET. L'activation de ces protéines va entraîner leur dimérisation, puis leur translocation dans le noyau pour activer des gènes cibles spécifiques (Trusolino, Bertotti, et Comoglio 2010).

2.1.4. Rétrocontrôle des RTKs

L'activité des RTKs est contrôlée par de nombreuses boucles de **rétrocontrôle positif** ou **négatif**. Les boucles d'autoactivation prolongent l'activation du récepteur et l'amplitude du signal, par exemple par la production autocrine du ligand. L'existence de boucles de rétrocontrôle négatif (**Figure 7**) est donc majeure pour stabiliser le système (Freeman 2000). Ces mécanismes de contrôle incluent des protéines déjà présentes au sein de la cellule qui sont mobilisées suite à l'activation des RTKs et/ou subissent des modifications post-traductionnelles pour aller immédiatement réguler le signal engendré (**rétrocontrôle négatif précoce**), mais reposent également sur la synthèse d'éléments de réponse (**rétrocontrôle négatif tardif**) comme les gènes précoces (IEGs) ou tardifs (DEGs) qui régulent l'activité d'AP-1 ou de protéines majeures comme c-Myc, p53 ou celles des MAPK. Ainsi, Erk1/2 qui se trouve en aval de la voie MAPK inhibe directement (rétrocontrôle négatif précoce) la phosphorylation des protéines effectrices de la voie en inhibant l'activité kinase des enzymes en amont, RAF et MEK (Santos, Verveer, et Bastiaens 2007). De plus, la translocation de Erk1/2 dans le noyau peut également activer l'expression de répresseurs de la transcription, ou de phosphatases comme les DSPs pour inhiber l'activité MAPK (rétrocontrôle négatif tardif) (Amit *et al.* 2007).

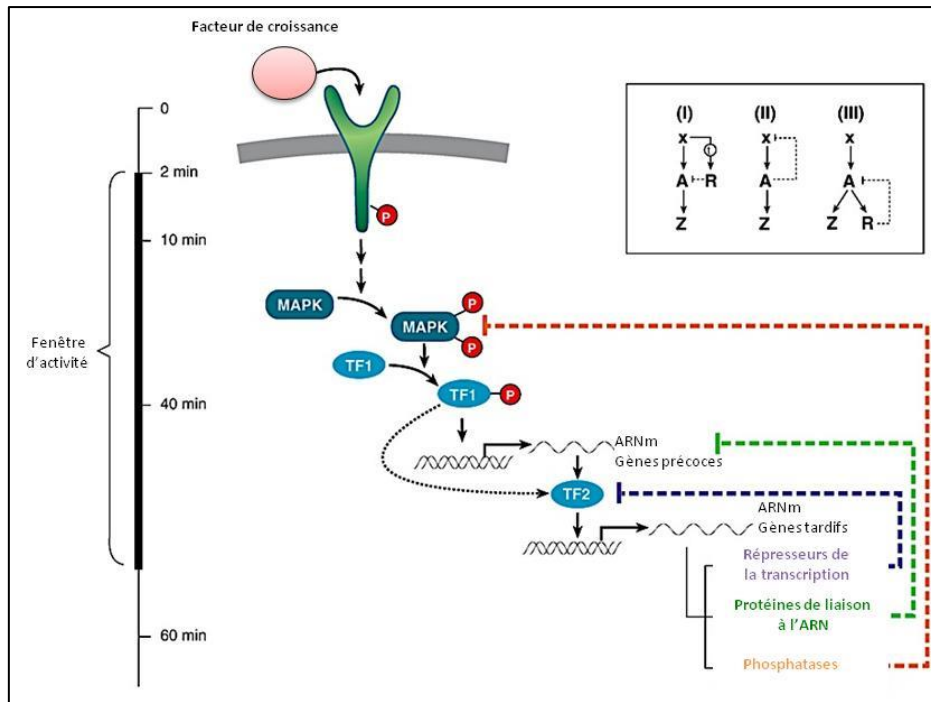


Figure 7: Boucles de rétrocontrôle régulant l'activation des RTKs.

La synthèse d'ARNm et de protéines résultant de l'activation des RTKs peut prendre entre 15 et 90 min, ce qui constitue la fenêtre temporelle d'activation et de signalisation des RTKs. La figure ci-contre présente les différentes boucles de rétrocontrôle négatif. I: Le facteur de transcription x active immédiatement un facteur de transcription A pour induire l'expression du gène cible Z, et active également après un certain délai le répresseur R du facteur de transcription A. II: L'expression d'un gène Z est contrôlée par le gène cible A, dont l'expression est activée par le facteur x. L'activité de ce facteur est elle-même réprimée par A. III: x active la transcription du facteur de transcription A, qui induit alors à la fois la transcription du gène d'intérêt Z et du répresseur de A, R. TF : Facteur de transcription. D'après (Amit, Wides, et Yarden 2007).

De ce fait, en diminuant l'amplitude des signaux engendrés et la stimulation de l'activité cellulaire, les protéines adaptatrices, les kinases, les phosphatases et les ubiquitines ligases présentes dans le cytoplasme sont les premiers régulateurs négatifs précoces de l'activité des RTKs (Dikic et Giordano 2003). L'atténuation du signal engendré repose ainsi sur l'ubiquitination des RTKs par l'ubiquitine ligase E3 c-Cbl par exemple, activée par la phosphorylation de son résidu tyrosine, et qui entraîne l'endocytose du récepteur et sa dégradation dans les compartiments lysosomaux (Marmor et Yarden 2004). En effet, suite à son activation par le ligand, le RTK est clustérisé dans des régions membranaires riches en clathrine, celle-ci permettant de former un puits d'invagination membranaire contenant le récepteur, puis est internalisé dans ces vésicules d'endocytoses clathrine-dépendantes afin d'atténuer le signal induit (Jiang *et al.* 2003). Les SFKs comme Src sont impliquées dans ce processus d'endocytose, en phosphorylant la clathrine permettant ainsi sa redistribution membranaire, mais également en phosphorylant la dynamine, une GTPase qui permet l'endocytose en hydrolysant le GTP (Ahn *et al.* 2002). L'ubiquitination du récepteur régule ce processus d'endocytose, et est elle-même régulée par les SFKs. En effet, l'ubiquitine ligase E3 c-Cbl et les SFKs se régulent négativement. Cbl est recrutée sur les résidus tyrosines phosphorylés des RTKs (Tyrosine¹⁰⁴⁵ pour l'EGFR) par ses domaines SH2 ou interagit avec

des protéines adaptatrices comme Grb2 par son domaine SH3, entraînant la monoubiquitination du récepteur, qui, selon certains, stimulerait directement son endocytose (Jiang *et al.* 2003) alors que pour d'autres Cbl régulerait l'adressage des RTKs dans les compartiments lysosomaux pour permettre leur dégradation (Duan *et al.* 2003). En effet, la monoubiquitination suffirait pour internaliser les récepteurs membranaires dans les endosomes, tandis que les protéines polyubiquitinées sont reconnues par le protéasome où elles sont dégradées (Hicke 2001).

2.2. Le M-CSFR : un récepteur à activité tyrosine kinase de type III

2.2.1. La classe III des RTKs

La famille des RTKs III, aussi connue comme étant la famille du PDGFR, comprend les RTKs dont le domaine extracellulaire est composé de cinq chaînes immunoglobulines (Yarden *et al.* 1986). Cinq membres appartiennent aux RTKs III : les trois récepteurs « hématopoïétiques » activés par des cytokines dimériques hélicoïdales KIT, FLT3 et le M-CSFR, et les deux récepteurs du PDGF (Figure 8). Les PDGFRs et leurs ligands seraient les premiers apparus, et les cytokines hélicoïdales se seraient développées au cours de l'évolution après qu'une cytokine hélicoïdale aurait montré de bonnes propriétés de liaison à des récepteurs de type PDGFR (géométrie, surface d'interaction, etc.). L'avantage sélectif conféré par la présence d'hélices α aurait donné naissance aux cytokines hélicoïdales d'aujourd'hui suite à des duplications et des mutations géniques, expliquant leur différence structurale avec les feuillets β du PDGF (Verstraete et Savvides 2012).

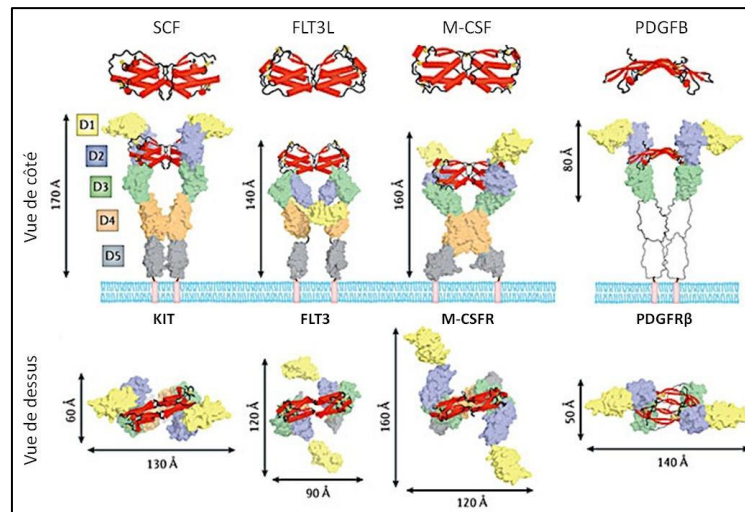


Figure 8 : La famille des RTKs III.

Structure et orientation des RTKs III humains complexés avec leurs ligands. De gauche à droite : détermination aux rayons X de l'ectodomaine de KIT lié au SCF (PDB 2E9W), détermination aux rayons X de l'ectodomaine du FLT3 lié à son ligand (PDB 3QS9), détermination du M-CSFR complexé au M-CSF par microscopie électronique (EMDB 1977), détermination aux rayons X des domaines D1 à D3 du PDGFR β lié au PDGFB (PDB 3MJG). Les domaines immunoglobulines des différents domaines sont représentés en jaune (D1), en bleu (D2), en vert (D3), en orange (D4) et en gris (D5). Les hélices α et les feuillets β des ligands sont représentés en rouge. Adapté de (Verstraete et Savvides 2012).

Les ligands et récepteurs appartenant à la classe III des RTKs font preuve d'une grande plasticité, avec l'existence de mécanismes de coopération entre le ligand et son récepteur. En effet, les monomères du SCF, du FLT3L, et du M-CSF subissent une rotation de plusieurs degrés l'un par rapport à l'autre lors de leur liaison avec leur récepteur. Cette plasticité semble être permise par l'interface de dimérisation des ligands. De plus, des interactions homotypiques entre les deux unités réceptrices dimérisées par leur ligand conduisent à la formation d'un complexe de haute affinité, et ces unités réceptrices subissent également une rotation importante suite à la fixation du ligand (Verstraete et Savvides 2012).

2.2.2. Le M-CSFR

2.2.2.i. Découverte, caractérisation et structure

Le récepteur au M-CSF (M-CSFR, CSF-1R, CD115 ou encore *c-fms*) a été identifié pour la première fois en 1980 par les américains Stanley et Guilbert (Guilbert et Stanley 1980). Cinq ans plus tard, l'équipe de Sherr montrait l'existence d'un proto-oncogène *c-fms* (Sherr *et al.* 1985), qui fut ensuite cloné et identifié comme étant un gène codant pour un récepteur RTKIII de la famille du PDGFR (Coussens *et al.* 1986). En 1987, l'activité kinase intrinsèque du M-CSFR fut caractérisée suite à son identification par l'équipe de Stanley, démontrant que la protéine découverte par Stanley correspondait en fait à la proto-oncoprotéine identifiée par Sherr (Yeung *et al.* 1987). Le gène du M-CSFR contient 21 introns et 22 exons, et est localisé sur le chromosome 5 chez l'Homme, et sur le chromosome 18 chez la souris, à proximité du gène du *PDGFR-β*. La transcription est initiée juste après l'exon 1 pour les cellules du trophoblaste, et juste après l'exon 2 pour les macrophages. En effet, il existe deux régions promotrices différentes : le promoteur T/OC (pour *Trophoblast/Osteoclast*) et le promoteur M (pour *Macrophage*). Un élément régulateur de la transcription de 330 paires de base appelé FIRE se trouve en 3' de l'intron 2 et sert de séquence *enhancer* pour induire l'expression du M-CSFR chez les monocytes et macrophages au cours de la différenciation, mais peut également réguler négativement l'activité du promoteur. Les sites initiateurs de la transcription sont multiples, et il n'existe pas de TATA box dans les séquences promotrices du M-CSFR. En effet, les protéines de liaison aux séquences TATA comme EWS peuvent se fixer sur des répétitions de CAG ou CAA (Bonifer et Hume 2008).

La structure du M-CSFR est proche de celle des autres RTKs III (**Figure 9**), avec une région extracellulaire de 498 acides aminés hautement glycosylée comprenant cinq domaines immunoglobulines D1 à D5, un domaine TM de 21 acides aminés et un domaine intracellulaire composé des trois parties communes à l'ensemble des RTKs : un domaine JM (36 acides aminés), un domaine TK interrompu par une séquence d'insertion de 73 acides aminés et l'extrémité C-terminale de 398 acides aminés (Hampe *et al.* 1989). Le domaine D1 ne participe ni à la liaison du ligand, ni aux interactions homotypiques du récepteur, mais semble stabiliser les formes inac-

tives du récepteur, et permettre les contacts intermoléculaires à la surface cellulaire. Les domaines D2 et D3 servent à la liaison des ligands, et le domaine D4 est impliqué dans la dimérisation du récepteur induite par le ligand. L'interface d'interaction de D4 contient une séquence propre aux RTKs III, comme chez KIT et le PDGFR. La présence des domaines D4 et D5 contribue aux interactions homotypiques et sont à l'origine du complexe de haute affinité formé par le M-CSF et le M-CSFR. En effet, le K_D reporté pour le M-CSF est de 0,4 nM chez la souris (Guilbert et Stanley 1986), et 0,1 nM pour le récepteur humain (Roussel *et al.* 1988).

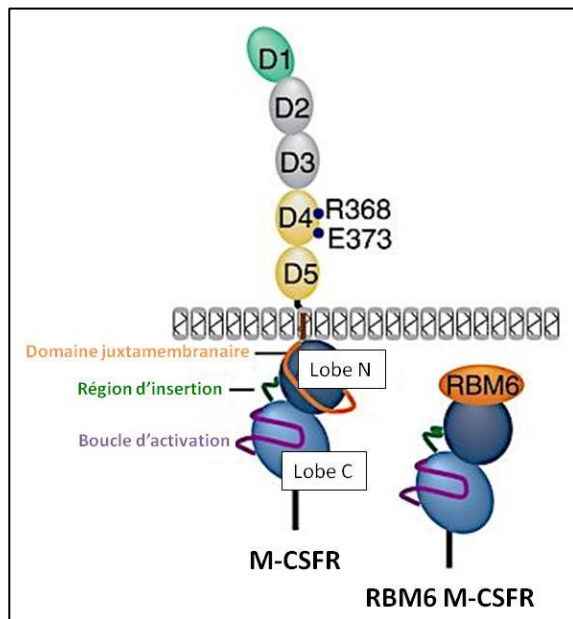


Figure 9 : Structure du M-CSFR et de la protéine de fusion oncogénique M-CSFR RBM6.

Les domaines D1 à D5 du domaine extracellulaire immunoglobuline sont représentés par des cercles, avec en gris les domaines impliqués dans la reconnaissance du ligand. Les points bleus du domaine D4 représentent les résidus ioniques impliqués dans les contacts homotypiques lors de la dimérisation du récepteur. Le lobe N du domaine kinase sert à la liaison de l'ATP tandis que le lobe C porte l'activité kinase. (Tiré de Stanley et Chitu 2014).

Cependant, la présence du domaine TM et l'insertion dans la membrane plasmique sont également nécessaires, puisque l'affinité du récepteur est plus faible lorsque seuls les domaines extracellulaires sont utilisés (Chen *et al.* 2008; Ma *et al.* 2012). Par ailleurs, un équilibre existant entre des formes libres dimériques et monomériques du M-CSFR a déjà été suggéré depuis quelques années (Li et Stanley 1991), et des études structurales plus récentes alliant diffusion des rayons X aux petits angles et microscopie électronique ont confirmé cette pré-dimérisation du récepteur (Elegheert *et al.* 2011).

Le domaine TK présente une structure bi-lobulaire commune aux autres RTKs III (KIT, FLT3, *etc.*). Le petit lobe (N) est composé de cinq feuillets β anti-parallèles et d'une hélice α , tandis que le grand lobe (C) est fait de deux feuillets β et de sept hélices α . Les deux lobes sont liés par la région d'insertion du domaine kinase. Comme décrit précédemment pour les RTKs, l'ATP vient se loger entre les lobes N et C, et se lie à des régions du lobe N (boucle « P » de liaison aux nucléotides, résidus 590 à 594) et de la séquence d'insertion. Le lobe C, dit catalytique, est lui impliqué dans la liaison des substrats protéiques et porte l'activité kinase (boucle catalytique, résidus 776-783), bien que le lobe N participe aussi à l'activité catalytique.

2.2.2.ii. Activation et régulation

À l'état inactif du M-CSFR, la boucle d'activation du domaine kinase (résidus 796 à 825) est repliée au-dessus de la poche de liaison à l'ATP, et est liée au domaine catalytique C par son résidu tyrosine 809 qui sert de «pseudo-substrat» (**Figure 10**). De plus, les motifs dits DFG (Acide aspartique⁷⁹⁶, Phénylalanine⁷⁹⁷, Glycine⁷⁹⁸) nécessaires à la chélation de l'ATP par le Mg²⁺ sont dans une conformation fermée (« DFG-out »), et seront accessibles suite au changement de conformation (« DFG-in »), induit par l'activation du M-CSFR (Walter *et al.* 2007). Le motif DFG se situe au début de la boucle d'activation, et dans la conformation « DFG-in » le résidu Acide aspartique⁷⁹⁶ sert de base catalytique au cours du transfert du phosphate, permettant d'orienter l'ATP pour sa chélation avec l'ion Mg²⁺ nécessaire à la réaction. Ces remaniements ne nécessitent pas une phosphorylation de la boucle d'activation sur la tyrosine⁸⁰⁹ comme chez les autres RTKs. En effet, en absence de ligand le domaine juxtamembranaire auto-inhibe le domaine kinase en bloquant l'hélice α du lobe N, empêchant ainsi le lobe N de tourner autour du lobe C. Cette absence de plasticité bloque la boucle d'activation dans sa conformation inhibitrice. Cependant, après fixation du M-CSF, et dimérisation du récepteur, le motif DFG passe en conformation ouverte, et la tyrosine⁵⁶¹ est phosphorylée en *cis*, permettant de lever l'inhibition du domaine juxtamembranaire sur l'hélice α C. La boucle d'activation change alors de conformation et se déplace pour permettre l'accès aux substrats, rendant le domaine kinase actif (**Figure 10**). La tyrosine⁵⁶¹ sert donc d'interrupteur à l'activation du domaine kinase (Yu *et al.* 2012). Le résidu tyrosine⁵⁴⁶ est également un site d'autophosphorylation majeur du domaine juxtamembranaire.

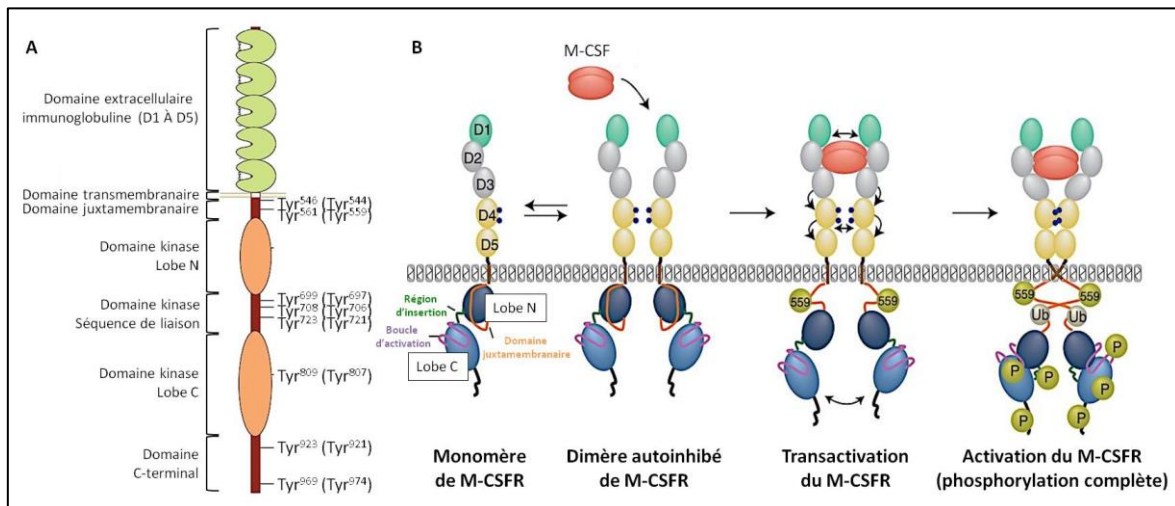


Figure 10 : Localisation des différentes tyrosines connues pour être phosphorylées lors de l'activation du M-CSFR et schéma des différentes étapes de l'activation du récepteur par le M-CSF.

A) Les différents domaines du M-CSFR sont schématisés ci-contre avec la localisation et la numérotation des résidus tyrosines connus chez l'homme (et chez la souris entre parenthèses) pour être phosphorylés suite à l'activation du M-CSFR. Ces résidus jouent un rôle clé dans la transduction du signal au sein de la cellule. Adapté de (Pixley et Stanley 2004). B) Les sphères jaunes représentent les tyrosines phosphorylées (P), les sphères grises représentent les domaines d'ubiquitination (Ub). La phosphorylation de la tyrosine 561 et l'ubiquitination du domaine intracellulaire sont essentielles pour la phosphorylation et l'activation complète du M-CSFR. Adapté de (Stanley et Chitu 2014).

2.2.2.iii. Voies de signalisation sous-jacentes

À ce jour, 8 résidus tyrosines sont connus pour être phosphorylés sur le M-CSFR (**Figure 10**). Les tyrosines 546 et 561 auto-phosphorylées sont des sites de recrutement majeurs pour des protéines de signalisation, comme les protéines de la famille Src. Cependant, la phosphorylation séquentielle des résidus tyrosines 699, 708 et 723 du domaine kinase d'insertion est aussi nécessaire au recrutement des effecteurs enzymatiques et aux interactions protéines-protéines pour la transduction du signal. En effet, une délétion de ce domaine d'insertion dans des fibroblastes de rats exprimant le M-CSFR bloque la signalisation intracellulaire, et une mutation touchant les tyrosines 699 et 723 empêche l'induction par le M-CSF de la croissance cellulaire ou des changements morphologiques (van der Geer et Hunter 1993).

Le M-CSF active principalement deux voies distinctes via le M-CSFR: **la voie PI3K** et **la voie Src/Pyk2** (**Figure 11**). Parmi les RTKs III (M-CSFR ou le PDGFR), la phosphorylation de tyrosines hautement conservées de la séquence d'insertion du domaine kinase fournit des sites de forte liaison et d'activation des sous-unités p85 et p110 de PI3K, induisant ainsi l'activation de cette voie, et augmentant la prolifération cellulaire (Heldin et Westermark 1999). En effet, l'activation de PI3K augmente l'expression de c-Fos et c-Jun, qui vont ensuite permettre l'expression de gènes mitogènes (Roussel 1994). Cependant, la signalisation cellulaire induite dépend aussi du type cellulaire. Ainsi, chez des macrophages activés par du M-CSF, la voie PI3K est principalement impliquée dans la survie cellulaire. L'activation de la voie PI3K se fait principalement suite à la phosphorylation de la tyrosine⁷²³, activant ainsi directement Akt pour permettre la survie, ou activant les GTPases de la famille Rho, Rac et Cdc42, pour induire la motilité des cellules (Sampaio *et al.* 2011). De même, la voie PI3K est importante pour la survie de l'ostéoclaste (Adapala *et al.* 2010). La prolifération cellulaire est plutôt dépendante de l'activation des tyrosines 546, 561 et 809 et des voies sous-jacentes PI3K et MAPK (Yu *et al.* 2012). Elle est aussi induite par le céramide-1-phosphate, qui active par les voies PI3K/Akt, JNK et ERK1/2, et dont la production est M-CSF dépendante (Gangoiti *et al.* 2008). La voie Src soutient également la prolifération cellulaire suite à l'activation des SFKs recrutées majoritairement sur la tyrosine⁵⁶¹ qui vont activer ERK5 (Rovida *et al.* 2008). La prolifération peut également être induite de façon moins conventionnelle suite à la phosphorylation de la protéine transmembranaire DAP12 qui recrute et active Syk. Cette dernière active Pyk2 qui phosphoryle la β -caténine pour induire la transcription de gènes du cycle cellulaire (Otero *et al.* 2009). La différenciation des cellules progénitrices myéloïdes en macrophages est quant à elle permise par la PLC- γ 2, activée suite à la phosphorylation des tyrosines 723 et 809. De plus, la PLC γ est connue pour réguler la survie cellulaire (Bourette *et al.* 1997). Cette différenciation est également permise par les vagues d'activation plus tardives de ERK1/2, où l'interaction de Mona et Gab3 grâce à la phosphorylation des tyrosines 699, et 809 joue un rôle important (Bourgin *et al.* 2002). Les oscillations de l'activation d'Akt suite aux vagues de phosphorylation de la tyrosine⁷²³ sont également nécessaires pour activer la caspase 8 qui clive

la nucléophosmine pour accélérer la différenciation macrophagique (Jacquel *et al.* 2009). Par ailleurs, la protéine FMIP est connue pour interagir directement avec le M-CSFR activé sur des résidus inconnus, et active la PKC- γ qui partage la voie de signalisation de la PLC γ , activant ainsi la différenciation mais aussi la survie cellulaire (Mancini *et al.* 2004).

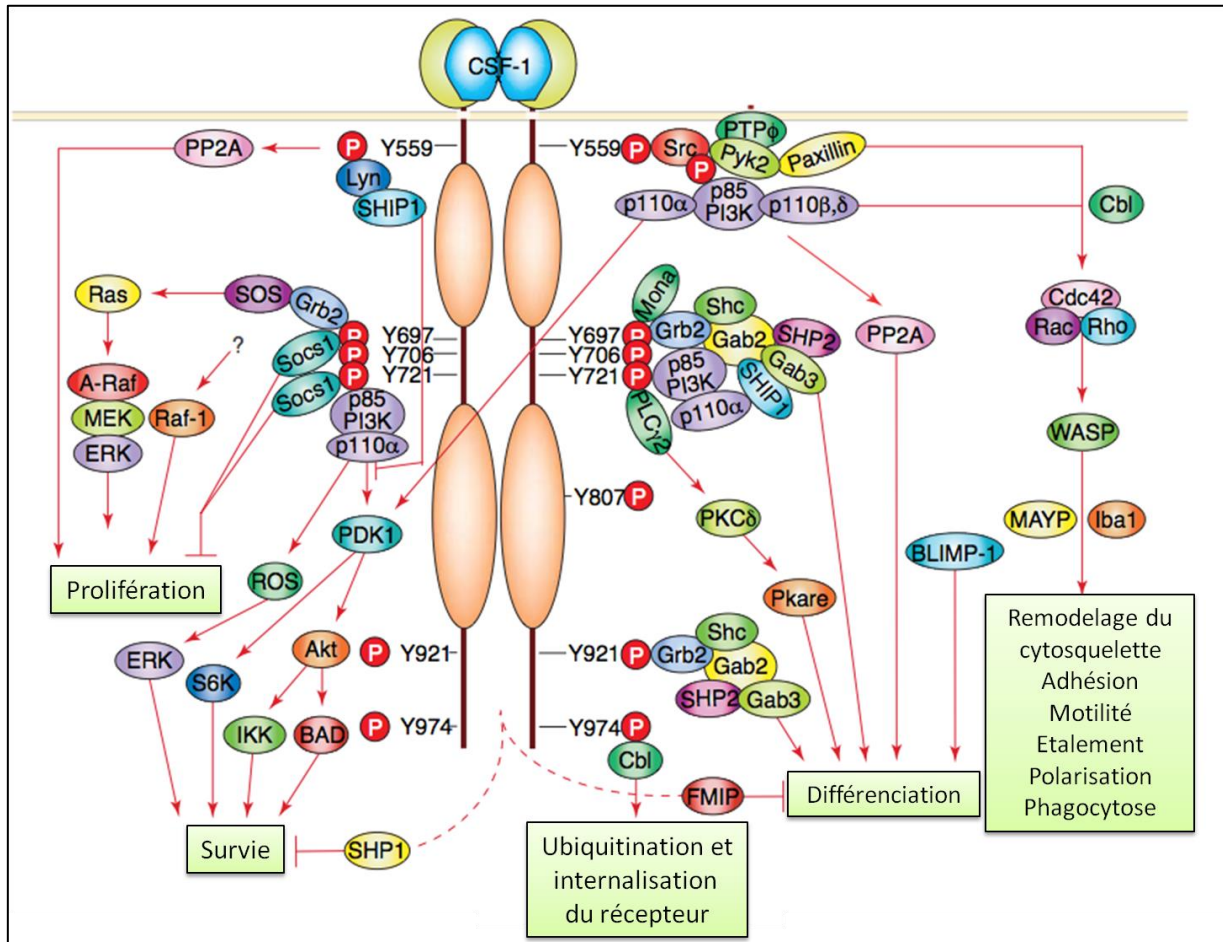


Figure 11 : Les voies de signalisation activées par la liaison du M-CSF sur son récepteur dans la lignée myéloïde.

Les protéines représentées directement au contact du M-CSFR sont celles recrutées sur les résidus tyrosines phosphorylés (numérotation murine) grâce à leur domaine de liaison spécifiques. Pour plus de clarté la liaison des protéines à la membrane n'est pas représentée (pour Ras par exemple). L'implication de la voie MAPK sur la régulation de la balance prolifération/différenciation n'est pas encore bien déterminée, mais Raf-1 semble transduire le signal de manière indépendante à la voie MAPK. BLIMP : *B-Lymphocyte-Induced Maturation Protein*; IKK : *IKB Kinase*; Mona : *Monocytes adaptator*; PDK1 : *30-Phosphoinositide-Dependent Kinase-1*; PK : *Protein Kinase*; Pkare : *PKA-related gene*; PP : *Protein Phosphatase*; Pyk : *Proline-rich and Ca²⁺-activated tyrosine kinase*; ROS : *Reactive Oxygen Species*; SHIP : *SH2-domain-containing polyinositol phosphatase*; SHP : *SH2-domain-containing phosphatase*; Socs1 : *Suppressor of cytokine signaling-1*. Adapté de (Pixley et Stanley 2004).

De la même manière que la voie PI3K, la voie Src/Py2k active les GTPases Rho par le biais de la paxilline, qui vont elles-mêmes activer MAYP/PSTPIP2 et IBA-1 pour stimuler la formation des faisceaux d'actine. La paxilline est une protéine qui appartient aux complexes focaux des membranes plasmiques chez les macrophages et fibroblastes, et qui est phosphorylée par un complexe SFKs/Pyk2 (une tyrosine kinase proche des FAKs) une fois recruté sur le M-CSFR activé.

La phosphorylation de la paxilline permet l'étalement et l'adhérence cellulaire, et Pyk2 régule la formation des complexes focaux (Pixley et Stanley 2004). Plus spécifiquement, RhoA est capable de stimuler la contraction de l'actomyosine, et la formation de fibres de stress et Rac permet la formation de lamellipodes, permettant le « ruffling » et l'étalement cellulaire. Au contraire, cdc42 induit la formation de filopodes et régule la motilité directionnelle. Par ailleurs, il faut noter que l'ubiquitine ligase Cbl activée dont le rôle principal est de réguler négativement le M-CSFR en induisant son ubiquitination et son internalisation/dégradation, est aussi capable de se lier avec les protéines de signalisation décrites précédemment, Src, Pyk2, PI3K, mais également avec la Rho GTPase GEF Vav pour réguler les voies détaillées ci-dessus (Thien et Langdon 2001).

La liaison du M-CSF sur le récepteur conduit à une première vague très rapide de phosphorylation où le M-CSFR dimérisé sert de plateforme à plusieurs protéines qui vont être phosphorylées, comme Grb2/Sos, les SFKs, Cbl ou PI3K (Kanagasundaram, Jaworowski, et Hamilton 1996). Les protéines Grb2/Sos se dissocient rapidement, tandis que d'autres comme Cbl, PI3K ou Shc restent fortement liées au récepteur. Le récepteur subit alors une seconde vague de phosphorylation associée à la phosphorylation de résidus sérines permettant son ubiquitination Cbl-dépendante. Le complexe M-CSF/M-CSFR est alors internalisé pour être dégradé dans les compartiments lysosomaux (Pixley et Stanley 2004).

2.2.2.iv. Existence de formes solubles pour le M-CSFR

Le M-CSFR peut être clivé de la membrane par une protéase membranaire nommée TACE. Ce clivage est induit lors de l'activation des phagocytes mononucléés par des facteurs comme le LPS, l'IL-4 ou l'IL-1 et passe par l'activation de la PLC et la PKC (Rovida *et al.* 2001). Le M-CSFR soluble est produit par clivage au niveau de son segment transmembranaire, et possède un domaine extracellulaire intact capable de lier le M-CSF. Un fragment intracellulaire contenant le domaine kinase est également généré (Downing, Roussel, et Sherr 1989). Le M-CSFR soluble est détecté dans le sérum de volontaires sains autour de 0,48 ng/mL et ce taux diminue significativement dans les sérums de patients atteints de leucémie (Rao *et al.* 2001). Cette forme soluble du M-CSFR a donc un rôle inhibiteur en servant de récepteur leurre au M-CSF. En effet, le M-CSFR soluble inhibe la prolifération des cellules de cancer du foie ou de leucémies (Zheng *et al.* 2000) ainsi que l'ostéoclastogenèse (Hiasa *et al.* 2009).

2.2.2.v. Distribution tissulaire et expression dans l'organisme

Le M-CSFR est largement exprimé dans différents tissus, expliquant son action pléiotrope dans l'immunité innée, la cicatrisation, le développement embryonnaire, l'homéostasie tissulaire chez l'adulte, mais également dans l'inflammation et le microenvironnement tumoral (**Tableau 1**).

Récepteurs à activité tyrosine kinase, phosphatase et protéoglycanes

Tissu	Moelle osseuse / Os	Cerveau	Tube digestif (côlon, intestin grêle)	Embryon et utérus	Poumons	Foie	Rein	Derme
Type cellulaire	Lignée myéloïde : • Progéniteurs • Monocytes • Macrophages • Ostéoclastes • Cellules dendritiques	Progéniteurs neuronaux Microglie	Cellules épithéliales des cryptes du côlon Cellules de Paneth,	Cellules inter-glandulaires de la muqueuse utérine Cellules du trophoblaste Cellules placentaires Oocytes Cellules pré-implantatoires de l'embryon	Macrophages alvéolaires	Cellules de Kupffer	Cellules épithéliales des tubules proximaux	Cellules de Langerhans

Tableau 1 : Principaux tissus exprimant le M-CSFR

L'expression du récepteur est faible pour les cellules souches hématopoïétiques, et augmente fortement au cours de la différenciation en monocytes et macrophages. Les macrophages tissulaires étant présents dans de nombreux organes, il est possible de détecter une expression du M-CSFR dans de nombreux tissus (Stanley et Chitu 2014).

2.2.3. Ciblage du M-CSFR dans certaines pathologies

Le M-CSFR joue un rôle central dans de nombreuses pathologies, et contribue au développement de cancers comme les leucémies ou les lymphomes. L'activation autocrine ou paracrine du M-CSFR est connue pour favoriser la progression tumorale et métastatique des tumeurs solides (Pollard 2009). En effet, le M-CSF est fortement produit par les métastases osseuses associées aux cancers rénaux et mammaires par exemple, et l'expression du M-CSFR par les macrophages et les ostéoclastes favorisent la progression tumorale et l'ostéolyse associée (Manthey et al. 2009; Ohno et al. 2006; Fend et al. 2013; Murray et al. 2003). De plus, des mutations activatrices du récepteur ont été caractérisées dans les cancers rénaux (Menke et al. 2012; Soares et al. 2009) et les pathologies hématologiques. Ainsi, la protéine de fusion RBM6-M-CSFR (**Figure 9**) est composée du motif 6 de liaison à l'ARN de 36 acides aminés (RBM6) fusionné aux 399 derniers acides aminés du M-CSFR, découlant de la translocation t(3;5)(p21;q33). Cette modification confère à la protéine une activation constitutive, à l'origine de la leucémie aiguë mégacaryoblastique (Chitu et Stanley 2006). De plus, des mutations dominantes inactivatrices du M-CSFR conduisent chez l'adulte à des leucoencéphalopathies (Nicholson et al. 2013). Enfin, une activation aberrante du M-CSFR a été retrouvée entre autres dans les cancers gynécologiques et ceux du sein, mais aussi dans les maladies auto-immunes, la maladie de Crohn, la polyarthrite rhumatoïde, l'athérosclérose et l'obésité (Kirma et al. 2007; Hamilton 2008; Sapi 2004).

3. Les récepteurs à activité tyrosine phosphatase (RPTPs)

3.1. Généralités sur les protéines tyrosines phosphatases (PTPs)

La phosphorylation des résidus tyrosines est un processus réversible, et les protéines tyrosines phosphatases (PTPs) participent à la régulation et à l'extinction du signal engendré par l'activation des RTKs en déphosphorylant les kinases sur leur boucle d'activation (enzymes des voies de signalisation, ou directement le domaine kinase du RTK) afin de les rendre inactives. Les PTPs déphosphorylent également les tyrosines impliquées dans la liaison de protéines (adaptatrices, etc.), supprimant ainsi l'activation de voies de signalisation spécifiques. La PTP1B, aussi connue sous le nom de PTPN1 fut la première PTP purifiée et caractérisée en 1988 (Tonks, Diltz, et Fischer 1988). Le génome humain contient plus de 100 gènes codant pour des PTPs, bien que seulement 81 produits de ces gènes soient des PTPs actives sur des substrats protéiques. Chaque PTP possède plusieurs cibles, et leur rôle physiologique varie suivant les types cellulaires (Alonso *et al.* 2004).

3.2. La famille des PTPs

3.2.1.i. Classification

Les PTPs peuvent être classées en quatre groupes suivant les séquences de leur domaine catalytique. Parmi les enzymes de la classe I, seulement 38 appartiennent aux PTPs « classiques » qui ne ciblent exclusivement que les tyrosines phosphorylées, tandis que les autres sont des phosphatases duales (DSPs), capables de déphosphoryler à la fois les résidus sérines et thréonines, comme les MPKs qui déphosphorylent les MAPKs ou les PTENs. Il existe également trois autres classes de PTPs, incluant les phosphatases de faible poids moléculaire (classe II), les phosphatases Cdc25 (classe III) et la classe IV de la famille Eya (**Tableau 2**).

Classe I Domaine catalytique cystéine			Classe II Domaine catalytique cystéine	Classe III Domaine catalytique cystéine	Classe IV Domaine catalytique aspartate
Tyrosine phosphatase		Sérine/thréonine phosphatase	Tyrosine phosphatase	Tyrosine/thréonine phosphatase	Sérine/thréonine phosphatase
RPTPs (21)	NRPTPs (17)	DSPs	Faible poids moléculaire	Famille Cdc25	Activité cation dépendante
CD45 LAR PTP α , β ,..., ζ etc.	PTP1B SHP1/2 etc.	MPKs (11) DSPs atypiques (19) PRLs (3) CDC14s (4) Slingshots (3) PTENs (5) Myotubularines (16)	LMPTPs	CDC25A CDC25B CDC25C	EyA1,...,4

Tableau 2 : Composition et structure des quatre classes de PTPs.

D'après (Alonso *et al.* 2004).

3.2.1.ii. Structure et activation des PTPs

Les PTPs de la classe I peuvent être divisées en deux familles, les PTPs dites réceptrices (RPTPs) ou non-réceptrices (NPTPs), elles-mêmes subdivisées en différentes classes suivant les ressemblances structurelles ou les homologues de séquence. Les RPTPs peuvent posséder plusieurs domaines catalytiques, tandis que les PTPs non-réceptrices sont constituées d'un seul domaine phosphatase entouré d'autres domaines protéiques qui contrôlent la localisation cellulaire et régulent l'activité de l'enzyme et la liaison du substrat. Ces autres domaines sont des domaines de liaison protéines-protéines, ou des modules de liaison aux phospholipides, et sont assez variés comparés aux RTKs qui possèdent majoritairement des domaines SH2 ou SH3. En effet, seulement deux PTPs possèdent des domaines SH2, les autres domaines étant plus variés : C1 ou C2, CA (anhydrase carbonique), CH2, FN (fibronectine), MAM, PBM, PDZ, PH, PTB, SH3B, etc. Les domaines phosphatases font environ 240 acides aminés organisés en un feuillet β entouré de plusieurs hélices α , et comprennent dix motifs très conservés. Le site catalytique est formé par les résidus cystéine et arginine du motif n°9, hautement conservés et essentiels à la catalyse, et par les boucles des motifs n°8 et n°10. La déphosphorylation des substrats se fait en deux étapes, grâce à la cystéine catalytique (ou l'acide aspartique pour la classe IV) qui se trouve au fond de la fente catalytique. La dimension de cette fente détermine la spécificité vis-à-vis de la tyrosine ou de la sérine/thréonine, et dans le cas des PTPs « classiques » la cystéine nucléophile ne peut être atteinte que par la boucle aromatique des tyrosines phosphorylées (Tonks 2013). Dans un premier temps, un pont disulfure se forme entre l'atome de soufre de la cystéine nucléophile et l'atome de phosphore porté par la tyrosine phosphorylée du substrat. Au cours de cette étape, le lien qui existait entre le groupe phosphate et le résidu tyrosine du substrat est rompu, et la protéine déphosphorylée est relâchée. Dans un second temps, la PTP retrouve son état actif en hydrolysant la liaison qui le lie au phosphate, libérant ainsi le groupement phosphate.

La plupart des cellules expriment 30 à 60% des PTPs, bien que les cellules hématopoïétiques et neuronales en expriment beaucoup plus (Alonso *et al.* 2004). Contrairement à certains RTKs qui exercent la même fonction, les PTPs ont chacun un rôle propre, et des délétions au niveau de leurs gènes conduisent à des anomalies phénotypiques importantes et à la transformation oncogénique (Bottini *et al.* 2004). Ainsi, de nombreux gènes codant pour des PTPs ont été identifiés comme des gènes suppresseurs de tumeur, et une augmentation de l'activité de ces PTPs est retrouvée dans de nombreux cancers humains, comme la surexpression de Cdc25 qui conduit à un dérèglement du cycle cellulaire (Kristjánsson *et al.* 2004). En effet, les PTPs régulent la progression du cycle cellulaire et la transduction du signal, et 11 PTPs de la classe I, les MPKs, ciblent spécifiquement les MAPKs comme ERK1/2, JNK ou encore p38. De plus, les DSPs « atypiques » peuvent aussi déphosphoryler ERK1/2 et JNK, mais aussi STAT1 (Alonso *et al.* 2003). De la même façon, les PTENs et myotubularines déphosphorylent spécifiquement les phospholi-

pides inositol comme le PIP3, régulant ainsi la voie PI3K (Wishart et Dixon 2002). Par ailleurs, suite à l'activation de macrophages par du M-CSF, des phosphatases spécifiques sont activées pour réguler le signal, comme la PP2A, une sérine/thréonine phosphatase, ou la PTP ϕ qui déphosphoryle la paxilline (Stanley et Chitu 2014).

3.3. Les RPTPs : activation et signalisation

3.3.1.i. Structure et classification

Les RPTPs sont au nombre de 21, et comprennent un domaine extracellulaire variable, un domaine transmembranaire et un ou deux domaines catalytiques intracellulaires qui portent et régulent l'activité phosphatase. Contrairement aux RTKs, les ligands des RPTPs sont peu connus. Les domaines extra-catalytiques renseignent sur la localisation cellulaire ou la fonction des PTPs, par exemple les RPTPs possèdent une hélice α transmembranaire, et sont donc par définition au niveau des membranes cellulaires, principalement dans la membrane plasmique. La majorité possède un domaine extracellulaire de type fibronectine (tel le LAR), immunoglobuline (comme le RPTP δ), carbonique hydratase (RPTP β/ζ par exemple) ou MAM (comme le RPTP μ) (**Figure 12**). La présence d'immunoglobuline ou de fibronectine comme chez les molécules d'adhérence chez la plupart de ces RPTPs suggère un rôle dans les contacts cellulaires. Ainsi, le PTP μ permet les interactions cellule-cellule par la liaison de ses domaines extracellulaires ou la liaison avec la cadhérine, sans aucune modification de son activité catalytique (Brady-Kalnay *et al.* 1998). Par ailleurs, les ligands des RPTPs modifient directement leur activité phosphatase en se liant au domaine extracellulaire. David Van Vactor a ainsi récemment identifié chez la drosophile deux protéoglycanes comme ligands pour le LAR, la protéine soluble Dallylike et les syndécans membranaires (Johnson *et al.* 2006).

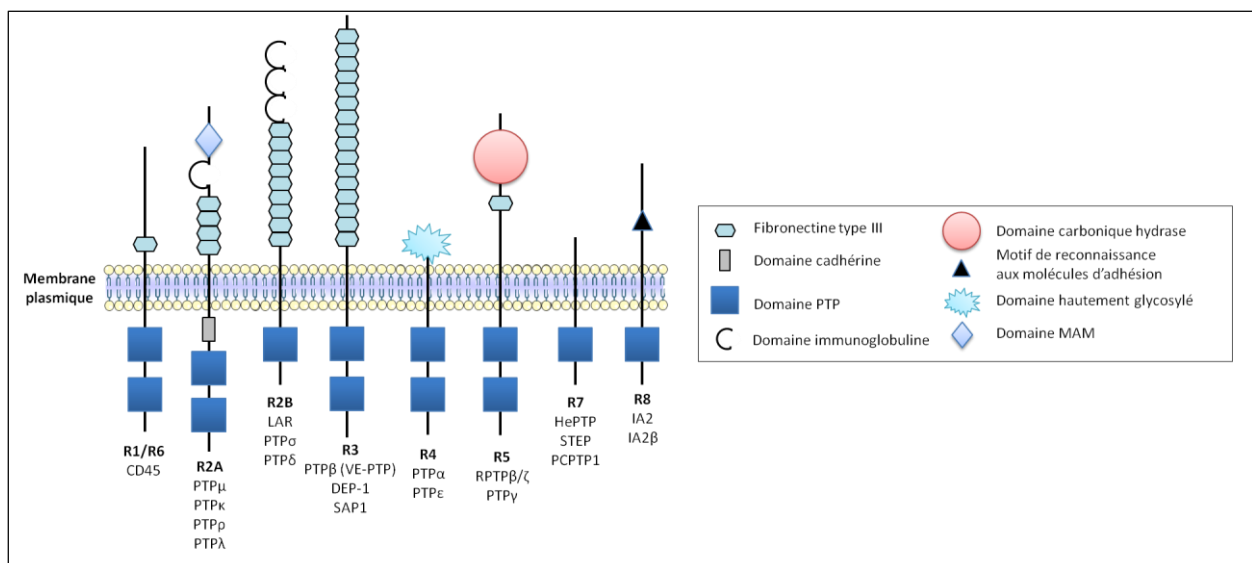


Figure 12 : Représentation schématique des différents types de RPTPs.
Réalisé d'après la classification de (Andersen *et al.* 2001).

Le domaine PTP le plus proche de la membrane joue le rôle catalytique, tandis la présence d'un deuxième domaine inactif sert de régulateur à l'activité phosphatase. D'après les études cristallographiques menées sur le RPTPa, la fixation du ligand induit la dimérisation du RPTP, mais à l'inverse des RTKs ce mécanisme inhibe son activité PTP par l'occlusion réciproque des domaines catalytiques. En effet, le cristal montre un mécanisme symétrique où l'hélice a du domaine catalytique d'un monomère se tord pour aller s'insérer dans la fente catalytique du domaine catalytique de l'autre monomère (Jiang, den Hertog, et Hunter 2000).

4. Les protéoglycanes : des régulateurs majeurs de l'activation des récepteurs membranaires

4.1. Les glycosaminoglycanes

Les glycosaminoglycanes (GAGs) sont des chaînes polysaccharidiques linéaires chargées négativement, composées par l'association des monosaccharides suivants: galactose (Gal), N-acetylglucosamine (GlcNAc), N-acetylgalactosamine (GalNAc), acide glucuronique (GlcA), xylose (Xyl) ou acide iduronique (IdoA). Cinq classes de GAGs peuvent être distinguées par les unités disaccharidiques les composant : l'héparine et l'héparane sulfate (GlcA/IdoA plus GlcNAc), la chondroïtine sulfate (GlcA plus GalNAc), le kératane sulfate (Gal plus GlcNAc), le dermatane sulfate (GlcA/IdoA plus GalNAc) et l'acide hyaluronique (GlcA plus GlcNAc) (Lindahl et Höök 1978) (**Figure 13**). Ces GAGs sont sulfatés sur leurs extrémités hydroxyles, et ce sont les charges négatives des groupements sulfates SO_3^- qui leur confèrent des propriétés hydrophiles (rétention d'eau et de cations au sein de la MEC). Cette sulfatation leur permet également d'interagir avec des protéines matricielles ou des protéines cellulaires (facteurs de croissance, cytokines, etc.).

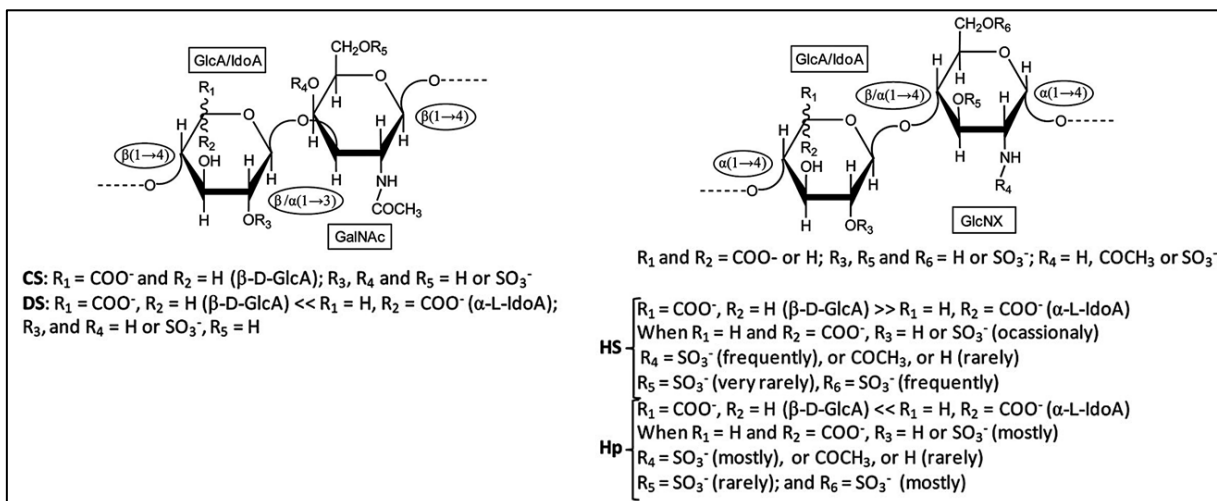


Figure 13 : Structure chimique de l'unité disaccharidique composant les chaînes de chondroïtine sulfate/dermatane sulfate (à gauche) et les chaînes d'héparine/héparane sulfate (à droite) (Pomin 2014).

Les chondroïtines sulfates constituent principalement le cartilage, et contribuent à son hydratation, ainsi qu'à la flexibilité de l'os. Elles existent sous plusieurs formes suivant leurs modifications chimiques. Ainsi, les formes A et C sont respectivement sulfatées sur les carbones n°4 et n°6 des résidus GalNAc. Par ailleurs, les dermatanes sulfates sont aussi souvent décrits comme des chondroïtines sulfates B.

L'héparine est le glycosaminoglycane le plus sulfaté, et l'héparane sulfate correspond à une variation des chaînes d'héparines, avec des régions moins sulfatées. L'héparine est synthétisée par les mastocytes du tissu conjonctif en étant associée au squelette protéique de la serglycine. Ensuite, ces chaînes sont clivées pour donner de l'héparine libre de faible poids moléculaire, qui sera stockée dans les granules de sécrétion des mastocytes, puis sécrétées. Au contraire, l'héparane sulfate est produite par la plupart des types cellulaires sous forme libre. Cependant, l'héparane sulfate est rarement présente sous sa forme libre et se retrouve associée à des protéines (Pomin 2014).

4.2. Les protéoglycanes

4.2.1. Généralités

4.2.1.i. Structure

Les protéoglycanes sont des macromolécules hydrophiles constituées d'un squelette protéique sur lequel sont liées de façon covalente une ou plusieurs chaînes de GAGs. La liaison de ces GAGs se fait au niveau d'un résidu sérine du squelette protéique par un motif tétrasaccharidique organisé de la façon suivante : Xyl-Gal-Gal-GlcA (Häcker, Nybakken, et Perrimon 2005). Seuls le kératane sulfate et l'acide hyaluronique dérogent à cette règle. Le premier se lie au squelette protéique par une simple liaison glycosidique, tandis que le deuxième ne se lie pas de façon covalente aux protéines, agrégeant d'autres protéoglycanes sur sa chaîne. Les modifications post-traductionnelles des chaînes de GAGs s'effectuent au sein du Golgi lorsque celles-ci sont liées au squelette protéique, puis les protéoglycanes sont rapidement transloqués vers la membrane plasmique (Ling *et al.* 2006).

4.2.1.ii. Localisation et rôles

Les protéoglycanes font partie des composants principaux des tissus humains, et sont présents au niveau de la matrice extracellulaire et des surfaces cellulaires. Leur diversité et leur abondance créent des interfaces cellule-matrice spécifiques et des microenvironnements propres au tissu qui régulent localement l'homéostasie et la fonction de ce tissu, comme par exemple la vascularisation ou l'immunité innée (Clark, Bishop, et Day 2013).

Leur rôle est variable, et peut être soit strictement mécanique au niveau de la matrice extracellulaire par la rétention d'eau et des cations, soit un rôle spécifique grâce à leur interaction

avec d'autres molécules. Cette spécificité leur est apportée par leurs chaînes de glycosaminoglycanes. En effet, la composition et le degré de sulfatation de ces chaînes créent des motifs de liaison pour certaines protéines basiques, comme les facteurs de croissance ou les molécules d'adhésion, à l'origine de leur diversité biologique. Les sulfotransférases confèrent ainsi aux glycosaminoglycanes une multifonctionnalité, et donc une grande complexité (Habuchi, et Kimata 2004). De plus, certains protéoglycanes présentent des différences structurales importantes uniquement dues à leurs chaînes de glycosaminoglycanes (taille, nombre de motifs, écartement, etc.), alors qu'ils possèdent pourtant le même squelette protéique, suggérant une synthèse et une fonction tissu-spécifique et niche-spécifique. De plus, la variabilité des squelettes protéiques des protéoglycanes permet leur localisation dans les compartiments intracellulaires, la membrane plasmique, la matrice extracellulaire ou les membranes basales, montrant là aussi des rôles spécifiques (Lamoureux *et al.* 2007). Les fonctions des protéoglycanes sont nombreuses. Ils possèdent tout d'abord un rôle structural et fonctionnel en favorisant les interactions cellules/cellules par les intégrines par exemple, ou cellules/matrice grâce aux fibronectines. Les protéoglycanes servent également de réservoir au sein de la matrice extracellulaire ou à la surface cellulaire, en stockant les facteurs de croissance, les protégeant contre l'action protéase, et en les libérant suite à divers stimuli (action mécanique, action d'enzymes spécifiques comme les métalloprotéases etc.) (Lindahl et Höök 1978). Cette rétention de protéines à la surface cellulaire permet de créer des gradients de concentration, comme des gradients chimiotactiques par exemple. Cette concentration de facteurs permet aussi d'augmenter leur biodisponibilité pour les récepteurs et de créer des complexes moléculaires de haute affinité ligand/récepteur/protéoglycanes. Ils servent ainsi de co-récepteur pour la transduction du signal, en stabilisant le ligand et en le présentant au récepteur. Néanmoins, ces protéoglycanes peuvent également avoir une signalisation propre, comme c'est le cas pour les syndécans ou le RPTP β/ζ (Mythreya et Blobel 2009). Les protéoglycanes appartenant à la membrane plasmique sont donc capables de réguler la prolifération, la différenciation cellulaire et l'expression de gènes (Perrimon et Bernfield 2000; Lamoureux *et al.* 2007).

4.2.2. Les protéoglycanes héparanes sulfatés

Les protéoglycanes héparanes sulfatés sont matriciels (perlécan, agrine et collagène XVIII) ou cellulaires (glypicans et syndécans), et peuvent aussi exister sous formes solubles suite à l'action de protéases comme les métalloprotéases (MMP-9 ou MT1-MMP). La plupart des protéoglycanes membranaires portent des héparanes sulfates, et ceux qui portent des chaînes de chondroïtine sulfate sont plutôt matriciels. Néanmoins, ces protéoglycanes peuvent porter les deux types de chaînes, comme certains syndécans ou le perlécan. La présence de résidus IdoA au sein des chaînes d'héparane sulfate leur confère une grande souplesse qui leur permet d'interagir avec de nombreuses molécules intra et extracellulaires (Häcker, Nybakken, et Perri-

mon 2005). Leurs rôles, comme leurs structures, sont très variés. Ils servent classiquement d'interface entre les cellules, tissus et organes, mais interviennent également dans la croissance et le développement, l'angiogenèse, l'invasion virale et l'anticoagulation (Okolicsanyi, Griffiths, et Haupt 2014). Ces protéoglycanes régulent l'activité des RPTPs, et peuvent leur servir de ligand, comme l'agrine et le collagène XVIII qui se fixent sur le RPTP σ dans les neurones (Aricescu *et al.* 2002). Les protéoglycanes à héparane sulfate jouent également un rôle majeur dans la régulation de l'activité des RTKs en interagissant avec les facteurs de croissance (FGFs, VEGFs, PDGFs et TGF- β), mais aussi directement avec le récepteur (FGFR). Ainsi, un défaut de sulfatation des chaînes d'héparane sulfate empêche la liaison du bFGF sur le FGFR1, et donc la croissance cellulaire (Eswarakumar, Lax, et Schlessinger 2005). Par ailleurs, ces protéoglycanes sont importants dans la prolifération et la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en cellules ostéoprogénitrices ou pré-adipocytes par exemple (Okolicsanyi, Griffiths, et Haupt 2014). Ainsi, le glypican-3 joue un rôle majeur dans la formation osseuse en favorisant la différenciation ostéoblastique (Haupt *et al.* 2009).

4.2.3. Les protéoglycanes à chaînes de chondroïtine sulfate

Les protéoglycanes à chaînes de chondroïtines sulfates sont principalement matriciels (aggrécan, versican, neurocan, brévican), mais les formes membranaires jouent un rôle majeur dans le maintien de l'intégrité structurelle et la fonction cellulaire au niveau du cerveau (RPTP β/ζ , neuroglycan C, bétaglycan, CD44, et syndécans). En effet, il existe un profil d'expression spatio-temporel propre à chaque protéoglycane au cours du développement du cerveau, et ce profil d'expression change lors de certaines pathologies comme la maladie d'Alzheimer (Maeda 2010).

II. L'interleukine-34 au sein de l'axe M-CSF/ M-CSFR

1. Les cytokines : généralités

Les cytokines sont des médiateurs de nature protéique, souvent glycosylées et de petite taille (8 à 50 kDa), qui permettent la communication entre les différents types cellulaires de façon autocrine, paracrine, juxtacrine ou endocrine. Elles sont produites de façon abondante par les cellules du système immunitaire, mais également par d'autres types cellulaires (cellules endothéliales, fibroblastes, *etc.*), et présentent à la fois des formes solubles et membranaires. Les cytokines agissent à faibles concentrations (nano- ou picomolaire), via des récepteurs solubles ou membranaires. La pléiotropie est une de leurs caractéristiques majeures, puisque nombre d'entre elles sont capables d'induire des réponses cellulaires variées suivant les cellules cibles ainsi que leur contexte (prolifération, différenciation, migration, *etc.*). Les cytokines peuvent agir de façon synergique ou antagoniste, et sont pour la plupart redondantes, ce qui explique l'absence de conséquences phénotypiques importantes en cas de mutation génique (Ozaki et Leonard 2002).

Leur classification est complexe, et repose à la fois sur des critères fonctionnels (activité biologique, *etc.*) ou structuraux (structure biochimique, partage d'une unité réceptrice, *etc.*). Les termes « interleukines » ou « chimiokines » ont ainsi été créés pour spécifier les sources et cibles de ces molécules, ainsi que leurs rôles spécifiques dans l'inflammation ou le chimiotactisme (Ingnot 1997). Il existe ainsi actuellement 38 interleukines connues, les molécules de la famille du TNF et des lymphotoxines, les interférons, les chimiokines, les cytokines signalant par la glycoprotéine gp130 et les facteurs de croissance hématopoïétiques auxquels appartient le M-CSF. Les facteurs de croissance hématopoïétiques stimulent la prolifération, la survie et la différenciation des cellules souches, et sont sécrétés par de nombreux types cellulaires comme les cellules sanguines, les macrophages, les fibroblastes, les cellules endothéliales, *etc.* Au contraire, les interleukines ne présentent entre elles aucun lien biochimique ou fonction biologique proche, et sont classées par ordre de découverte. Elles sont principalement produites par les cellules impliquées dans la réponse immunitaire (monocytes, macrophages, lymphocytes, NKs, *etc.*) (Clavel, Thiolat, et Boissier 2013).

2. La lignée myéloïde

2.1. Les différentes cellules de la lignée myéloïde

Les différentes lignées hématopoïétiques proviennent de la différenciation des cellules souches pluripotentes de la moelle osseuse, qui expriment fortement l'antigène CD34 (CD34⁺). Sous l'action de divers signaux (facteurs de croissance, cytokines, *etc.*), ces cellules se pré-

différencient en cellules souches progénitrices de la lignée myéloïde ou de la lignée lymphoïde, puis en cellules souches déterminées CFU-GM/Meg/Eo/Baso et BFU-E. Celles-ci se différencient elles-mêmes en précurseurs puis en cellules matures fonctionnelles sous l'action de facteurs de croissance, donnant naissance aux différentes cellules de la lignée myéloïde (monocytes, érythrocytes, plaquettes, etc.) (**Figure 14**). Les monocytes différenciés à partir des CFU-M passent dans le sang circulant et se différencient dans les tissus en macrophages ou en cellules dendritiques après extravasation pour donner naissance à la lignée mononuclée phagocytaire. Ces cellules jouent un rôle crucial dans le maintien général de l'homéostasie de notre organisme, et de ce fait sont des acteurs clés de l'inflammation, de l'auto-immunité, dans les infections, les cancers, etc.

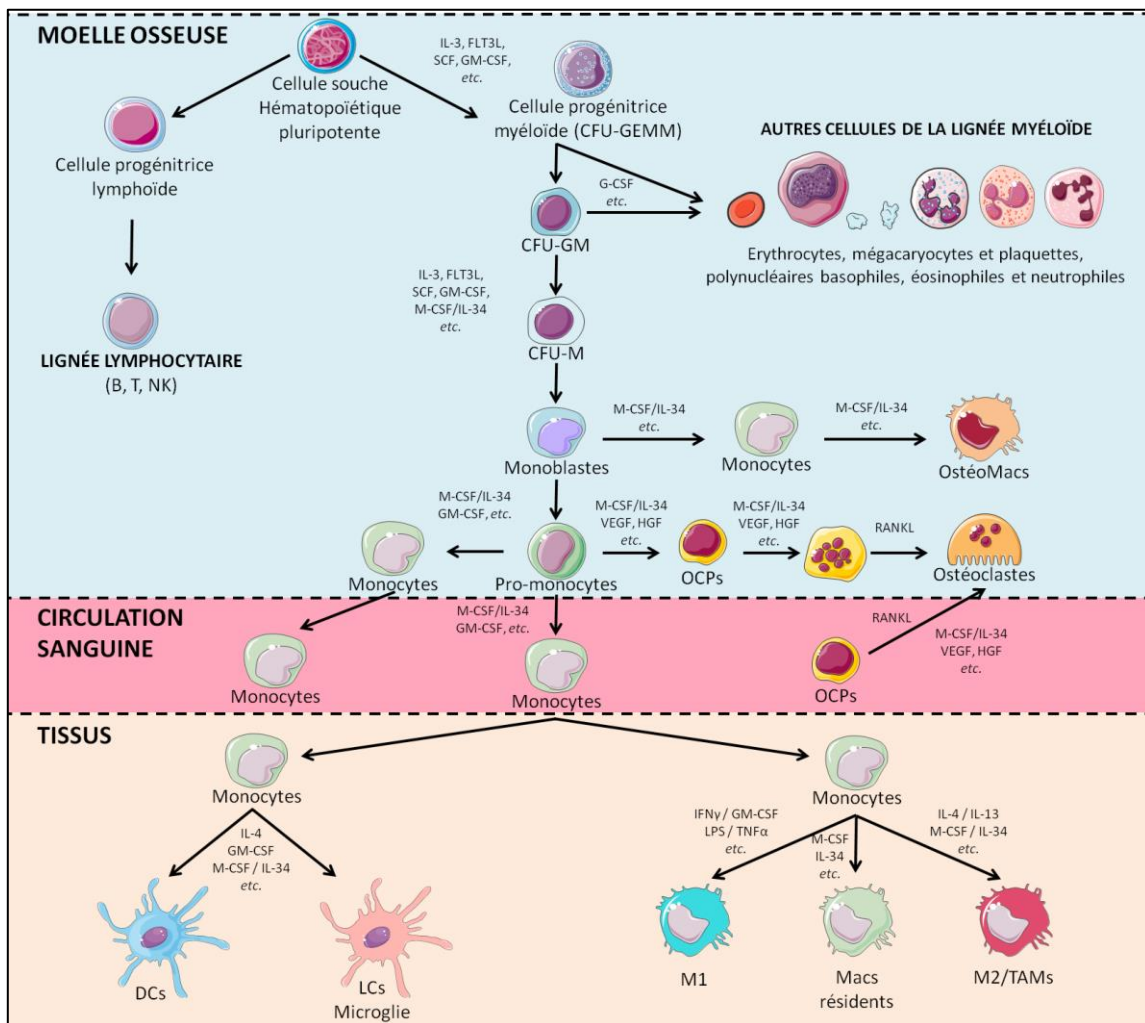


Figure 14 : Différenciation de la lignée myéloïdes et en particulier des cellules mononuclées phagocytaires. CFU-GEMM : Colony-Forming Unit-Granulocyte, Erythrocyte, Monocyte/macrophage, Megakaryocyte ; CFU-GM : Colony-Forming Unit-Granulocyte, Monocyte/macrophage ; CFU-M : Colony-Forming Unit- Monocyte/macrophage ; DCs : Cellules dendritiques ; LCs : Cellules de Langerhans ; Macs : Macrophages ; OCPs : Précurseurs ostéoclastiques ; OsteoMacs : Macrophages de l'os ; TAMs : Macrophages associés à la tumeur. http://www.servier.fr/smart/home_smart.asp.

2.2. Les macrophages résidents ou activés

2.2.1. Les macrophages tissulaires

Le développement, l'homéostasie, la réparation tissulaire et les fonctions immunitaires sont permis grâce aux cellules de la lignée mononucléée phagocytaire. Les macrophages peuplent de nombreux tissus de l'organisme, exerçant des fonctions variables. Leur rôle premier est en lien avec leur nom (phagocytes), puisqu'ils jouent le rôle d'« éboueurs » de l'organisme, par endocytose des pathogènes ou des cellules mortes, participant ainsi à la réponse immunitaire innée. Leurs fonctions sont trophiques : morphogénèse osseuse, angiogénèse, adipogénèse, polarisation neuronale pour le développement sexuel, etc. Parmi les macrophages tissulaires « spécialisés », se trouvent entre autres les cellules de Langerhans dans la peau, les cellules de Kupffer du foie, les cellules de la microglie dans le cerveau, les macrophages alvéolaires des poumons. Les cellules dendritiques sont principalement des cellules présentatrices d'antigènes, bien qu'également douées de phagocytose. Elles participent plutôt à la réponse immunitaire adaptative, et sont présentes dans tous les tissus, en particulier le thymus et l'épiderme. Cependant, la distinction entre macrophages et cellules dendritiques n'est pas si simple, et l'existence de ces deux catégories reste controversée (Frédéric Geissmann *et al.* 2010). En effet, les macrophages peuvent occasionnellement jouer le rôle de cellule présentatrice d'antigènes, et expriment donc les molécules de classe II du CMH. De plus, des études ont démontré que les deux types cellulaires expriment le CD68 et le F4/80 (ou EMR-1), considérés généralement comme des marqueurs macrophagiques. Par ailleurs, les cellules sentinelles des poumons expriment le CD11c, marqueur des cellules dendritiques, et sont pourtant décrites comme des macrophages alvéolaires (Ferenbach et Hughes 2008). De même, les cellules de Langerhans sont également décrites comme étant un type particulier de cellules dendritiques. Les cellules de Langerhans représentent la population majeure de cellules myéloïdes dans l'épiderme, et se développent différemment des autres cellules dendritiques. En effet, elles sont issues de précurseurs monocytaires dérivant du foie fœtal qui colonisent la peau au cours du développement embryonnaire, et se différencient en cellules de Langerhans matures après la naissance. Cette maturation est M-CSFR dépendante, alors que la régulation des autres cellules dendritiques dépend plus du FLT3. Au cours de lésions tissulaires, les cellules de Langerhans sont drainées dans les ganglions lymphatiques ou meurent, et sont remplacées par de nouvelles cellules de Langerhans dérivées des précurseurs monocytaires du sang circulant. Ce processus semble plutôt M-CSF dépendant. Les cellules microgliales (ou microglie) sont des macrophages résidents du cerveau qui jouent un rôle dans le développement du système nerveux central et sont impliqués dans les pathologies neurologiques. Chez la souris, elles proviennent de précurseurs myéloïdes du sac embryonnaire qui viennent coloniser le cerveau au cours du développement embryonnaire (Ginhoux *et al.*

2010). En cas de lésion, des précurseurs de la moelle osseuse sont recrutés pour régénérer la microglie.

2.2.2. L'activation et la polarisation des macrophages

Les macrophages adoptent un phénotype particulier en fonction du contexte où ils se trouvent et des stimulations auxquelles ils sont soumis. Ainsi, suite à une agression de l'organisme (infection virale ou bactérienne, lésion, etc.), les macrophages résidents sont activés et produisent des cytokines et chimiokines sur le site, entraînant le recrutement d'autres cellules immunitaires comme les lymphocytes T ou les NK. Les cytokines produites par ces autres types cellulaires favorisent la réponse immunitaire T_H1 (immunogène, pro-inflammatoire, liée à la destruction tissulaire) ou T_H2 (tolérogène, anti-inflammatoire, liée à la réparation tissulaire) et polarisent les macrophages en fonction du type de réponse. Différentes classes de macrophages peuvent alors être établies, mais cette classification varie selon les auteurs.

De manière générale, les macrophages dits activés « classiquement », appelés M1, servent à la défense immunitaire de l'organisme contre les infections bactériennes, les virus, les cellules tumorales, etc. en recrutant les lymphocytes T helper 1 via la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-12 ou l'IL-23 (réponse immunitaire T_H1). Les macrophages adoptent un profil type M1 lorsqu'ils sont activés par l'IFN γ , le GM-CSF en association avec d'autres cytokines comme le TNF- α ou des éléments produits par les pathogènes (LPS, ligands de la famille de ceux du Toll-like récepteur) (Pollard 2009). Ces M1 sont essentiels pour la défense de l'organisme, mais une activation dérégulée de ces M1 peut conduire à une production excessive de cytokines pro-inflammatoires qui conduit à des lésions tissulaires, comme c'est le cas dans les maladies auto-immunes ou l'inflammation chronique. Au contraire, les macrophages M2 dits « activés de façon alternative », (réponse immunitaire T_H2), régulent la réparation tissulaire suite à une lésion en exerçant un effet anti-inflammatoire. En effet, lors de la réponse inflammatoire aiguë qui fait suite à la lésion, la phase précoce est plutôt inflammatoire avec une réponse cytotoxique, tandis que la phase terminale est plutôt anti-inflammatoire associée à un mécanisme de réparation tissulaire. Les M2 sont stimulés par l'IL-4 ou l'IL-13 produites lors de la lésion tissulaire ou par les lymphocytes T_H2 recrutés sur le site. Ils sécrètent des quantités importantes d'IL-10, de TGF- β , de facteurs pro-angiogéniques et sont impliqués dans le remodelage de la MEC (Murray et Wynn 2011). Les macrophages associés à la tumeur (TAMs) sont les macrophages du microenvironnement tumoral, et proviennent de la différenciation des monocytes du sang circulant recrutés sur le site tumoral. Les TAMs peuvent avoir un rôle pro ou anti-tumoral, mais sont généralement associés à la suppression de l'immunité anti-tumorale et présentent un phénotype proche de celui des M2 (Biswas et Mantovani 2010). Cependant, les TAMs peuvent aussi être très peu polarisés, avec un phénotype n'étant caractéristique ni du M1, ni du M2. En effet, certains auteurs décrivent les TAMs comme une catégorie de macrophages à part (Murray et Wynn 2011).

Malgré tout, il faut garder en tête que toutes ces populations de macrophages représentent un continuum, comme dans la classification originale de Metchnikoff, datant déjà d'un siècle. Il existe donc plutôt des phénotypes intermédiaires plutôt que des populations bien définies comme celles décrites ci-dessus, ce qui explique les difficultés de caractérisation. De plus, les macrophages adaptent leur phénotype en fonction de leur microenvironnement, et n'ont donc pas un phénotype fixe (Stout *et al.* 2005).

3. Le Macrophage Colony-Stimulating Factor (ou M-CSF)

3.1. Caractérisation, structure et isoformes

Le M-CSF (pour *Macrophage Colony-Stimulating Factor*), aussi connu sous le nom de CSF-1, est le premier CSF (pour *Colony-Stimulating Factor*) identifié et purifié en 1976. En effet, cette glycoprotéine a tout d'abord été décrite comme un facteur stimulant la formation de colonies de macrophages (Stanley *et al.* 1976; Stanley et Heard 1977; Stanley, Chen, et Lin 1978), et est aujourd'hui classée parmi les facteurs de croissance hématopoïétiques.

Le gène codant pour le M-CSF est localisé sur le chromosome 1 chez l'homme, et le chromosome 3 chez la souris. Il fait 21kb, et possède 10 exons et 9 introns, la séquence codante étant composée des 8 premiers exons (Pandit *et al.* 1992). Quatre ARNm sont issus de la transcription du gène, avec un épissage alternatif possible au niveau de l'exon 6, et la présence alternative de l'exon 9 ou 10 dans la région 3'UTR non-traduite. L'exon 6 code pour un domaine susceptible d'être épissé contenant des sites de clivage protéolytique, deux sites de N-glycosylation, un d'O-glycosylation, un site d'addition de GAG et en 3' un domaine non épissé codant pour la région transmembranaire. Les variants 1 et 4 codent pour le précurseur protéique complet de 554 acides aminés. Le variant 2 est issu d'un épissage partiel au sein de l'exon 6 conduisant à un précurseur protéique de 438 acides aminés dans lequel il manque les deux sites de N-glycosylation. Le domaine de l'exon 6 est complètement épissé dans le variant 3 et conduit à un précurseur tronqué de 256 acides aminés (Praloran 1997).

Le M-CSF est produit sous forme d'une glycoprotéine dimérique. La cristallographie à rayons X montre que chaque monomère de 192 acides aminés forme une protéine globulaire à hélices (Pandit *et al.* 1992). Les 148 premiers acides aminés du M-CSF sont nécessaires à son activité biologique. Au sein de cette séquence, 7 résidus cystéines forment trois ponts disulfures intra-chaîne et participent à la formation d'un pont disulfure entre les deux monomères, stabilisant ainsi le dimère (**Figure 15**).

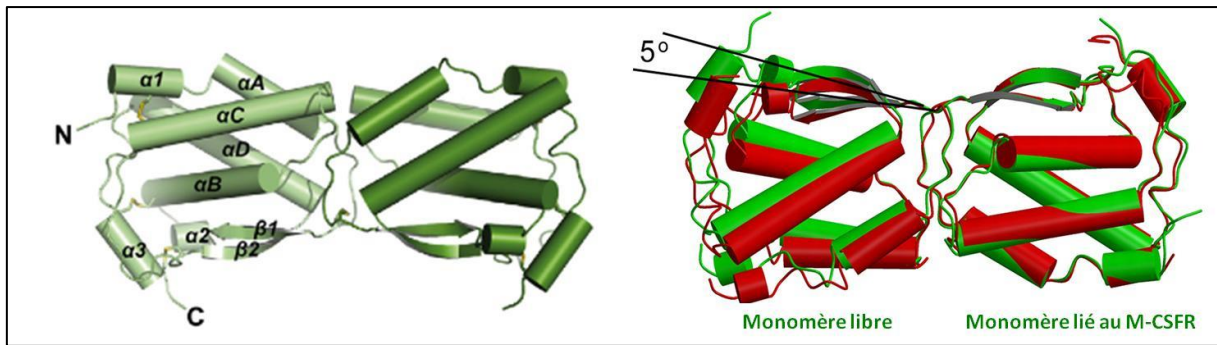


Figure 15 : Structure tridimensionnelle d'un dimère de M-CSF.

À gauche la structure tertiaire du M-CSF en solution, issue de la cristallographie (tiré de (Ma *et al.* 2012)), avec ses quatre hélices principales αA , αB , αC et αD typiques des cytokines hélicales comme le SCF, le FLT3L. À droite, le M-CSF dont un des monomères est lié au M-CSFR (en vert) est superposé au M-CSF libre (en rouge) au niveau du monomère lié (tiré de Chen *et al.* 2008), montrant que cette liaison induit une rotation du deuxième monomère, du fait de la présence du pont disulfure inter-chaîne.

Le M-CSF est présent sous trois formes biologiques (**Figure 16**) : deux sont solubles, le protéoglycane (spM-CSF) (Price *et al.* 1992) et la glycoprotéine simple (sgM-CSF) (Manos 1988), tandis que la dernière est liée à la membrane (csM-CSF) (Cerretti *et al.* 1990). Les deux formes solubles contribuent de façon équitable au M-CSF circulant. Les formes sécrétées et la forme membranaire proviennent respectivement des précurseurs homodimériques de 554 et 438 acides aminés ou du précurseur tronqué (**Figure 16**). La séquence N-terminale de 148 acides aminés déterminante dans l'activité biologique du M-CSF est la même, tandis que le reste de la séquence détermine les différentes isoformes. Les deux formes sécrétées du M-CSF sont issues de la protéolyse des formes longues des précurseurs au sein des vésicules de sécrétion. La glycoprotéine est produite par clivage N-terminal et le protéoglycane par clivage C-terminal. Ce dernier possède une chaîne polypeptidique plus longue sur laquelle une unique chaîne de chondroïtine sulfate de 18 kDa a été ajoutée dans le Golgi (une par monomère). La forme membranaire dérive du précurseur tronqué, issu d'un ARNm dans lequel les régions codant pour les zones de clivage protéolytique et d'addition des glycosaminoglycanes ont été épissées. Toutes les formes du M-CSF sont N- et O- glycosylées, et la forme la plus longue fait 192 acides aminés (spM-CSF) (Pixley et Stanley 2004).

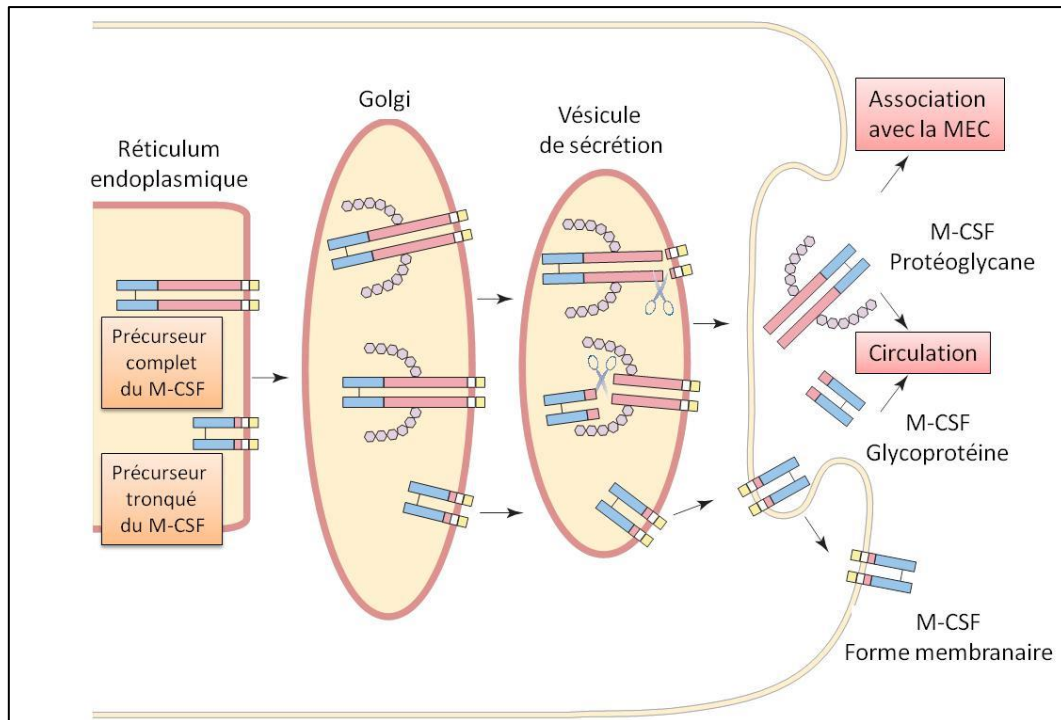


Figure 16 : Biosynthèse et localisation des trois formes du M-CSF produit par les cellules.

Les isoformes du M-CSF sont synthétisées à partir d'un précurseur complet (précurseur de 554 ou 438 acides aminés) ou de sa forme tronquée, issue par épissage alternatif des sites de l'ARNm codant pour les sites de clivage protéolytique ou d'addition des GAGs. Les 150 acides aminés de l'extrémité N-terminale présents chez les deux précurseurs (en bleu) sont suffisants pour conférer une activité biologique au M-CSF *in vitro*. Les formes sécrétées dérivent de la protéolyse du précurseur complet au sein de vésicules de sécrétion. La glycoprotéine est obtenue suite à un clivage au sein de l'extrémité N-terminale tandis que le protéoglycane est obtenu par un clivage C-terminal, conservant ainsi les chaînes de chondroïtine sulfate ajoutées dans le Golgi (représentées par une suite de ronds). Chaque forme est N- ou O-glycosylée dans le réticulum endoplasmique et le Golgi respectivement. Après fusion des vésicules de sécrétion avec la membrane plasmique, les formes sécrétées s'accumulent dans le milieu extracellulaire tandis que la forme membranaire est stablement exprimée à la membrane plasmique. D'après (Pixley et Stanley 2004).

3.2. Récepteurs et mode d'action

3.2.1. Activation classique via le M-CSFR

Comme décrit dans la partie précédente, le M-CSF est le premier ligand du M-CSFR, et le lie dans une stoechiométrie 2:2 avec une forte affinité ($K_D=0,4$ nM en utilisant du M-CSF radio-marqué à l'iode 125) (Guilbert et Stanley 1986). Par ailleurs, l'affinité mesurée en utilisant l'intégralité de l'ectodomaine est plus faible, puisque les constantes de dissociation à l'équilibre mesurées chez l'homme et la souris sont respectivement de $K_D=13,6$ nM et $K_D=21,7$ nM en utilisant l'intégralité de l'ectodomaine avec ces cinq domaines IgG (M-CSFR_{D1-D5}). Ceci s'explique par l'absence de la région TM, de la pré-dimérisation du récepteur et de l'orientation donnée par la membrane (Elegheert *et al.* 2011). L'activation du M-CSFR et les voies de signalisation induites par le M-CSF ont été détaillées dans la partie I.

3.2.2. BARF1, récepteur leurre du M-CSF

BARF1 est une protéine hexamérique produite suite à l'infection de cellules par le virus Epstein-Barr (EBV) (**Figure 17**). Son rôle est d'atténuer la réponse immunitaire en servant d'antagoniste soluble du M-CSFR, limitant ainsi l'activation des macrophages. BARF1 sert donc de récepteur leurre et peut lier trois dimères de M-CSF avec une très forte affinité (de l'ordre du picomolaire), les bloquant dans une conformation qui gêne stériquement l'interaction de la cytokine avec le M-CSFR et diminue drastiquement la formation des complexes M-CSF/M-CSFR (Shim *et al.* 2012). BARF1 est dite protéine « M-CSFR-like », car elle possède des homologies de séquence avec les séquences codant pour les domaines IgG du M-CSFR (Tarbouriech *et al.* 2006).

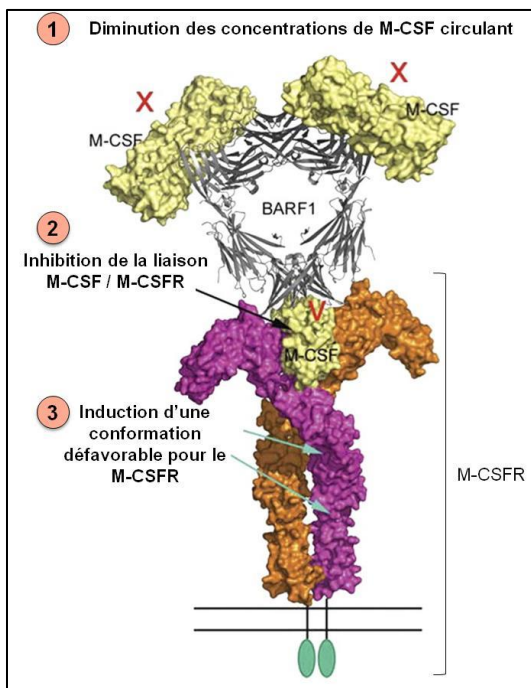


Figure 17 : Inhibition par le récepteur leurre BARF1 de la signalisation induite par la fixation du M-CSF sur le M-CSFR.

BARF1 est une protéine hexamérique produite par le virus Epstein-Barr et qui inhibe la réponse immunitaire. 1) BARF1 lie trois dimères de M-CSF, diminuant ainsi la concentration libre de M-CSF. 2) La liaison de BARF1 entraîne une rotation de 20° d'un monomère de M-CSF par rapport à l'autre, et sa liaison avec l'hélice αB du M-CSF induit une liaison incomplète avec le M-CSFR. 3) La liaison partielle des dimères de M-CSF induit une conformation défavorable du M-CSFR, empêchant son activation. D'après (Shim *et al.* 2012).

3.2.3. M-CSF et barrière inter-espèces

La cross-réactivité du M-CSF est singulière, puisque la forme humaine est capable d'activer les formes primates et non-primates, avec néanmoins une activité 5 fois plus faible pour le récepteur murin ($K_D=66.2$ nM sur le M-CSFR_{D1-D5}). Au contraire, la forme murine se lie 500 fois moins bien au récepteur humain, n'induisant pas de signalisation via le M-CSFR ($K_D=2.8$ μ M sur le M-CSFR_{D1-D5} humain) (Elegheert *et al.* 2011).

3.3. Distribution tissulaire, expression et rôle au sein de l'organisme

3.3.1. Une expression ubiquitaire dans les tissus

Le M-CSF est quasiment exprimé dans tous les tissus au sein de l'organisme, des tissus hématopoïétiques aux tissus germinaux en passant par les tissus digestifs (**Tableau 3**). Le M-CSF est produit par des cellules originaires de la moelle osseuse, dérivant soit des cellules souches hématopoïétiques (monocytes, macrophages, etc.) soit de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses : fibroblastes du stroma, ostéoblastes, myoblastes, cellules endothéliales mais aussi adipocytes. Le M-CSF est également produit dans la pulpe rouge et la zone marginale de la rate, dans la zone corticale des ganglions lymphatiques, dans le cortex du thymus mais aussi par les cellules épithéliales de l'utérus, les cellules de la granulosa des ovaires, et les cellules interstitielles du testicule. De plus, les cellules des cryptes de l'intestin ainsi que les cellules des glandes pyloriques de l'estomac sécrètent aussi du M-CSF, de la même manière que les neurones, le foie, les glandes salivaires, mammaires, sébacées et surrénales (Ryan *et al.* 2001).

	Rate	Ganglions lymphatiques Thymus	Moelle osseuse Os	Ovaires Utérus	Testicules	Epiderme	Derme	Foie	Rein	Tube digestif	Glandes	Cerveau	Poumons Coeur	Muscle	Tissu adipeux
M-CSF	+	+++	++	++	+	-	+	++	++	+	++	++	+	+	+
IL-34	+	+	+	+	++	+++	-	+	++	?	+	+++	+	?	+

Tableau 3 : Expression du M-CSF et de l'IL-34 dans différents organes.

Ce tableau fait le bilan des expressions reportées en ARNm et en protéines, à la fois chez l'homme et chez la souris, et se base sur les phénotypes des souris possédant une inactivation du gène du M-CSF ou de l'IL-34. Les cases en couleur sont basées sur l'expression en ARNm chez l'homme ou la souris, mais n'ont pas été confirmées au niveau protéique chez les souris KO IL-34. -, non-exprimé ; +, faiblement exprimé ; ++, expression intermédiaire ; +++, fortement exprimé ; ?, controversé dans la littérature. En effet, Lin reporte une expression de l'IL-34 dans l'intestin grêle et le côlon humains, tandis que Colonna et Wei décrivent une absence d'expression dans l'intestin et l'estomac chez la souris. De même, Wei détecte une expression assez importante de l'ARNm de l'IL-34 dans le muscle squelettique de la souris, tandis que Lin n'en détecte pas chez l'homme (Heymann 2010; Greter *et al.* 2012; Lin *et al.* 2008; Ryan *et al.* 2001; Wang *et al.* 2012; Wang et Colonna 2014; Wei *et al.* 2010).

Le M-CSF est détectable dans la circulation sanguine, et les taux mesurés augmentent suite aux infections par exemple, avant que le M-CSF excédentaire ne soit dégradé dans le foie par les cellules de Kupffer. Les concentrations de M-CSF circulant sont de l'ordre du ng/mL. Les dernières études rapportent une concentration moyenne de 9 ng/mL (Nandi *et al.* 2006), alors que des études plus anciennes détectaient des taux de M-CSF circulant un peu plus bas (0,4 à 1 ng/mL) (Weinberg *et al.* 1991). La synthèse du M-CSF est régulée par de nombreux facteurs comme les cytokines, les hormones thyroïdiennes ou les produits bactériens régulant notamment la réponse immunitaire ou la grossesse (Pixley et Stanley 2004).

3.3.2. Conséquences de l'inactivation du gène codant pour le M-CSF

La découverte de la mutation ostéopétrotique date de 1976, suite à la découverte d'un phénotype squelettique anormal chez des souris possédant un retard de croissance, des problèmes de fertilité, une ossification plus importante, et des défauts osseux (absence de dents, etc.). Cette mutation a permis de bien caractériser le rôle du M-CSF dans le développement et l'homéostasie tissulaire. En effet, les souris (*op/op*) sont homozygotes pour la mutation non-sens qui touche le gène codant pour le M-CSF (chromosome 12). L'insertion d'un nucléotide dans l'exon 4 du M-CSF entraîne un déplacement du cadre de lecture et la synthèse d'une protéine inactive de 63 acides aminés (Marks et Lane 1976). Ce phénotype est reproduit chez des souris transgéniques possédant une mutation inactivatrice du gène du M-CSF (*CSF-1^{op/op}*) (**Figure 18**). L'ostéopétrose, l'absence de dents et les autres anomalies du squelette s'expliquent par un défaut en ostéoclastes et une forte diminution des macrophages résidents de l'os (OstéoMacs) qui régulent la résorption et le remodelage osseux. Ces souris possèdent également une diminution des macrophages tissulaires dans la cavité péritonéale, le foie et le rein. Au contraire, la microglie semble peu altérée (30% de cellules microgliales en moins environ), de même que les macrophages présents dans le thymus et les ganglions lymphatiques. Les souris *CSF-1^{op/op}* possèdent des cellules de Langerhans à la naissance (Dai *et al.* 2002), mais ces cellules disparaissent à l'âge adulte, suggérant un rôle du M-CSF dans le renouvellement de ces cellules (Takahashi, Naito, et Shultz 1992). Ces observations montrent que suivant leur localisation, les cellules phagocytaires ne sont pas toutes dépendantes au M-CSF de la même façon (Yoshida *et al.* 1990).

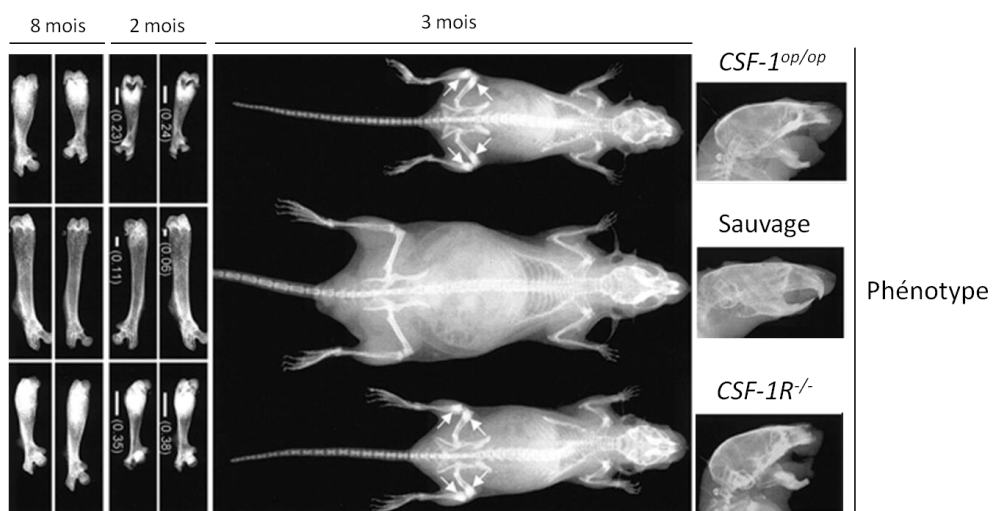


Figure 18 : Phénotype osseux des souris sauvages ou possédant une mutation inactivatrice sur le gène du M-CSF (*CSF-1^{op/op}*) ou une inactivation du gène du M-CSFR (*CSF-1R^{-/-}*).

Radiographies de la tête, du corps et des fémurs des animaux à différents âges (2, 3 et 8 mois). Les fémurs (en bas) sont issus de 4 animaux différents. L'absence de dents est particulièrement visible au niveau de la radiographie de la tête des souris. La taille des souris *CSF-1R^{-/-}* et *CSF-1^{op/op}* est plus faible, et une hyperminéralisation du squelette est visible notamment au niveau des plaques de croissances fémorales et tibiales (flèches). Les barres et les chiffres entre parenthèses indiquent respectivement la taille et la fraction du fémur qui apparaît fortement opaque à la radiographie. Tiré de (Dai *et al.* 2002).

L'injection quotidienne de M-CSF recombinant à une concentration proche des taux circulants améliore en partie ces anomalies phénotypiques. De plus, l'expression chez les souris *CSF-1^{op/op}* d'un transgène codant pour le précurseur complet du M-CSF et son expression sous un promoteur du M-CSF et son premier intron du gène restaure un phénotype et un développement normal (Dai *et al.* 2002; Ryan *et al.* 2001; Wiktor-Jedrzejczak *et al.* 1991).

3.3.3. Le M-CSF dans l'homéostasie tissulaire, l'immunité et l'inflammation

3.3.3.i. Le M-CSF et la lignée myéloïde

Découvert depuis maintenant une trentaine d'années, le M-CSF régule la biologie de la lignée phagocytaire mononucléée, notamment la prolifération, la survie et le développement des monocytes et macrophages tissulaires à partir des précurseurs hématopoïétiques (Hamilton 2008). Cependant, au moment de la différenciation myéloïde précoce le M-CSF ne permet pas à lui seul la prolifération et la différenciation des progéniteurs multipotents, et il synergise par exemple avec le SCF ou l'IL-3 pour produire les cellules progénitrices myéloïdes (**Figure 19**). Le M-CSF induit la formation et la fusion de précurseurs ostéoclastiques pour former des ostéoclastes multinucléés qui participent au remodelage osseux en résorbant l'os (Teitelbaum et Ross 2003). Il est également impliqué dans la formation des cellules de Langerhans (Ginhoux *et al.* 2006), de la microglie et des cellules dendritiques dérivées des monocytes qui constituent les cellules dendritiques majoritairement recrutés dans les tissus au cours de l'inflammation (Frederic Geissmann *et al.* 2010).

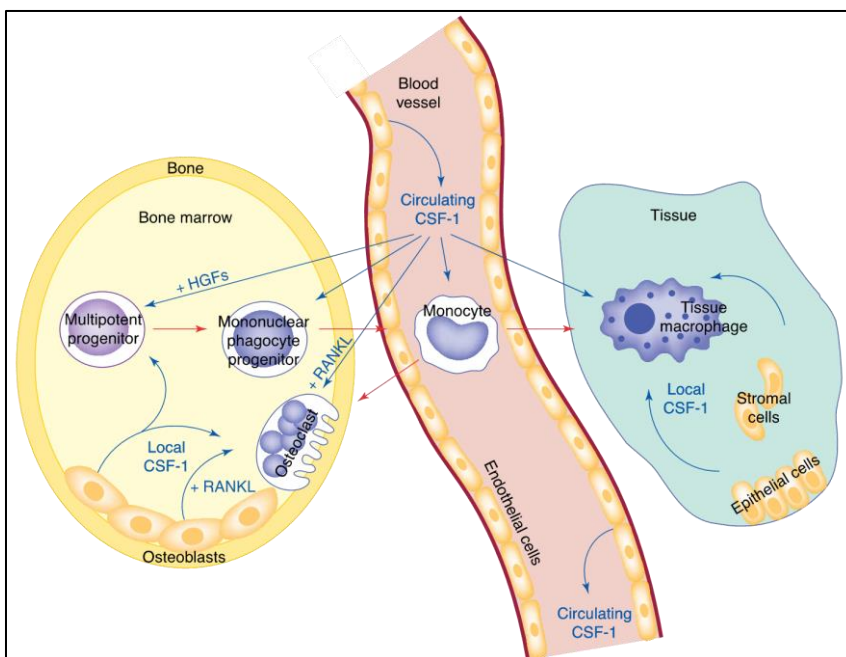


Figure 19 : Régulation des macrophages et des ostéoclastes par les diverses sources de M-CSF.

Le M-CSF (ici CSF-1) circulant produit par les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et le M-CSF produit localement régule la survie, la prolifération et la différenciation de la lignée myéloïde. Le M-CSF synergise avec les facteurs de croissance hématopoïétiques (HGFs) pour générer des progéniteurs de la lignée myéloïdes à partir des cellules souches multipotentes, et avec le RANKL pour former des ostéoclastes. Les flèches rouges indiquent les étapes de différenciation, et les flèches bleues la sécrétion de cytokines. Extrait de (Pixley et Stanley 2004).

De plus, le M-CSF possède une action à des faibles concentrations (0,4 nM), induisant la survie des macrophages et inhibant la dégradation protéique (Tushinski et Stanley 1983). Le M-CSF entraîne tout d'abord chez les macrophages un important remaniement du cytosquelette, suivi plus tardivement par une augmentation de la motilité et du chimiotactisme (Pixley 2012). L'expression de marqueurs de surface comme ceux caractéristiques de la polarisation en macrophages M2 est augmentée, ainsi que l'expression du CD11b et d'un large panel de cytokines et chimiokines (Fleetwood *et al.* 2007).

3.3.3.ii. Maintien de l'homéostasie tissulaire

Le M-CSF joue un rôle clé dans l'homéostasie et le développement de nombreux organes notamment grâce à l'activation de lignée myéloïde. En effet, en induisant avec le RANKL la différenciation d'ostéoclastes le M-CSF régule la morphogenèse du squelette (Wiktor-Jedrzejczak *et al.* 1990). De plus, le M-CSF est nécessaire au développement normal des glandes mammaires au cours de la puberté et de la grossesse (Gouon-Evans, Rothenberg, et Pollard 2000). Une forte expression du M-CSF est induite dans l'utérus, l'endomètre et l'oviducte au cours de la gestation, ainsi que dans l'embryon durant le développement embryonnaire (Arceci *et al.* 1989). Par ailleurs, le M-CSF contrôle la sécrétion d'hormones endocriniennes par l'hypothalamus, qui contrôlent elles-mêmes les organes reproducteurs mâle et femelle (Cohen *et al.* 2002). Le M-CSF est également impliqué dans le développement du rein, du pancréas, dans la vascularisation, l'adipogenèse, *etc.*

3.3.3.iii. Rôle spécifique des différentes isoformes du M-CSF

La plupart des cellules qui synthétisent le M-CSF produisent les trois isoformes, qui agissent au sein de leur microenvironnement. De plus, la forme membranaire suffit à réguler localement les différentes populations de macrophages. Cependant, les formes solubles du M-CSF (spM-CSF, sgM-CSF) sont principalement sécrétées par les cellules endothéliales et participent à l'homéostasie de certains types de macrophages, notamment les cellules de Kupffer (Nandi *et al.* 2006). Les formes solubles s'accumulent rapidement dans le milieu extracellulaire après fusion des vésicules de sécrétion avec la membrane plasmique, puis dans la circulation générale et au niveau de la MEC pour le spM-CSF. En effet, le protéoglycane se lie au collagène V, aux low-density lipoprotéines (LDLs), et à la matrice osseuse (Pixley et Stanley 2004). Ces interactions expliquent peut-être pourquoi les formes solubles, et en particulier le spM-CSF, guérissent plus efficacement l'ostéopétrose chez les souris *CSF-1^{op/op}*. Néanmoins, la réexpression des deux formes solubles ne suffit pas pour récupérer le retard de croissance, en particulier au niveau du poids de l'animal, contrairement à l'expression du csM-CSF, suggérant ici un rôle important de la forme membranaire sur les adipocytes. De plus, la forme membranaire peut induire une signalisation prolongée en empêchant l'internalisation du récepteur. Il a également été montré que la

chaîne de chondroïtine sulfate du spM-CSF régulaient négativement l'action du M-CSF sur la prolifération cellulaire et stabilisait mieux la protéine (Nandi *et al.* 2006). Chaque forme aurait donc un rôle général dans la régulation des macrophages, mais également des fonctions propres.

3.3.3.iv. Inflammation, réponse immunitaire et implication pathologique

Le M-CSF sert à l'engagement des monocytes et macrophages dans la réponse immunitaire via divers mécanismes : chimiotactisme, cytotoxicité, phagocytose, production de cytokines et d'ions superoxydes, acidification des lysosomes dans les macrophages, *etc.* (Mouchemore et Pixley 2012). Le M-CSF avait été décrit à l'origine comme étant une cytokine pro-inflammatoire, activant certaines réponses immunitaires innées, alors que récemment il a été montré qu'il atténuait la réponse immunitaire en inhibant par exemple l'expression des TLRs. Le M-CSF exerce donc un rôle ambivalent, puisqu'il est requis pour lutter contre les infections bactériennes, virales, *etc.* tout en favorisant le développement de certaines pathologies comme les cancers en recrutant les macrophages dits anti-inflammatoires M2 qui vont remodeler la matrice, sécréter des facteurs pro-angiogéniques et pro-migratoires, favorisant ainsi la dissémination des cellules tumorales (Akagawa 2002). Une forte expression du M-CSF est donc retrouvée dans diverses pathologies (**Tableau 4**). Cependant, les isoformes du M-CSF pourraient avoir des rôles opposés dans les réponses immunitaires et inflammatoires. La forme membranaire aurait par exemple une action anti-tumorale en activant les M1 et les lymphocytes T cytotoxiques (par apoptose suite à la fixation du M-CSFR des macrophages sur le M-CSF membranaire des cellules tumorales, ou par présentation d'antigènes aux lymphocytes T) tandis que les formes sécrétées favoriseraient plutôt le recrutement, par chimiotactisme, de macrophages associés aux tumeurs (Graf *et al.* 1999; Jadus *et al.* 2003). Ce rôle ambivalent est également illustré par le rôle du M-CSF dans les greffes, dont la surexpression entraîne le rejet pour les allogreffes rénales et de moelle osseuse (Jose *et al.* 2003) et les xéno greffes de peau (Frétier *et al.* 2002), alors qu'il a aussi été montré que l'administration de M-CSF favorise la tolérance des allogreffes de peau (Jose *et al.* 2003; Nishina *et al.* 2004).

	Cancers	Pathologies auto-immunes / inflammatoires	Maladies métaboliques	Rejet de greffe	Maladies neurologiques	Autres pathologies
M-CSF	Leucémies (-)	Arthrose (-)	Obésité (-)	Peau (-/+)	<i>Maladie d'Alzheimer (+)</i>	<i>Fibrose pulmonaire (-)</i>
	Gliomes (+)	<i>Polyarthrite rhumatoïde (-)</i>	<i>Athérosclérose (-)</i>	<i>Rein (-)</i>	<i>Encéphalite due au HIV-1 (+)</i>	Lésion du rein (+)
	Carcinomes (souvent métastatiques):	<i>Maladies inflammatoires de l'intestin (Crohn, coliques ulcéreuses...)</i> (-)	<i>Résistance à l'insuline (-)</i>	<i>Moelle osseuse (-/+)</i>	Encéphalites / Sclérose latérale amyotrophique (-/+)	Ulcère gastrique (+)
	- Côlon (-)	Néphrites (-)				
	- Sein (-)	<i>Histiocytose Langerhansienne (-)</i>				
	- Prostate (-)	<i>Lupus (peau, rein, systémique...)</i> (-)				
	- Ovaire (-)	<i>Hépatite C chronique (-)</i>				
IL-34	Cancer du sein (-)	<i>Polyarthrite rhumatoïde (-)</i>	Obésité (-)		Maladie d'Alzheimer (+)	Anémie infectieuse équine (-)
		<i>Maladies inflammatoires de l'intestin (coliques ulcéreuses)</i> (-)	<i>Athérosclérose (-)</i>			
		<i>Syndrome de Gougerot-Sjögren (-)</i>	<i>Résistance à l'insuline (-)</i>			
		<i>Hépatite C chronique (-)</i>				
		Lupus néphrétique (-)				
		Périodontite (-)				

Tableau 4 : Surexpression du M-CSF et de l'IL-34 dans de nombreuses pathologies.

Le rôle pathologique ou protecteur des cytokines dans les différentes pathologies est indiqué respectivement indiqué par (-) ou (+). Les pathologies sont indiquées en gras et italique lorsque la surexpression et/ou l'implication des cytokines a été mise en évidence chez l'homme en plus de modèles *in vitro* et *in vivo*.

3.3.4. Régulation de l'expression du M-CSF

L'expression du M-CSF peut être régulée par différents facteurs, et est notamment augmentée par certaines cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β et le TNF- α , via l'activation de la sous-unité p50 du facteur nucléaire NF- κ B (Yao *et al.* 2000). De plus, le M-CSF peut stimuler lui-même son expression par l'activation de la PKC et de NF- κ B (Brach *et al.* 1991).

4. Découverte de l'interleukine-34: biologie comparée avec sa cytokine jumelle, le M-CSF

4.1. Caractérisation, structure et isoformes

4.1.1. Découverte récente d'une cytokine « jumelle » du M-CSF

Depuis plusieurs années, les chercheurs suspectent l'existence d'un autre ligand pour le M-CSFR. La découverte de l'interleukine-34 (IL-34) en 2008 lève le voile sur la « sœur jumelle » du M-CSF. L'IL-34 a été identifiée au cours d'une expérience importante visant à tester dans une trentaine d'essais fonctionnels (réponse immunitaire, cardiovasculaire, métabolisme, survie et différenciation cellulaire, *etc.*) une librairie protéique humaine contenant 3400 domaines extracellulaires et protéines sécrétées. Cette protéine, déjà répertoriée parmi les protéines hypothétiques de la base de données du National Institutes of Health's Mammalian Gene Collection sous le nom de C16orf77, induisait comme le M-CSF la survie des monocytes et macrophages, mais n'avait aucun effet sur les vingt-huit autres types cellulaires testés (Lin *et al.* 2008). L'IL-34 est située sur le chromosome 16 chez l'homme, soit sur un chromosome différent de celui qui porte le M-CSF. Le gène possède 7 exons et 6 introns. Trois ARNm sont issus de l'IL-34 : les variants 1 et 3 sont des formes complètes codant pour la même protéine entière, et le variant 2 est issu d'un épissage alternatif du codon codant pour la glutamine 81, donnant lieu à une protéine tronquée. Le variant 3 a été découvert plus tardivement, et possède un promoteur et une région 5'UTR différente du variant 1 (Lin *et al.* 2008; Garceau *et al.* 2010).

4.1.2. Structure de l'IL-34 comparée avec le M-CSF

4.1.2.i. Séquence primaire

L'IL-34 est synthétisée sous forme d'une glycoprotéine de 242 acides aminés, et ne possède que deux isoformes ne différant que par la présence ou l'absence de la glutamine⁸¹. L'isoforme plus courte issue du transcrit n°2 possède une activité biologique plus faible. La forme mature sécrétée fait 222 acides aminés, contre 192 chez le M-CSF qui possède trois isoformes très différentes. La séquence primaire de l'IL-34 est originale, puisqu'elle ne présente aucune similitude avec les séquences d'autres cytokines et protéines décrites jusqu'à présent. En effet, l'IL-34 ne présente quasiment aucune homologie de séquence avec sa jumelle, le M-CSF (11% d'homologie), bien que ces deux protéines présentent une structure tertiaire et quaternaire

proche. Des analyses de co-évolution suggèrent que le M-CSF et l'IL-34 auraient évolué de façon indépendante. Par ailleurs, il faut noter que les séquences primaires du M-CSF, ou de l'IL-34, sont très conservées entre les différentes espèces de vertébrés (Garceau *et al.* 2010). Ainsi, la séquence de l'IL-34 possède respectivement 72% et 71% d'homologie avec celles du rat et de la souris, et un peptide signal très conservé (Lin *et al.* 2008). De plus, les gènes de l'IL-34 des tétrapodes et de la truite arc-en-ciel possèdent une classification phylogénétique proche puisqu'ils sont issus de gènes orthologues. Les régions les plus conservées sont celles codant pour les 4 hélices principales ou les sites de N-glycosylation (Wang *et al.* 2013).

4.1.2.ii. Séquence tertiaire et quaternaire

Avant la publication du cristal de l'IL-34, des études de modélisation informatique avaient déjà proposé une structure en hélices pour l'IL-34, la regroupant ainsi dans la même famille que le M-CSF. Les études cristallographiques réalisées par la suite sur des versions tronquées du M-CSF et de l'IL-34 confirment cette structure, et exposent des caractéristiques uniques de l'IL-34. Comme pour le M-CSF, l'IL-34 existe également sous forme de dimère à symétrie axiale (« tête-à-tête »), mais à la différence du M-CSF ses deux monomères ne sont pas reliés par un pont disulfure, comme c'est le cas pour le SCF ou le FLT3L. De plus, l'IL-34 possède la plus petite interface de dimérisation parmi les cytokines activant les RTKs III, du fait de fortes liaisons hydrophobes (Liu *et al.* 2012; Ma *et al.* 2012). Chaque monomère de l'IL-34 est constitué principalement d'un paquet formé par 4 hélices α anti-parallèles (αA , αB , αC et αD) qui constituent le site actif de la protéine. Cependant, en dehors du site actif, les deux feuillets $\beta 1$ et $\beta 2$ sont plus courts que dans le M-CSF et partiellement remplacés par des petites hélices (Liu *et al.* 2012; Ma *et al.* 2012). Ces petites hélices relient respectivement αA et αB d'une part, et αC et αD d'autre part, et s'associent avec les 4 hélices via des interactions hydrophobes pour former cette cytokine en « paquet » (**Figure 20**). En plus des interactions hydrophobes, deux ponts disulfures servent à stabiliser la structure du monomère, à des endroits totalement différents de ceux présents dans le M-CSF, le SCF ou le FLT3L. En effet, le premier relie les hélices αA et αD , tandis que le deuxième verrouille l'extrémité C-terminale à la fin de l'hélice αD . De façon surprenante, l'IL-34 est structurellement plus proche du SCF bien qu'elle partage un récepteur et donc des fonctions communes avec le M-CSF (Ma *et al.* 2012).

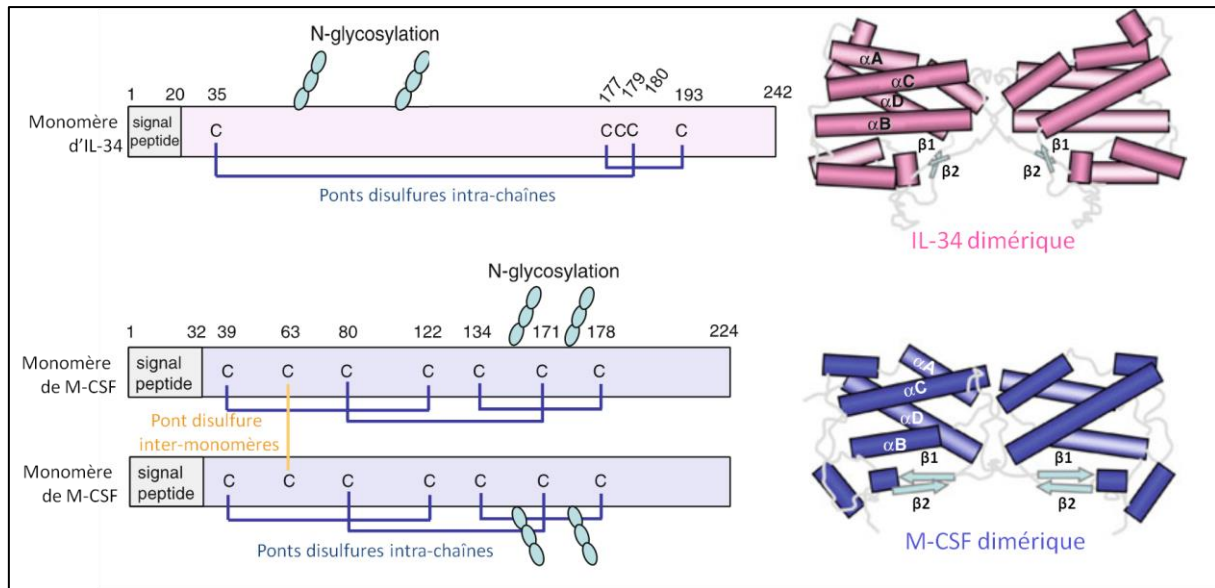


Figure 20 : Structures de l'IL-34 et du M-CSF.

À gauche, la localisation des résidus cystéines est indiquée sur la structure primaire des cytokines, ainsi que les ponts disulfures intra-monomères ou inter-monomères. Les sites de N-glycosylation sont schématisés sur la structure primaire, tandis que les sites d'O-glycosylation ne sont pas indiqués. À droite, les structures tridimensionnelles des cytokines hélicales, avec les quatre hélices typiques αA , αB , αC et αD . Les deux feuillets $\beta 1$ et $\beta 2$ sont plus courts pour l'IL-34, et sont partiellement substitués par deux petites hélices supplémentaires. D'après (Nakamichi, Udagawa, et Takahashi 2013).

L'IL-34 possède 2 sites de N-glycosylation, et au moins 5 sites d'O-glycosylation sur son extrémité C-terminale (Felix *et al.* 2013). Contrairement au M-CSF qui est stable sous forme non-glycosylée, les N-glycosylations de l'IL-34 sont essentielles à sa stabilité, et lui évitent de s'agréger. En effet, le clivage des N-glycanes des résidus asparagines 76 et 100 avec une endoglycosidase entraîne immédiatement la formation d'agrégats protéiques. Le glycanes de l'asparagine⁷⁶ remplit la cavité entre les deux hélices supplémentaires permettant sa stabilité en solution (Liu *et al.* 2012). C'est la raison pour laquelle aucune protéine recombinante d'origine bactérienne n'est disponible dans le commerce pour l'IL-34.

4.2. Mode d'action/ voies de signalisation

4.2.1. Compétition du M-CSF et de l'IL-34 sur le M-CSFR

Parmi les domaines extracellulaires de protéines transmembranaires testés lors du screening, un seul bloquait l'effet de l'IL-34 sur les cellules myéloïdes, celui du M-CSFR. Des expériences complémentaires ont validé par cytométrie en flux la liaison de l'IL-34 biotinylée aux monocytes. De plus, des essais de viabilité cellulaire en présence d'IL-34 et de l'inhibiteur chimique du M-CSFR le GW2580 ont permis de confirmer que le M-CSFR était également le récepteur de l'IL-34. Le M-CSFR est donc l'unique membre de la famille des RTKIII activé par deux ligands ne possédant aucune homologie de séquence (Lin *et al.* 2008). Le M-CSF et l'IL-34 sont donc en compétition sur le même récepteur. Cependant, bien que la plupart des anticorps bloquants anti-M-

CSFR empêchent l'action des deux cytokines, certains bloquent uniquement l'action du M-CSF, suggérant un site de liaison proche des deux cytokines sur le M-CSFR, impliquant des épitopes différents (Chihara *et al.* 2010). En effet, le M-CSF et l'IL-34 se fixent entre les domaines extracellulaires 2 et 3 du M-CSFR, mais par l'intermédiaire d'épitopes différents. La zone d'interaction entre l'IL-34 et le M-CSFR est plus large que dans le cas du M-CSF, et les interactions mises en jeu sont plutôt de type hydrophobe pour l'IL-34 et de type ionique pour le M-CSF (Felix *et al.* 2013; Liu *et al.* 2012; Ma *et al.* 2012). Les différentes études cristallographiques montrent très peu de différences entre les complexes M-CSF/M-CSFR et IL-34/M-CSFR, expliquant l'activation comparable du récepteur par les deux cytokines (**Figure 21**).

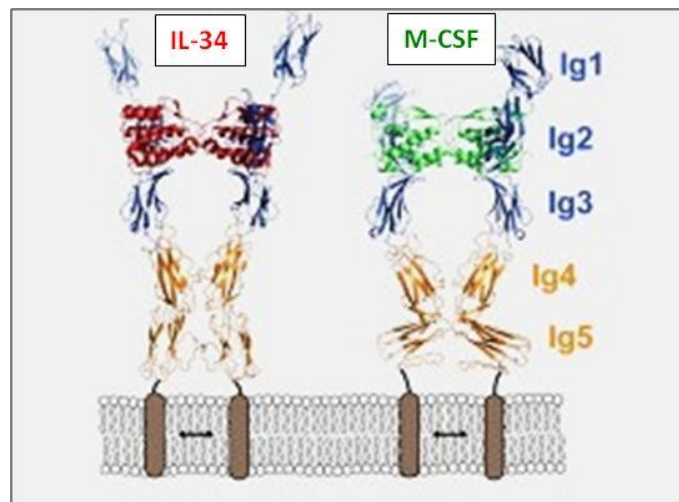


Figure 21: Structure du M-CSF et de l'IL-34 liées sur le M-CSFR.

Les monomères de M-CSFR s'orientent de façon similaire après fixation des cytokines jumelles. De plus, la distance entre les 4^{èmes} domaines extracellulaires (Ig4) qui est critique dans l'activation du récepteur est proche dans les deux cas. D'après les études cristallographiques de (Ma *et al.* 2012).

Par ailleurs, Lin a mesuré par résonance plasmonique de surface une meilleure affinité de l'IL-34 pour le M-CSFR (K_D (M-CSF) = 34 pM et K_D (IL-34) = 1 pM), et des constantes d'association et de dissociation respectivement 6 fois plus forte et 10 fois plus faible pour l'IL-34 que pour le M-CSF (Lin *et al.* 2008). Néanmoins, ces constantes sont presque 100 fois plus élevées que celles décrites dans la littérature pour le M-CSF, et s'expliquent peut-être par l'utilisation d'un récepteur chimérique M-CSFR/Fc dimérisé par un pont disulfure. En utilisant uniquement les domaines D1 à D3 du M-CSFR, Ma retrouve une affinité plus faible pour le M-CSF que pour l'IL-34 (K_D (M-CSF) = 720 nM et K_D (IL-34) = 120 nM) (Ma *et al.* 2012). Ces résultats sont liés à la forte hydrophobicité de l'interaction de IL-34/M-CSFR comparée aux interactions plutôt hydrophiles qui interviennent dans la liaison M-CSF/M-CSFR. En effet, la cinétique de dissociation de contacts hydrophobiques est beaucoup plus lente que celle de contacts hydrophiles. Par ailleurs, Wei a décrit une affinité et une activité deux fois plus faible de l'IL-34 murine sur le récepteur murin comparé au M-CSF murin (Wei *et al.* 2010).

4.2.2. Les voies de signalisation activées par l'IL-34

L'IL-34 induit la phosphorylation des mêmes tyrosines clés du M-CSFR qu'en présence de M-CSF, et le recrutement de protéines effectrices activant des voies de signalisation communes. Cependant, cette activation du M-CSFR est plus forte et plus transitoire en présence d'IL-34, suggérant des variations dans la signalisation intracellulaire induite par ces deux cytokines. Ce profil de phosphorylation est particulièrement net au niveau de la tyrosine⁵⁴⁶, et des protéines FAK et Shc (Chihara *et al.* 2010). Néanmoins, l'addition d'IL-34 induit de la même manière que le M-CSF l'activation des voies PI3K/Akt et MAPK puisque ERK1/2 et Akt sont phosphorylées de façon similaire dans des monocytes humains (CD14⁺) et murins (CD11b⁺) (Baud'Huin *et al.* 2010). De plus, une étude large des kinases phosphorylées dans des macrophages stimulés au M-CSF ou à l'IL-34 ne montre pas de différences majeures dans les voies de signalisation activées, même si les MAPK sont un peu plus phosphorylées après la stimulation à l'IL-34, et S6K et les STATs semblent au contraire moins activés (Chihara *et al.* 2010). Par ailleurs, dans une lignée de macrophages murins où le M-CSFR murin a été remplacé par une version humaine, le M-CSF et l'IL-34 humains induisent la phosphorylation de la tyrosine⁷²³ et de ERK1/2 d'une façon comparable (Wei *et al.* 2010).

4.2.3. Cross-réactivité humain/souris de l'IL-34

Contrairement au M-CSF dont la forme humaine active le récepteur murin, l'activité de l'IL-34 humaine sur le récepteur murin est plus restreinte. En effet, le M-CSF murin et humain induisent une prolifération comparable des macrophages murins, tandis que l'IL-34 humaine possède une activité plus faible que la murine, avec une EC₅₀ 30 fois plus élevée. Bien que beaucoup moins efficace, l'IL-34 humaine induit néanmoins une signalisation et la prolifération des macrophages. Au contraire, l'IL-34 murine active très bien le récepteur humain (Wei *et al.* 2010).

4.2.4. Existence d'un récepteur propre à l'IL-34

L'IL-34 possède un autre récepteur découvert récemment, le RPTPβ/ζ. Ce protéoglycane à chaînes de chondroïtine sulfate est fortement exprimé dans le système nerveux central, en particulier par les progéniteurs neuronaux et cellules gliales. La liaison de l'IL-34 sur le RPTPβ/ζ inhibe l'activité phosphatase constitutive du récepteur, induisant une augmentation de la phosphorylation de ces cibles intracellulaires. L'équipe de Stanley a démontré que la partie protéique et les chaînes de chondroïtine sulfate étaient toutes deux nécessaires pour fixer la cytokine. Ainsi, dans certains types cellulaires où sont co-exprimés le RPTPβ/ζ et le M-CSFR, la signalisation induite par l'IL-34 pourrait être le résultat d'un mécanisme de coopération entre les deux récepteurs (Nandi *et al.* 2013). En effet, une fois activé par l'IL-34, le RPTPβ/ζ pourrait agir comme un régulateur de l'activation du M-CSFR, en maintenant la phosphorylation des protéines de la signalisation. Cette découverte semble cohérente avec le rôle de l'IL-34 dans le cerveau.

4.3. Distribution tissulaire / expression dans l'organisme

Le profil d'expression de l'IL-34 semble plus restreint que celui du M-CSF (**Tableau 3**), de façon cohérente avec les observations de Wei (Wei *et al.* 2010). Chez l'homme et la souris, l'IL-34 est majoritairement exprimée par les kératinocytes de l'épiderme et les follicules pileux, ainsi que par les neurones du cerveau (**Figure 22**).

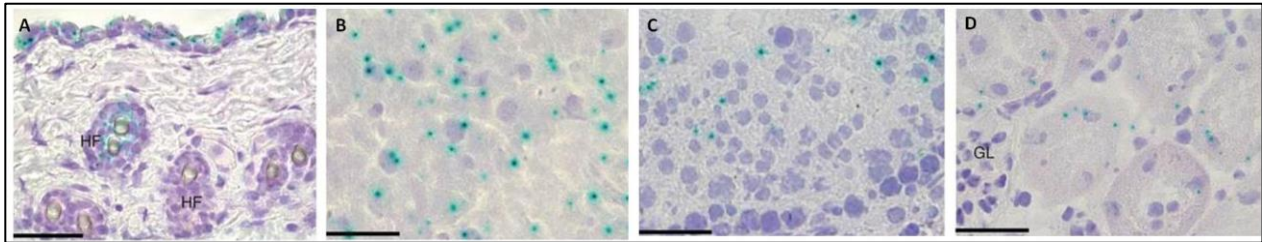


Figure 22 : Expression de l'IL-34 dans divers tissus.

L'IL-34 est localisée par une coloration X-Gal (en bleu ciel) chez la souris *IL-34^{LacZ/LacZ}* au niveau A) de la peau et des follicules pileux (HF), B) du cortex cérébral, C) du testicule et D) des tubules rénaux. Les barres d'échelle représentent 50 μ m (A) et 33 μ m (B-D). Tiré de (Wang *et al.* 2012).

Néanmoins, l'IL-34 est aussi produite par quelques cellules du testicule, des tubules rénaux, de la rate, et des ganglions lymphatiques (Wang *et al.* 2012; Greter *et al.* 2012). Lin a également décrit une expression dans plusieurs tissus humains au niveau transcriptionnel, avec une très forte expression au niveau de la rate, confirmée par immunohistochimie au niveau des cellules endothéliales bordant les sinusoides de la pulpe rouge de la rate (Lin *et al.* 2008). L'IL-34 est également produite dans le stroma des ganglions lymphatiques (Malhotra *et al.* 2012). Par ailleurs, l'IL-34 est faiblement exprimée dans l'os, puisque les ostéoblastes produisent du M-CSF et du RANKL mais très peu d'IL-34. De plus, les macrophages résidents et les ostéoclastes secrètent très peu de M-CSF et d'IL-34 (Nakamichi *et al.* 2012), et les CD14⁺ expriment peu de M-CSF et pas d'IL-34 (**données personnelles**). Concernant le cerveau, le profil d'expression spatiotemporel diffère entre le M-CSF et IL-34 chez la souris, que ce soit au niveau de la localisation ou au niveau de la cinétique d'expression, en particulier entre les tissus embryonnaires et adultes. En effet, au stade embryonnaire l'expression de l'ARNm de l'IL-34 est antérieure et 10 fois plus importante que pour le M-CSF. Au quinzième jour du développement embryonnaire murin, le M-CSF est exprimé dans les zones ventriculaires et sous-ventriculaires, tandis que l'IL-34 est restreinte à la zone marginale corticale. Cette différence perdure chez l'adulte, puisque l'IL-34 est exprimée dans la plupart des zones du cerveau après la naissance, et chez l'adulte dans des zones où le M-CSF n'est pas exprimé. Ainsi, l'IL-34 est exprimée dans l'hippocampe, le striatum et les neurones des couches II à V du cortex dans les 20 jours après la naissance, tandis que le M-CSF est uniquement localisé dans les neurones de la couche VI. De plus, l'expression de l'IL-34 est beaucoup plus faible dans la substance blanche, et absente dans le cervelet. Par ailleurs, l'IL-34 est fortement exprimée dans certaines zones où aucune expression du M-CSFR n'est retrouvée, s'expliquant par la suite avec la découverte un an plus tard de l'existence du RPTP β/ζ comme récepteur à l'IL-34 (Nandi

et al. 2012). Chez la truite arc en ciel, l'expression du M-CSF et de l'IL-34 est aussi différentielle, avec une expression plus importante et plus diffuse de l'IL-34 (Wang et al. 2013). À l'inverse du M-CSF, l'IL-34 est détectée dans le microenvironnement des cellules productrices dans des conditions normales, mais est à peine détectable à des taux circulants. Ainsi, 100 à 400 pg/mL d'IL-34 sont dosés dans les liquides synoviaux ou dans des surnageants de fibroblastes (Chemel et al. 2012; Ciccia et al. 2013) tandis que l'IL-34 est à peine détectable dans les sérums de donneurs sains. Au contraire, la cytokine est détectable autour de 5ng/mL dans le plasma de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (Tian et al. 2013).

4.4. Phénotype des souris KO IL-34 : comparaison

La comparaison des phénotypes des souris *CSF-1^{op/op}* et *CSF-1R^{-/-}* a longtemps conforté l'hypothèse d'un autre ligand pour le M-CSFR (**Tableau 5**). En effet, tout au long de leur développement, les souris *CSF-1R^{-/-}* ne présentent presque plus de cellules de Langerhans, de microglie, et l'absence presque totale d'ostéoclastes est caractérisée par une ostéopétrose marquée. De plus, ces souris montrent une déplétion générale sévère en macrophages, alors que les souris *CSF-1^{op/op}* ont seulement une forte réduction du nombre d'ostéoclastes, de macrophages et de cellules microgliales à la naissance, mais qui se rééquilibre en vieillissant. Le phénotype ostéopétrotique redevient donc normal avec l'âge, puisque le nombre d'ostéoclastes est progressivement restauré, de même que le nombre de macrophages tissulaires. Le développement des cellules de Langerhans apparaît quant à lui relativement normal dans la peau. Un autre mécanisme se met donc en place chez les souris *CSF-1^{op/op}* pour compenser l'absence de M-CSF, et s'explique par l'existence de l'IL-34. (Dai et al. 2002). Afin d'étudier spécifiquement le rôle de l'IL-34, deux groupes ont produit des souris transgéniques (*IL34^{LacZ/LacZ}*) en remplaçant le gène de l'IL-34 par un gène rapporteur, celui de la β -galactosidase. Ainsi, les auteurs ont pu montrer que la différenciation des cellules souches hématopoïétiques en monocytes, macrophages et cellules dendritiques était plutôt M-CSF/M-CSFR dépendante tandis que le développement embryogénique des cellules de Langerhans et de la microglie nécessitait plutôt l'axe IL-34/M-CSFR (**Tableau 5**). En effet, les souris *IL-34^{LacZ/LacZ}* montrent une diminution critique du nombre de cellules de Langerhans et de cellules microgliales, tandis que les monocytes, les macrophages tissulaires ou circulants et les cellules dendritiques ne semblent pas affectés. De la même façon, les cellules microgliales semblent se développer à partir des sacs embryonnaires indépendamment de l'IL-34, mais nécessitent cependant la cytokine pour leur maintien dans le cerveau chez l'adulte. Les souris *IL-34^{LacZ/LacZ}* ont donc un nombre réduit de cellules microgliales dans le cortex et l'hippocampe, mais pas dans le cervelet, suggérant que le M-CSF est le ligand majeur du M-CSFR dans cette zone. Par ailleurs, les souris *IL-34^{LacZ/LacZ}* sont fertiles contrairement aux souris *CSF-1^{op/op}* et *CSF-1R^{-/-}* (Wang et al. 2012; Greter et al. 2012).

	CSF-1R^{-/-}	CSF-1^{op/op}	IL-34^{LacZ/LacZ}
Espérance de vie	Faible Mortalité de 40% des souris CSF-1 ^{-/-} FVB/NJ avant 1 mois	Réduite	Normale
Fertilité	Réduite	Réduite	Normale
Tissu osseux	Ostéopérose Absence de dents Anomalies squelettiques Retard de croissance	Ostéopérose Absence de dents Anomalies squelettiques Retard de croissance → <i>restauration d'un phénotype normal avec l'âge</i>	Pas de défauts marquants
Monocytes du sang circulant	Diminution	Diminution	Taux normaux
Ostéoclastes	Diminution sévère (quasi absence)	Fort réduction à la naissance puis réaugmentation	Présence normale
Cellules de Langerhans	Diminution sévère (quasi absence)	Légère diminution à la naissance, taux normaux à l'âge adulte	Fort diminution
Microglie	Diminution sévère (quasi absence)	Réduite, sauf dans la matière blanche	Fort diminution
Autres macrophages tissulaires	Diminution	Diminution ou taux normaux suivant les tissus à la naissance	Taux normaux globalement

Tableau 5 Comparaison des phénotypes des souris CSF-1R^{-/-}, CSF-1^{op/op}, et IL-34^{LacZ/LacZ}.

Le phénotype des souris dont le gène du M-CSFR a été inactivé est plus sévère que ceux des souris possédant une inactivation d'un des deux ligands. Une mutation inactivatrice du gène du M-CSF semble conduire à des anomalies plus sévères au niveau des monocytes, macrophages et ostéoclastes, tandis que l'IL-34 semble être le principal régulateur des cellules de Langerhans et microgliales.

4.5. IL-34 : homéostasie tissulaire, immunité et inflammation

4.5.1. Prolifération, survie et différenciation de la lignée myéloïde

L'IL-34 induit avec une efficacité comparable au M-CSF la prolifération, la survie de monocytes humains et la formation de colonies de macrophages à partir de cellules souches hématopoïétiques humaines (Lin *et al.* 2008), ou murine (Chihara *et al.* 2010). Les mêmes résultats sont observables au niveau de la prolifération d'une lignée de macrophages (Wei *et al.* 2010). L'IL-34 permet également la survie et le chimiotactisme des macrophages, mais les macrophages différenciés en présence d'IL-34 présentent une taille plus importante et une morphologie différente de ceux différenciés en présence de M-CSF qui ont une allure fibroblastique (Chihara *et al.* 2010). Les macrophages murins différenciés par 250 ng/mL d'IL-34 possèdent des capacités migratoires plus faibles que ceux différenciés par 100 ng/mL de M-CSF (Chihara *et al.* 2010). Par ailleurs, l'IL-34 est capable de se substituer au M-CSF pour induire sous l'action conjointe du RANKL la formation d'ostéoclastes à partir de précurseurs hématopoïétiques. L'IL-34 stimule l'ostéoclastogénèse RANKL-dépendante en permettant la prolifération et l'adhérence des précurseurs ostéoclastiques, alors que la survie de ces ostéoclastes dépend du RANKL (Baud'Huin *et al.* 2010). L'injection d'IL-34 recombinante chez la souris diminue le nombre de précurseurs ostéoclastiques ainsi que le volume osseux (Chen *et al.* 2011). Cependant, il faut noter que l'activité de l'IL-34 n'est pas proportionnelle à son affinité pour le M-CSFR puisque la cytokine est moins efficace que le M-CSF pour induire la survie de monocytes humains (Lin *et al.* 2008). De plus, à concentrations équivalentes l'IL-34 induit presque deux fois moins d'ostéoclastes que le M-CSF à partir de monocytes humains, et quatre fois moins d'ostéoclastes à partir de monocytes murins (Baud'Huin *et al.* 2010). Par ailleurs, excepté un déficit en cellules de Langerhans et en cellules microgliales, les souris *IL-34^{LacZ/LacZ}* n'ont pas d'altérations au niveau des autres cellules myéloïdes (cellules dendritiques, monocytes sanguins, macrophages tissulaires) même si une légère diminution des cellules CD11b⁺ a pu être observée dans les poumons, suggérant que ces types cellulaires sont plutôt dépendants du M-CSF et du FLT3L. La prolifération, la survie et la différenciation de ces cellules sont certainement soutenues par l'importante sécrétion de M-CSF dans ces tissus, qui compensent l'absence d'IL-34. Plus étonnant encore, une lignée murine de cellules dendritiques folliculaires qui sécrète à la fois du M-CSF et de l'IL-34 induit, et uniquement sous l'influence de l'IL-34, la différenciation de cellules monocytaires Lin⁻c-kit⁺ murine de la rate en un sous-type cellulaire particulier de cellules mononucléées phagocytaires lorsqu'elles sont cultivées en co-culture (Yamane *et al.* 2014).

4.5.2. Rôle dans l'homéostasie tissulaire

L'étude des phénotypes des souris transgéniques a permis de mettre en évidence des fonctions non redondantes pour le M-CSF et l'IL34 dans l'homéostasie des macrophages. Ainsi, l'IL-34 semble être la cytokine majeure dans le développement des cellules de Langerhans au cours de l'embryogenèse et pour leur homéostasie dans le tissu adulte. De la même façon, les cellules microgliales nécessitent la présence d'IL-34 pour leur maintien dans le cerveau adulte (Greter *et al.* 2012). L'IL-34 dirige donc un programme de développement particulier pour ces cellules myéloïdes, peut-être en favorisant l'expansion et/ou la différenciation des cellules progénitrices des cellules de Langerhans et de la microglie une fois qu'elles atteignent respectivement l'épiderme et le système nerveux central, et ce au cours du développement embryonnaire. Chez les souris *IL-34^{LacZ/LacZ}* l'absence de microglie au niveau du système nerveux central ne semble pas induire de troubles neurologiques, bien que tous les troubles comportementaux n'aient pas été étudiés (Wang *et al.* 2012). De plus, l'IL-34 est produite par les cellules fibroblastiques réticulées qui constituent le stroma des ganglions lymphatiques, suggérant un rôle de la cytokine dans la régulation de la fonction des cellules myéloïdes (Malhotra *et al.* 2012). Chez la truite arc-en-ciel, l'expression plus large d'IL-34 dans les tissus suggère un rôle prépondérant de la cytokine dans l'homéostasie des macrophages (Wang *et al.* 2013).

Par ailleurs, l'expression transgénique de l'IL-34 murine sous le contrôle du promoteur et du premier intron du M-CSF, décrits pour contrôler l'expression et le développement de manière tissu-spécifique, améliore le phénotype anormal de la souris *CSF-1^{op/op}* en restaurant la présence d'ostéoclastes et de macrophages tissulaires. L'IL-34 exprimée sous le promoteur du M-CSF possède *in vitro* les mêmes activités biologiques que les formes sécrétées du M-CSF (Wei *et al.* 2010). La présence d'IL-34 est donc capable de compenser l'absence de M-CSF lorsque la cytokine est exprimée suivant le profil d'expression spatio-temporel du M-CSF. Néanmoins, dans certains compartiments, notamment au niveau des tissus minéralisés, le M-CSF semble être le principal régulateur du développement des cellules myéloïdes, puisque la souris *CSF-1^{op/op}* est ostéopérotique bien qu'elle produise des quantités normales d'IL-34. Ce phénotype ostéopérotique n'est cependant pas permanent et s'améliore avec l'âge, suggérant que l'IL-34 permet la génération de cellules ostéoclastiques à partir des précurseurs présents dans la rate. En effet, l'IL-34 permet le maintien du pool de réserve de ces précurseurs ostéoclastiques dans la rate, qui se différencient et migrent dans la moelle osseuse pour résorber l'os sous l'influence de l'IL-34 produite par les cellules endothéliales vasculaires de la rate et de divers stimuli (Nakamichi *et al.* 2012). L'expression de l'IL-34 dans l'os augmente avec l'âge de la souris (Nakamichi *et al.* 2012), et bien que faible, certains auteurs reportent une induction de l'expression de l'ARNm de l'IL-34 au cours de la différenciation ostéoblastique, avec un profil similaire à l'expression du M-CSF et un pic à deux semaines avec 8 fois plus d'expression (Chen *et al.* 2011.)

4.5.3. Production de molécules de l'inflammation et l'immunité

Des études transcriptionnelles sur des monocytes stimulés au M-CSF ou à l'IL-34 montrent que l'expression de 68% des gènes induits est similaire, avec de nombreux gènes codant pour des cytokines ou chimiokines. Trente deux pour cent des gènes étudiés varient entre les deux cytokines, en utilisant un seuil de différence d'expression d'au moins trois fois. Parmi les variations les plus importantes, l'expression du CCR2 qui est plus augmentée par l'IL-34 que par le M-CSF (Barve *et al.* 2013). L'ajout de M-CSF ou d'IL-34 à des échantillons de sang prélevés sur différents donneurs induit via le M-CSFR la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, et en moindre mesure l'IFN γ , l'IL-1 β , le TNF- α et de chimiokines comme l'IL-8 (ou CXCL8), MIP-1 β et de façon très intéressante du MCP-1 (ou CCL2) (Eda *et al.* 2010), ligand du CCR2 dont l'expression est augmentée par l'IL-34 à la surface des monocytes (Barve *et al.* 2013). Des études précédentes avaient montré que des macrophages murins stimulés avec du M-CSF ou de l'IL-34 induisaient globalement l'expression des mêmes cytokines et chimiokines, mais produisaient plus de MCP-1 avec le M-CSF, et plus d'eotaxine-2 en présence d'IL-34 (Chihara *et al.* 2010). La production de MCP-1 est induite via les protéines STATs donc l'activation est également plus faible après stimulation par de l'IL-34. Le MCP-1 crée un gradient chimiotactique pour recruter les cellules immunitaires sur un site envahi par des pathogènes ou une lésion tissulaire. L'IL-34 possède donc comme le M-CSF, un rôle majeur dans la régulation de l'immunité et des processus inflammatoires. Ainsi, les souris *IL-34^{LacZ/LacZ}* répondent moins bien aux antigènes de la peau (diminution de l'hypersensibilité au moment du contact) et sont plus sensibles aux infections virales du système nerveux central. Par ailleurs, après une agression de l'épiderme (U.V., etc.) ou une altération de la barrière hématoencéphalique (virus, etc.), des cellules de Langerhans ou des cellules microgliales réapparaissent au sein de ces tissus, probablement du fait du recrutement de cellules souches hématopoïétiques sur le site et de la présence d'une concentration importante de M-CSF sur le site inflammatoire (Wang *et al.* 2012). L'IL-34 ne serait donc pas nécessaire pour le recrutement des précurseurs hématopoïétiques lors de l'inflammation et pour leur différenciation en cellules de Langerhans, mais serait au contraire essentielle pour leur survie une fois que l'inflammation est résolue (Greter *et al.* 2012). De plus, les cellules de Langerhans sont en contact étroit avec les kératinocytes via les E-cadhérines, et ce contact pourrait jouer sur la production d'IL-34 par les kératinocytes, et réguler la fonction des cellules de Langerhans. Celles-ci pourraient donc se détacher en cas d'infection, d'allergie, de blessure, etc. pour migrer dans les ganglions lymphatiques et induire la réponse immunitaire (Wang *et al.* 2012).

Comme expliqué précédemment, différentes populations de macrophages sont présentes dans l'organisme, et le phénotype adopté ainsi que leur fonction dépendent de l'action conjointe de plusieurs classes de cytokines. Ainsi, la stimulation de macrophages au M-CSF ou à l'IL-34 induit leur polarisation en macrophages de type M2. En effet, des monocytes stimulés par de l'IL-34 expriment fortement les marqueurs CD14 et CD163. Lorsqu'ils sont activés par des mo-

lécules pro-inflammatoires comme le LPS, l'IL-34 permet la différenciation de macrophages ayant un profil immunosuppresseur. Ces macrophages induisent une baisse de prolifération des lymphocytes T, et expriment fortement l'IL-10 et peu d'IL-12, de CD80 et CD86, comme cela avait été décrit en présence de M-CSF. Les phénotypes et les fonctions des macrophages différenciés en présence des deux cytokines sont donc indiscernables, avec une production de chimiokines et expression de récepteurs aux chimiokines similaires. Ces profils immunosuppresseurs sont proches de ceux adoptés classiquement par les macrophages associés aux tumeurs, avec la production de VEGF, de TGF- β et de MMP-9. De plus, l'addition d'IFN γ et de GM-CSF en plus de l'IL-34 empêche la génération de macrophages immunosuppresseurs, et l'IFN γ est également capable d'inverser le phénotype de macrophage immunosuppresseur établi par l'IL-34 en macrophage immunostimulateur (Foucher *et al.* 2013). De plus, ces macrophages différenciés par le M-CSF ou l'IL-34 possèdent les mêmes capacités de phagocytose de *E.Coli.*, et une expression similaire des molécules de surface CD16, CD11b, CD18, CD29, CD49d et CD168. Néanmoins les macrophages IL-34 possèdent moins de molécules d'adhésion CD54 à leur surface, moins de récepteur du CMH-II HLA-DR, et le virus du HIV-1 se réplique mieux dans ces macrophages, suggérant un rôle immunitaire légèrement différent pour le M-CSF et l'IL-34 (Chihara *et al.* 2010).

4.5.4. Implication pathologique de l'IL-34

Du fait de son importance dans la régulation des processus immunitaires et inflammatoires, l'IL-34 est impliquée dans plusieurs pathologies (**Tableau 3**), notamment dans l'inflammation et l'ostéoclastogenèse des maladies dégénératives osseuses, comme la polyarthrite rhumatoïde. Son expression est ainsi corrélée positivement avec la sévérité de la synovite, le taux d'anticorps anti-protéines citrullinées et de facteur rhumatoïde dans le plasma (Chemel *et al.* 2012; Moon *et al.* 2013; Tian *et al.* 2013; Hwang *et al.* 2012), et les taux d'IL-34 sont plus élevés dans les sérums et les liquides synoviaux de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde comparés aux patients atteints d'arthrose (Chang *et al.* 2014). L'IL-34 est également exprimée par les fibroblastes gingivaux, et pourrait participer à la périodontite (Boström et Lundberg 2013). Dans les deux cas, l'expression de l'IL-34 est augmentée par des cytokines pro-inflammatoires et induit l'ostéoclastogenèse pathologique. L'IL-34 est exprimée dans les glandes salivaires au cours du syndrome de Gougerot-Sjögren, et participe au recrutement d'une population de monocytes qui active la réponse pathologique T_H17. En effet, l'expression de l'IL-34 corrèle avec celle d'IL-17 et d'IL-23 (Ciccica *et al.* 2013). L'implication du M-CSF a déjà été démontrée depuis plusieurs années dans les maladies métaboliques, et une étude récente décrit une hausse de la concentration d'IL-34 dans les sérums des patients obèses, et une corrélation entre l'expression d'IL-34 et les paramètres métaboliques caractérisant la résistance à l'insuline. De plus, l'expression d'IL-34 est plus élevée dans le tissu adipeux viscéral comparé au tissu adipeux abdominal, et son expression augmente *in vitro* au cours de la différenciation adipocytaire (Chang *et al.* 2014). L'IL-34 dosée

dans les sérums de patients atteints d'athérosclérose est significativement plus élevée que dans le groupe contrôle, et corrèle positivement avec les taux de protéine C réactive ultrasensible (Li *et al.* 2012). Outre un rôle pathologique, l'IL-34 exercerait un rôle protecteur dans les maladies du système nerveux central. En effet, l'injection d'IL-34 dans un modèle murin de maladie d'Alzheimer améliore les capacités d'apprentissage des souris. L'IL-34 exerce ses effets neuroprotecteurs *in vitro* et *in vivo* en induisant la production de TGF- β , qui régule la prolifération des cellules microgliales, et en permettant l'expression d'enzymes comme celle de dégradation à l'insuline qui sert à la clairance de la forme oligomérique soluble de la protéine β -amyloïde, responsable du dysfonctionnement synaptique et des lésions neuronales dans la maladie d'Alzheimer (Ma *et al.* 2012; Mizuno *et al.* 2011).

4.6. Régulation de la synthèse et de l'expression de l'IL-34

L'expression du M-CSF et de l'IL-34 est induite par des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β (de 17 fois pour l'IL-34, de 7 fois pour le M-CSF) et le TNF- α (de 74 fois pour l'IL-34, et de 11 fois pour le M-CSF), mais via des voies de signalisation différentes. Cependant, certaines cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 ou l'IL-17 n'induisent aucun changement dans l'expression du M-CSF ou de l'IL-34. L'ajout de TNF- α et l'IL-1 β sur des cultures d'ostéoblastes active les voies MAPKs ERK1/2, JNK, ou p38 et le facteur nucléaire NF- κ B. La synthèse de l'ARNm de l'IL-34 est induite en amont par l'activation de la voie des MAPKs (JNK et ERK1/2, mais non p38) puis par l'activation de NF- κ B (Yao *et al.* 2000; Eda *et al.* 2010). L'IL-34 semble plus sensible au TNF- α qu'à l'IL-1 β avec une expression augmentée jusqu'à 30 fois contre 13 (Chemel *et al.* 2012), et Hwang rapporte une induction différente de M-CSF et d'IL-34 par le TNF- α dans des fibroblastes synoviaux de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (de 12 fois pour l'IL-34 alors que celle du M-CSF n'est quasiment pas modifiée). Cette induction de l'expression d'IL-34 par le TNF- α passerait bien par l'activation de la voie MAPK JNK, mais serait indépendante de ERK1/2 ou de p38 (Hwang *et al.* 2012). De façon intéressante, cette régulation semble similaire aux résultats de Hwang chez des macrophages de la truite arc-en-ciel, puisque les cytokines pro-inflammatoires induisent l'expression d'IL-34 mais non du M-CSF (Wang *et al.* 2013). La régulation de l'expression du M-CSF et de l'IL-34 pourrait donc être différente suivant le tissu, et le contexte (inflammation, etc.). Par ailleurs, la vitamine D3 induit une hausse de l'expression de l'IL-34 dans la rate et dans l'os via son récepteur VDR, qui se lie dans les 2kb en amont du site de transcription de l'IL-34. L'ablation de la rate supprime les effets de la vitamine D3 sur l'expression de l'IL-34 (Nakamichi *et al.* 2012).

5. Conclusion : importance de l'IL-34 au sein de l'axe M-CSF/M-CSFR ?

La présence de M-CSF ou d'IL-34 permet de compenser l'absence de sa cytokine jumelle, pour maintenir l'homéostasie tissulaire et éviter d'importants dommages fonctionnels. Cependant, chaque cytokine exerce des fonctions propres, et les rôles du M-CSF et de l'IL-34 sont plus complémentaires que compensatoires, comme le montre le profil d'expression spatio-temporel différent dans le cerveau (Nandi *et al.* 2012). Chaque ligand semble donc avoir un rôle dominant dans le développement de certains tissus. En effet, malgré la présence d'IL-34 chez les souris *CSF-1^{op/op}*, et le fait que l'IL-34 se substitue au M-CSF dans l'ostéoclastogenèse induite avec RANKL (Baud'Huin *et al.* 2010), les souris sont ostéopérotiques à la naissance. Le déficit en ostéoclastes est lié à l'absence de précurseurs ostéoclastiques dans la moelle osseuse, elle-même due à l'absence de M-CSF. L'amélioration des anomalies phénotypiques des souris avec l'âge serait au contraire due à l'IL-34, qui mobilise des précurseurs ostéoclastiques de la rate vers la moelle osseuse. En effet, l'ablation de la rate chez les souris *CSF-1^{op/op}* ne permet pas la restauration des ostéoclastes et l'amélioration de l'ostéopérose avec l'âge (Nakamichi *et al.* 2012). Bien que le M-CSF et l'IL-34 semblent induire des différences de signalisation intracellulaire et de production de cytokines et chimiokines via le M-CSFR, aucun processus de développement physiologique spécifiquement induit par l'IL-34 via le M-CSFR n'a pu encore être mis en évidence directement. En effet, le développement IL-34 dépendant de la microglie dans certaines zones du cerveau chez l'adulte et chez l'embryon est probablement dépendant du RPTPβ/ζ (Nandi *et al.* 2013). De la même façon, les cellules de Langerhans, dont le développement semble être IL-34 spécifique, expriment peut-être le RPTPβ/ζ car l'expression de ce récepteur n'a pas été vérifiée sur ces cellules. Néanmoins, l'étude de Yamane suggère l'induction par l'IL-34 via le M-CSFR de la différenciation d'un sous-type particulier de monocytes, et ce de façon indépendante du M-CSF (Yamane *et al.* 2014). De la même façon que pour le développement des cellules de Langerhans dans l'épiderme, l'IL-34 pourrait permettre le recrutement des précurseurs myéloïdes capables de s'auto-renouveler, et la colonisation des tissus lymphoïdes comme la rate au moment du développement embryonnaire. L'expression de l'IL-34 étant également détectée chez l'adulte, la cytokine pourrait réguler le potentiel d'auto-renouvellement des progéniteurs des cellules dendritiques ou de la microglie plutôt que d'avoir un rôle spécifique dans la différenciation cellulaire.

III. Tissu osseux et pathologies associées : cas particulier de l'ostéosarcome

1. Le tissu osseux : un tissu dynamique en équilibre

1.1. Description

1.1.1. Fonctions

Le tissu osseux est un tissu conjonctif minéralisé d'origine mésenchymateuse. Il est richement vascularisé et innervé, et composé à 95% d'une matrice extracellulaire qui minéralise, et à 5 % de cellules spécialisées qui sécrètent ou résorbent cette matrice. Ce tissu spécialisé assure à la fois des fonctions mécaniques conférées par sa rigidité (soutien et protection des organes, attachement des muscles, locomotion *etc.*) mais également des fonctions métaboliques. En effet, la moelle osseuse est la source principale des cellules souches hématopoïétiques et mésenchymateuses. L'os sert également d'importante réserve aux ions minéraux de l'organisme (phosphate, calcium, sodium, *etc.*), participant ainsi activement à l'homéostasie phosphocalcique (D Heymann, S Lepreux. 2008).

1.1.2. Organisation macroscopique

Trois types d'os constituent notre squelette : les os plats (sternum, os pariétaux), les os longs (fémur, tibia, humérus) et les os courts (vertèbres, phalanges). Les os longs seront pris ici comme exemple car ce sont les principales pièces affectées par le développement des ostéosarcomes.

Au niveau des os longs, les extrémités arrondies et élargies recouvertes de cartilage articulaire sont les épiphyses. Ces épiphyses sont connectées à la partie cylindrique centrale de l'os, la diaphyse, par des régions coniques, les métaphyses. Au cours de la croissance, une couche de cartilage est présente entre les épiphyses et métaphyses et appelée plaque de croissance.

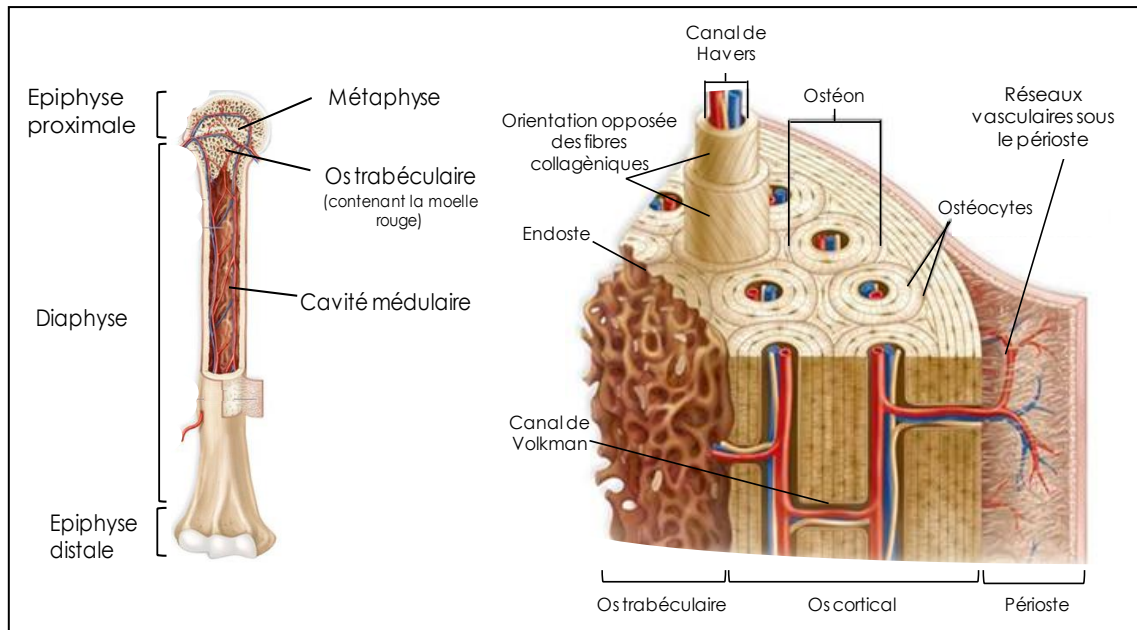


Figure 23: Structure interne et externe d'un os long.

Adapté de <http://humanbio156.blogspot.com/2008/07/compendium-review-unit-3-major-topic.html>.

Les pièces osseuses sont composées d'un os compact, l'os cortical, et d'un os spongieux, l'os trabéculaire. Elles sont recouvertes sur leurs faces externes d'une enveloppe très vascularisée, le périoste, qui est absent au niveau des zones d'insertion des tendons et des ligaments, mais aussi au niveau du cartilage articulaire (**Figure 23**). Il est très vascularisé, et contient une couche externe conjonctive fibreuse, et une couche interne de cellules souches et pré-ostéoblastiques. L'os cortical représente 80 à 85% de l'ensemble de notre tissu osseux, et est constitué par la juxtaposition d'ostéons cylindriques qui forment une couche compacte très dense. En effet, le tissu cortical est calcifié à 85% et présente seulement 5 à 30% de porosité. Chaque ostéon est constitué d'une trentaine de fibres de collagène disposées autour d'un canal central, le canal de Havers, qui permet le passage des vaisseaux, des fibres nerveuses et des prolongements cytoplasmiques (**Figure 23**). Entre la cavité médullaire et l'os cortical se trouve l'endoste, fine couche conjonctive au sein de laquelle se mêlent cellules ostéoprogénitrices et cellules bordantes. Enfin, l'os trabéculaire est un os spongieux peu calcifié (20% de calcification) et très poreux (30 à 90% de porosité) (**Figure 24**). Il est principalement localisé dans les régions métaphysaires des os longs, et forme un réseau de travées osseuses entre lesquelles s'insère la moelle osseuse qui représente 75% du volume de l'os trabéculaire (Toppets *et al.* 2004).

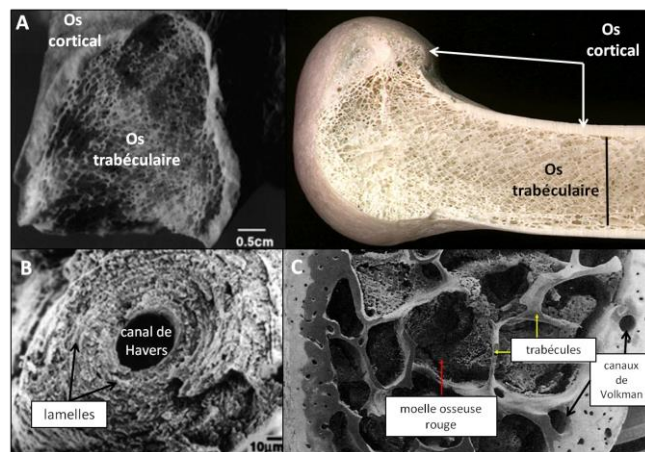


Figure 24 : Os cortical et os trabéculaire.

A) Vue transversale et longitudinale d'un os plat, ici un fémur humain dont la moelle osseuse a été retirée. Image originale réalisée par Eric Walravens (<http://www.afblum.be/bioafb/struos/struos.htm>) et (Weiner, Traub, et Wagner 1999). B) Les motifs cylindriques des lamelles de l'ostéon entourant le canal de Havers. D'après (Weiner, Traub, et Wagner 1999). C) Jonction entre l'os cortical et l'os trabéculaire. La faible porosité de l'os cortical permet de faire passer le réseau vasculaire dans les canaux de Volkman (d'après le cours en ligne du Dr. Serge Nataf, <http://histoblog.viabloga.com/texts/le-tissu-osseux—2009>).

1.1.3. Organisation microscopique

1.1.3.i. Composante cellulaire

Les ostéoblastes sont des cellules cubiques de 20 µm environ, situées au niveau des travées de l'os trabéculaire à l'interface entre moelle osseuse et tissu minéralisé. Ces cellules spécialisées dans la formation osseuse sont issues de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses provenant du stroma médullaire, de l'endoste ou du périoste, sous l'action de facteurs de transcription spécifiques comme RUNX2, ostérix ou la β-caténine. En effet, les cellules souches mésenchymateuses peuvent aussi se différencier en adipocytes ou chondrocytes (**Figure 25**) (Marie 2008).

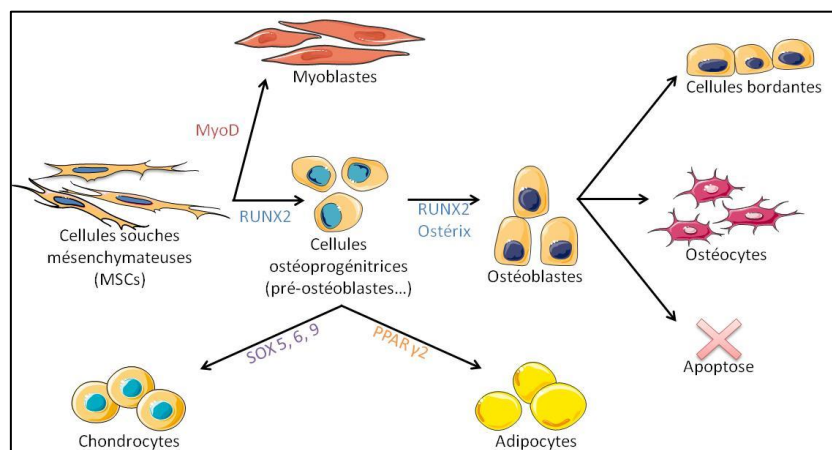


Figure 25: La différenciation des cellules souches mésenchymateuses et la différenciation ostéoblastique.

Les cellules souches mésenchymateuses donnent naissance aux chondrocytes, adipocytes, myoblastes et ostéoblastes sous l'influence de différents facteurs de transcription. Suite à divers facteurs et stimuli, les ostéoblastes donnent les cellules bordantes de l'os, les ostéocytes ou meurent par apoptose. D'après Servier Medical Art (http://www.servier.fr/smart/home_smart.asp). D'après (Marie 2008).

Après plusieurs étapes de prolifération et de différenciation, les ostéoblastes différenciés forment une monocouche de cellules mononucléées cubiques le long de la surface osseuse. Leur réticulum endoplasmique granuleux, l'appareil de Golgi et les mitochondries sont très développés du fait d'une importante synthèse protéique. Le cytoplasme renferme d'abondantes vésicules de calcium contenant de fortes concentrations de phosphatases alcalines nécessaires à la minéralisation de la matrice collagénique, produite une quinzaine de jours auparavant par ces mêmes ostéoblastes (**Figure 26**). Après la synthèse de la matrice ostéoïde, 65% des ostéoblastes meurent par apoptose, ou deviennent quiescents pour former les cellules bordantes ou continuent leur différenciation pour donner des ostéocytes. Les cellules bordantes forment une monocouche plus aplatie contrairement aux ostéoblastes activés, car leur cytoplasme devient très pauvre en organites suite à la réduction de leur activité métabolique. Chez l'adulte, la majorité des surfaces osseuses est recouverte de cellules bordantes, les ostéoblastes activés ne couvrant que 15% des surfaces trabéculaires (Harada et Rodan 2003; Marie 2008).

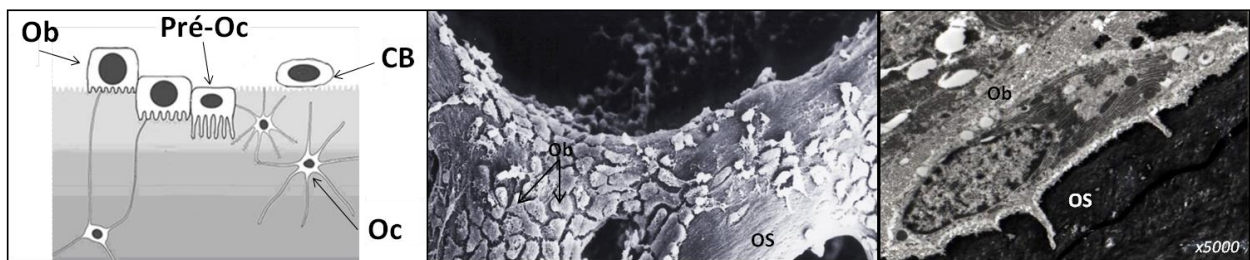


Figure 26 : Morphologie des cellules ostéoblastiques.

À gauche, schéma localisant les ostéoblastes (Ob), les pré-ostéocytes (Pré-Oc), les ostéocytes (Oc) et cellules bordantes (CB). Les trois couches représentent la matrice ostéoïde non-minéralisée, le front de minéralisation et la matrice calcifiée (Franz-Odenaal, Hall, et Witten 2006). Au milieu, observation au microscope électronique à balayage d'ostéoblastes tapissant les travées de l'os trabéculaire (d'après le site internet : www.grio.org/iconographie-os.php). À droite observation en microscopie électronique à transmission (Rousselle et Heymann 2002), d'un ostéoblaste de souris progressivement emmuré dans sa matrice minéralisée.

Les ostéocytes sont issus d'une dernière étape de différenciation des ostéoblastes matures qui se retrouvent emmurés dans la matrice osseuse (**Figure 27**). Ils constituent 90% des cellules présentes à l'intérieur de l'os mature. Cette différenciation terminale se fait sous l'action des métalloprotéases matricielles (MMPs), notamment la MMP-2, et de DMP-1 (Noble 2008; Rochefort, Pallu, et Benhamou 2010), tandis que l'expression du collagène de type I et des marqueurs ostéoblastiques (sialoprotéine osseuse, ostéocalcine et phosphatase alcaline) diminuent (Franz-Odenaal, Hall, et Witten 2006). Au contraire, l'expression de l'ostéopontine est maintenue, et des marqueurs ostéocytaires comme la sclérostine augmentent. Ces ostéocytes sont situés dans leur logette, les ostéoplastes, qui sont des lacunes osseuses. Ils présentent très peu d'organites, mais possèdent une forme étoilée avec de très longs prolongements cytoplasmiques leur permettant de communiquer entre eux et avec les cellules bordantes, mais également de capter les substances nutritives (Civitelli 2008).

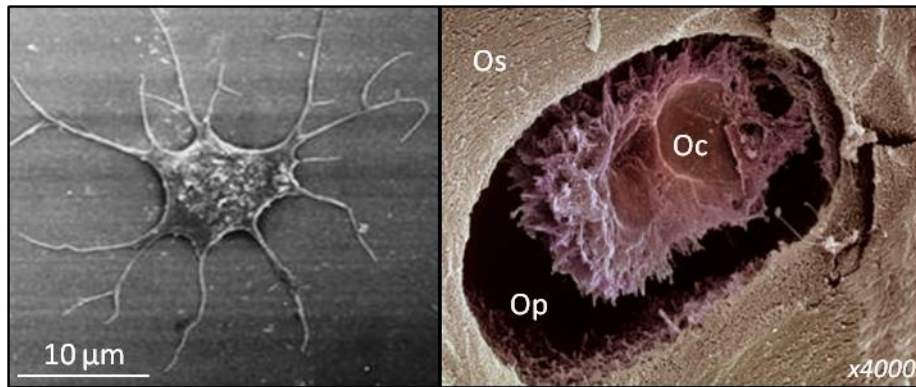


Figure 27 : Observation d'un ostéocyte en microscopie électronique à balayage.

À gauche les prolongements cytoplasmiques de l'ostéocyte au sein de la matrice osseuse, d'après (Tanaka-Kamioka *et al.* 1998) et à droite colorisé en rose l'ostéocyte (Oc) dans son ostéoplaste (Op), observable après fracturation d'un fragment osseux.

D'après <http://www.sciencephoto.com/media/301714/view>.

Les ostéoclastes sont des cellules géantes (jusqu'à 100 µm de diamètre) possédant 4 à 20 noyaux dont le rôle est de résorber la matrice minéralisée. Elles sont issues de la différenciation de cellules progénitrices myéloïdes (CFU-M), suivant un processus physiologique appelé ostéoclastogénèse (**Figure 28**).

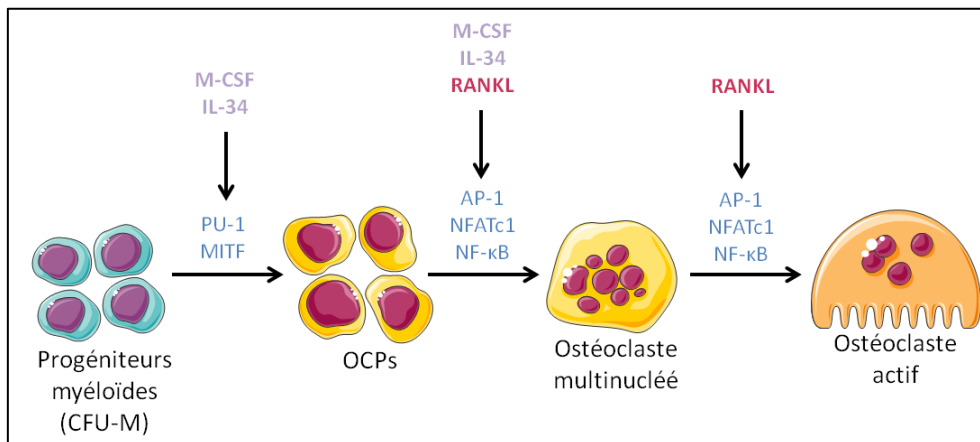


Figure 28: La différenciation ostéoclastique.

D'après Servier Medical Art (http://www.servier.fr/smart/home_smart.asp).

Le M-CSF et l'IL-34 permettent la survie et la prolifération de ces cellules progénitrices, et leur différenciation en précurseurs ostéoclastiques. Les précurseurs ostéoclastiques sont des cellules circulantes engagées dans la lignée ostéoclastique. Elles sont issues de la moelle osseuse mais peuvent être aussi produites par la rate pour rejoindre le sang périphérique (Nakamichi *et al.* 2012). Ces précurseurs n'expriment pas la phosphatase acide résistante au tartrate (TRAP) et les récepteurs à la calcitonine, marqueurs caractéristiques des ostéoclastes. Sous l'action de stimuli, ils migrent par chimiotactisme sur leur futur site de résorption, fusionnent et se différencient en cellules multinucléées ostéoclastiques sous l'action des cytokines jumelles et du facteur pro-résorptif RANKL (décrit auparavant sous le nom de TRANCE). Le RANKL est sécrété dans l'espace

extracellulaire par les ostéoblastes, les ostéocytes et d'autres types cellulaires, mais il est aussi exprimé à la membrane des ostéoblastes et autres cellules stromales. En effet, ces trois cytokines activent divers facteurs de transcription impliqués dans la différenciation ostéoclastique comme PU-1, MITF, AP-1, NFκB et NFATc1. RANKL active ensuite ces ostéoclastes multinucléés en ostéoclastes matures capables de résorber la matrice osseuse et possédant une bordure en brosse au niveau du pôle basal cellulaire (Boyle, Simonet, et Lacey 2003). Les ostéoclastes possèdent des mitochondries et des vésicules lysosomiales très nombreuses et très développées leur fournissant l'énergie nécessaire à la dégradation de la matrice osseuse (**Figure 29**). Ces cellules expriment des collagénases, en particulier la MMP-9 et de nombreuses enzymes lysosomiales comme la TRAP, la cathepsine K qui sont nécessaires à leur activité (Cappariello *et al.* 2014; Hayman 2008; Teitelbaum 2011).

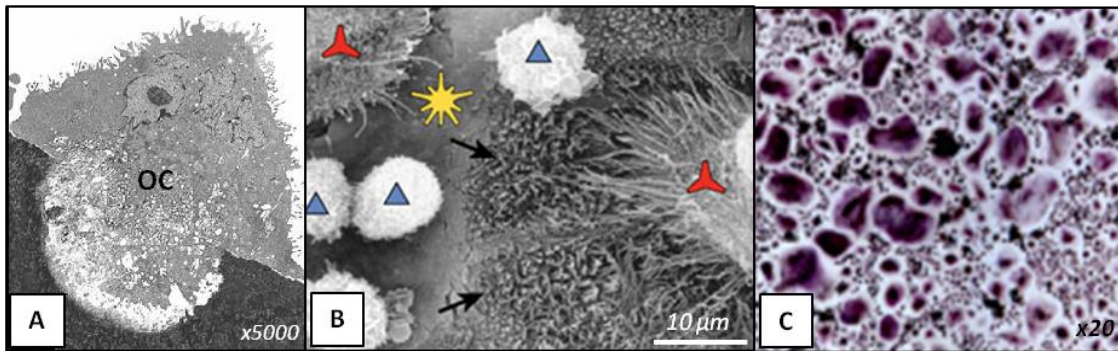


Figure 29 : Morphologie des cellules ostéoclastiques.

A) Observation d'un ostéoclaste (OC) humain issu d'une tumeur à cellules géantes (microscopie électronique à transmission). L'ostéoclaste est en train de résorber la pastille de dentine sur laquelle il s'est déposé, avec la formation d'une belle lacune de Howship contre la bordure en brosse de l'ostéoclaste (Rousselle et Heymann 2002). B) Observation en microscopie électronique à balayage d'ostéoclastes humains différenciés *in vitro* cultivés à la surface d'un support minéral. Les flèches noires indiquent la lacune de résorption, exposant les hélices de collagène de la matrice. L'étoile jaune indique la surface osseuse intacte, et les triangles bleus correspondent à des cellules mononucléées (Boyle, Simonet, et Lacey 2003) C) Différenciation d'ostéoclastes humains différenciés *in vitro* à partir de CD14⁺ en présence de 25ng/mL de M-CSF et 100ng/mL de RANKL pendant 11 jours, puis fixés et colorés par un marquage cytochimique mettant en évidence l'activité TRAP (source personnelle).

Dans un premier temps, l'ostéoclaste adhère à la surface osseuse, grâce à un remaniement de son cytosquelette où les filaments d'actine, de vinculine et de taline s'organisent en anneaux. Cette réorganisation permet de mettre en place la zone claire, riche en filaments d'actine et dépourvue d'organites, et dont la membrane plasmique est en contact avec l'os pour former un compartiment clos (Saltel *et al.* 2008). En effet, des molécules d'adhésion permettent le contact étroit de la zone claire avec la matrice osseuse, comme la liaison de la vitronectine de la matrice avec les intégrines $\alpha_v\beta_3$ cellulaires, et délimitent avec les anneaux d'actine un compartiment hermétique, la chambre de résorption (Georgess *et al.* 2014). Dans un second temps, l'ostéoclaste produit des protons grâce à son anhydrase carbonique de type II et les relargue par des pompes à protons membranaires de la bordure en brosse (Holliday *et al.* 2005).

L'acidification de l'environnement sous-ostéoclastique (pH=4,5) entraîne la dissolution des cristaux d'hydroxyapatite de la phase minérale et favorise l'activité d'enzymes lysosomiales libérées par exocytose comme la cathepsine K et les métalloprotéases, qui vont finalement dégrader la phase organique (**Figure 30**). Des trous apparaissent alors sur la surface osseuse, appelés lacunes de Howship (Rousselle et Heymann 2002). La libération d'ions piégés dans la matrice comme le calcium induit la dépolymérisation des filaments d'actine au niveau de la zone claire et un détachement des ostéoclastes qui se déplacent le long de la surface osseuse, aidés par l'activité de la MMP-9 qui résorbe les zones adjacentes. La TRAP jouerait également un rôle dans l'adhésion des ostéoclastes par la dégradation des phosphoprotéines, notamment l'ostéopontine de l'os sur laquelle adhère les ostéoclastes (Ek-Rylander et Andersson 2010). Les produits de dégradation sont en partie endocytés par l'ostéoclaste, métabolisés puis relargués au niveau de la membrane apicale dans la circulation générale. La TRAP est une enzyme ostéoclastique impliquée dans la dégradation des composants libérés lors de la résorption de la matrice, notamment les phosphoprotéines, au cours de leur transcytose de la partie basale à la partie apicale de l'ostéoclaste (Hayman 2008).

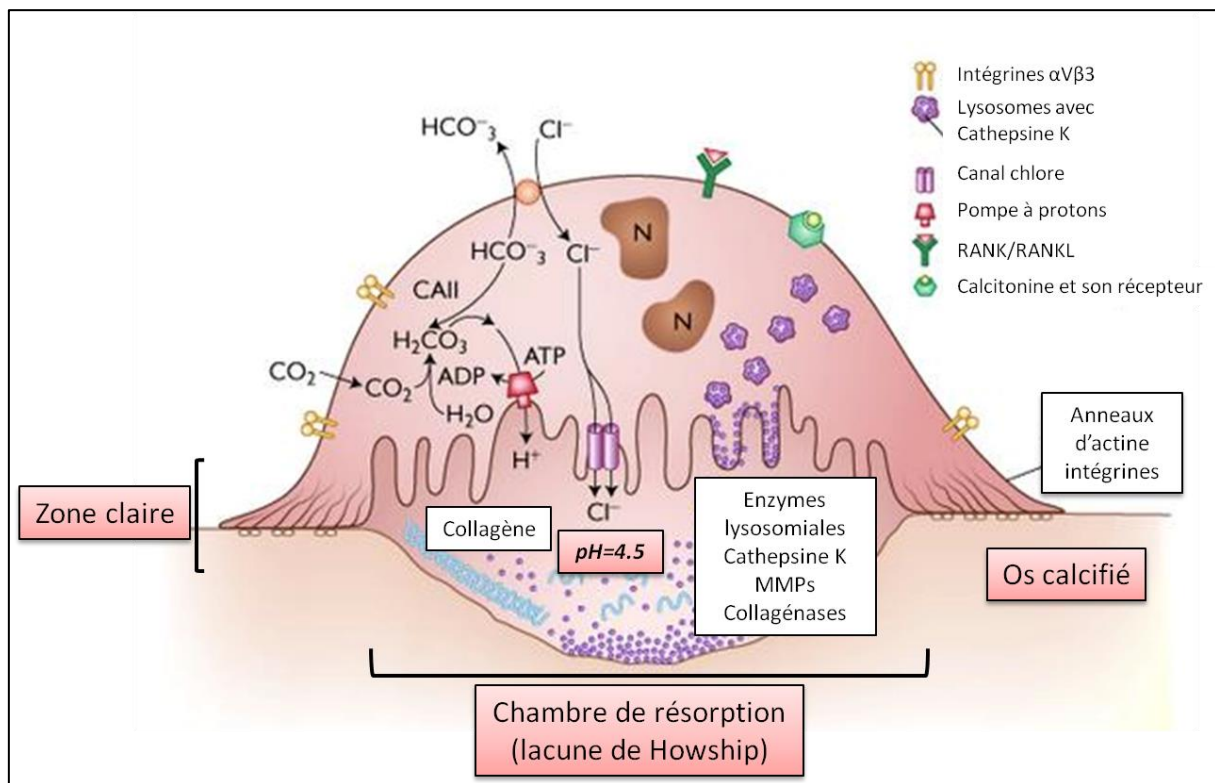


Figure 30 : La résorption de l'os par l'ostéoclaste activé.

La résorption osseuse est un processus en deux étapes. Tout d'abord, l'acidification de la chambre de résorption à pH=4,5 par la libération ATP-dépendante d'ions H⁺ permet la déminéralisation de la matrice par dissolution des cristaux d'hydroxyapatite. Le pH interne de l'ostéoclaste est maintenu par transport passif Cl⁻/HCO₃⁻, et l'électroneutralité est assurée par un canal chlore. Ensuite, la phase organique est dégradée par les différentes enzymes lysosomiales libérées par exocytose : MMPs, Cathepsine K, collagénases etc. D'après (Duong 2008).

La formation d'ostéoclastes par le M-CSF et le RANKL constitue la voie canonique, bien qu'il existe également des voies non canoniques où le M-CSF peut être substitué par d'autres facteurs comme le FLT3L, le PIFGF, l'HGF ou le VEGF, et le RANKL par les facteurs LIGHT, TNF- α et les IL-6, 8 et 11 (Knowles et Athanasou 2009). Par ailleurs, cinq autres cytokines (APRIL, BAFF, NGF, IGF-1 et IGF-2) peuvent induire l'ostéoclastogenèse indépendamment du RANKL, avec une efficacité moindre, mais une activité de résorption similaire (Hemingway *et al.* 2011).

1.1.3.ii. Composante acellulaire : la matrice osseuse

Environ 65% de la MEC est d'origine minérale, tandis que 25% est d'origine organique, avec une teneur en eau variant autour de 10%. La fraction minérale est majoritairement composée de phosphate de calcium sous forme de cristaux d'hydroxyapatite ($\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Ces cristaux s'accroissent lentement dans la trame collagénique de la matrice ostéoïde sécrétée par les ostéoblastes afin de minéraliser cette matrice. Les taux de calcium et d'hydroxyde de phosphate augmentent grâce à l'ostéocalcine et la phosphatase alcaline des ostéoblastes, favorisant le processus de minéralisation. Cette matrice minérale constitue également la réserve principale minérale de l'organisme, avec l'incorporation au sein de des cristaux d'hydroxyapatite de 99 % du calcium de l'organisme, 85% du phosphore et entre 40 à 60 % du sodium et du magnésium (Olszta *et al.* 2007).

Les fibres de collagène de type I associées à l'élastine et la fibronectine constituent 90% de la fraction organique, et forment la substance fibrillaire. La substance interfibrillaire du tissu osseux est composée de plus de 200 protéines, dont 75% sont produites par les cellules spécialisées de l'os (Heymann 2008). Ainsi, l'ostéocalcine (OC), marqueur de l'activité ostéoblastique qui favorise la minéralisation et attire les ostéoclastes au niveau de leurs foyers de résorption, est la plus abondante (10 à 20%) (Neve, Corrado, et Cantatore 2013). D'autres protéines sont aussi importantes comme la sialoprotéine osseuse (BSP) qui participe à la minéralisation initiale de l'os, à la différenciation ostéoclastique et à la résorption osseuse et participe avec l'ostéopontine (OPN) à l'adhérence des cellules osseuses à l'hydroxyapatite, la phosphatase alcaline, une enzyme qui hydrolyse les pyrophosphates inorganiques inhibant la calcification, mais aussi de nombreux protéoglycanes (décorine et biglycane majoritairement), des protéines phosphorylées et des phospholipides *etc.* La majorité de ces protéines possèdent des motifs de liaison aux intégrines, servant ainsi de site d'ancrage aux cellules spécialisées. De nombreux facteurs de croissance et cytokines sont également piégés au sein de la matrice par les chaînes de GAGs des protéoglycanes, comme les BMPs (2,4, 6 et 7) et le TGF- β , l'IGF-1, les FGFs, les interleukines, *etc.* (Camozzi *et al.* 2010; Young 2003).

1.2. Le remodelage physiologique de l'os

1.2.1. Formation de l'os

La majorité des os du squelette se développent à travers le processus d'ossification endochondrale selon lequel la matrice osseuse sécrétée par les ostéoblastes remplace le cartilage avasculaire formé par les chondrocytes. Au cours de la croissance des os longs, les chondrocytes de la plaque de croissance épiphysaire ou ceux situés au centre de la diaphyse prolifèrent et le réseau vasculaire se développe. Ensuite, les ostéoclastes et les ostéoblastes orchestrent la dégradation du cartilage hypertrophique formé et son remplacement par la matrice minéralisée. Bien que les os courts et les os longs soient formés à partir d'une ébauche de cartilage hyalin, les os plats sont formés préférentiellement suivant un processus d'ossification membranaire qui correspond à l'apposition directe d'une matrice ostéoïde progressivement minéralisée par les ostéoblastes (Sims et Vrahnas 2014).

1.2.2. Equilibre entre l'activité ostéoblastique et ostéoclastique

1.2.2.i. Un couplage entre apposition et résorption osseuse

Le remodelage osseux est un processus physiologique qui permet le renouvellement du tissu osseux grâce à la résorption de l'os ancien et à son remplacement par une matrice osseuse nouvellement synthétisée (Sims et Vrahnas 2014). En effet, malgré une apparente rigidité, l'os est en constant renouvellement, avec un remodelage continu de 5 % des surfaces intracorticales et de 20 % des surfaces trabéculaires chez un individu d'âge moyen sain durant 4 à 6 mois. 10% du tissu osseux adulte est ainsi complètement renouvelé chaque année. Avant d'atteindre l'âge adulte, un remodelage osseux intensif permet la croissance du squelette, notamment au niveau des os longs. Ce remodelage osseux nécessite un fin couplage entre activités ostéoblastique et ostéoclastique grâce aux contacts entre les cellules spécialisées ainsi qu'à l'intervention de nombreux facteurs (**Tableau 6**) (Robling, Castillo, et Turner 2006).

	FORMATION OSSEUSE	RÉSORPTION OSSEUSE
ACTIVATION	RUNX2, Ostérix, β -caténine, AP-1 (c-Jun/c-Fos), c/EBPs, Msx2/Dlx5, Alcaline phosphatase, Collagène de type I, Ostéopontine, Ostéonectine, Ostéocalcine, TGF- β , BMPs (BMP-2,6), FGFs, IGFs, PDGF, Wnt/Hedgehog (Wnt10b), EphB4, Sphingosine-1-phosphate, Cardiotrophine-1, OSM, LIF, Oestrogènes, Androgènes, Vitamine D, PTH/PTHrP, PGE2	PU-1, AP-1 (c-Jun/c-Fos), NF- κ B, NFATc1, TRAP, Cathepsin K, MMPs, M-CSF/IL-34, RANKL, Ostéocalcine, IL-6, OSM, LIF, IL-11, CNTF, Stimuli mécaniques, TNF- α , IL-1 β , Sclérostine, Sphingosine-1-phosphate, Cardiotrophine-1, PTH/PTHrP, vitamine D3, PGE2
INHIBITION	TNF- α , IL-1 α , CNTF, Stimuli mécaniques	OPG, Ephrine B2, Fas/FasL

Tableau 6 : Les facteurs permettant le couplage entre la formation et la résorption osseuse.

Réalisé d'après (Sims et Vrahnas 2014) et (Robling, Castillo, et Turner 2006).

Le remodelage osseux est également nécessaire au maintien de l'homéostasie phosphocalcique de l'organisme, à la réparation de lésions (fractures etc.) et permet l'adaptation aux contraintes mécaniques. Les ostéocytes servent ainsi de mécano-récepteurs et transmettent les signaux mécano-sensoriels aux cellules environnantes. Leurs interactions aux fibres de collagène de leur logette (l'ostéoplaste) via les intégrines leur permettent de percevoir les contraintes mécaniques appliquées sur l'os. Ces informations sont transmises aux cellules bordantes et ostéoblastes activés grâce aux jonctions communicantes présentes dans leurs extensions cytoplasmiques, qui adaptent leur activité en conséquence (Civitelli 2008). Les ostéocytes jouent également un rôle clé dans le remodelage osseux et l'équilibre entre ostéoblastes et ostéoclastes. En effet, les ostéocytes régulent par exemple négativement la différenciation et l'activité ostéoblastique, et donc la formation osseuse par la sécrétion de sclérostine, un antagoniste de la voie Wnt/ β -caténine (Bonewald et Johnson 2008). De plus, la sclérostine produite par les ostéocytes induit directement la dissolution de la matrice minérale en induisant l'expression de l'anhydrase carbonique de type II, de la cathepsine K et de la TRAP par les ostéoclastes (Kogawa *et al.* 2013). Les ostéocytes agissent également sur les ostéoclastes puisqu'ils sont une source majeure de RANKL dans l'os (Capulli, Paone, et Rucci 2014). En plus de favoriser la différenciation ostéoclastique, leur apoptose déclenche l'ancrage des ostéoclastes sur la surface osseuse pour induire la résorption (Gu *et al.* 2005).

1.2.2.ii. Les différentes étapes du remodelage osseux

Le remodelage se fait en cinq étapes (Robling, Castillo, et Turner 2006; Sims et Gooi 2008; Boissy, Malaval, et Jurdic 2000): l'activation, la résorption, la réversion, la formation et la quiescence (**Figure 31**).

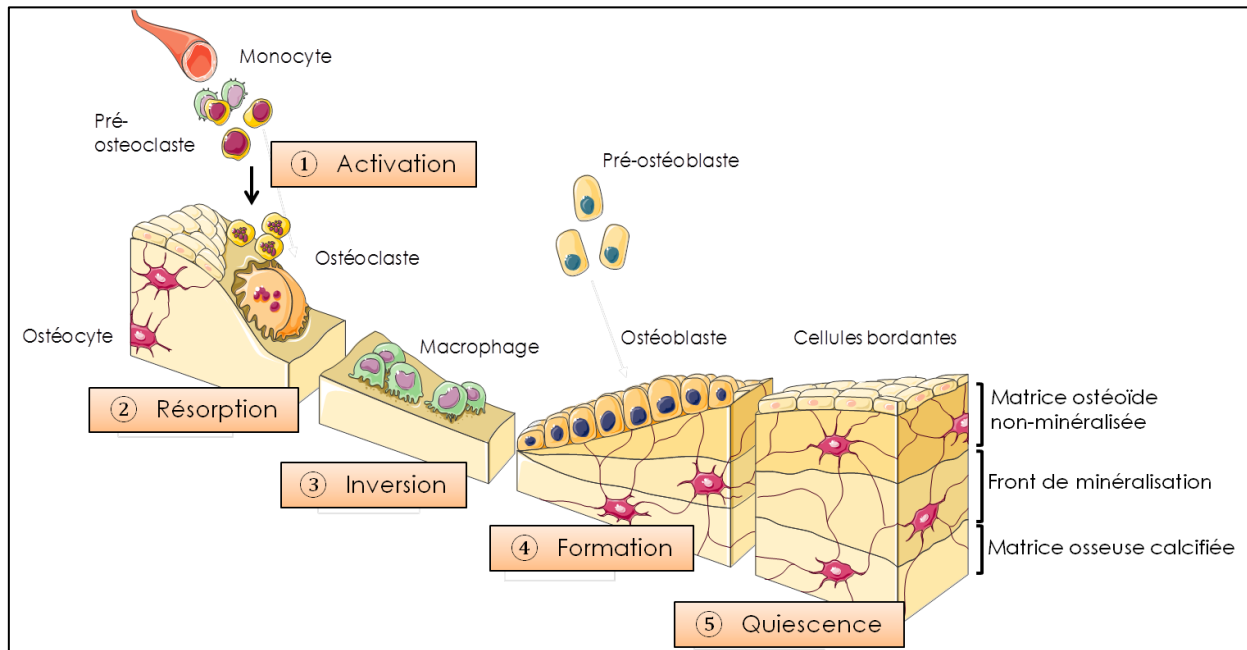


Figure 31 : Les différentes étapes du remodelage osseux.

D'après Servier Medical Art (http://www.servier.fr/smart/home_smart.asp).

Le remodelage osseux débute par un signal mécanique, hormonal, ou nerveux qui active le recrutement d'OCPs, et leur adhésion en un point de la surface osseuse qui était recouvert de cellules bordantes. En effet, les ostéoblastes alors quiescents sont de nouveau activés sous l'action de facteurs ostéorésorbants (vitamine D3, PTH, PGE2, etc.) et se rétractent pour laisser la place aux OCPs, qui vont alors se différencier en ostéoclastes sous l'action des cytokines sécrétées par les ostéoblastes proches (RANKL, M-CSF, IL-34, IL-6 etc.). C'est **la phase d'activation**.

Au cours de **la phase de résorption** (30 jours environ), les ostéoclastes sont activés et vont se polariser pour former la bordure en brosse. Ils adhèrent alors plus fortement à la surface osseuse pour former la chambre de résorption, et commencent à dégrader l'os.

L'augmentation des taux de calcium suite à la libération des ions de la matrice entraîne une désorganisation des podosomes des ostéoclastes, et leur détachement de l'os. Ils meurent alors par apoptose, et sont remplacés par des cellules de type macrophagique qui vont éliminer les débris matriciels restant au fond de la lacune de résorption (Xiaojun Wu *et al.* 2003). Des facteurs pro-ostéoblastiques libérés de la matrice (BMPs, IGFs, FGFs, TGF- β , etc.) vont activer la for-

mation ostéoblastique au niveau de la lacune. D'autres molécules directement sécrétées par les ostéoclastes (BMP-6, sphingosine-1-phosphate etc.) participent au recrutement des pré-ostéoblastes et activent la formation osseuse (Sims et Gooi 2008). C'est la **phase d'inversion**, qui fait la transition entre la phase de résorption et d'apposition osseuse.

Au cours de la **phase de formation** (4 à 5 mois), des cellules ostéoprogénitrices vont venir tapisser la lacune, proliférer et se différencier en ostéoblastes qui vont sécréter une nouvelle matrice collagénique. Cette matrice commencera à être minéralisée dans les quinze jours suivants par l'apposition de cristaux d'hydroxyapatite.

Une fois la formation osseuse terminée, les ostéoblastes meurent par apoptose, deviennent quiescents pour former la couche de cellules bordantes ou sont piégés au sein de la matrice nouvellement formée où ils se transforment en ostéocytes. C'est la **phase de quiescence**.

1.3. Dérèglement de la balance apposition/résorption osseuse et pathologies

1.3.1. Importance des cytokines jumelles M-CSF/IL-34 et de la triade « RANK/RANKL/OPG »

Le couple RANK/RANKL constitue avec le M-CSF la voie canonique de la différenciation ostéoclastique. En effet, les souris possédant une inactivation du gène *RANKL* présentent une ostéopétrose avec un déficit en ostéoclastes, mais possèdent des précurseurs ostéoclastiques fonctionnels grâce au M-CSF présent. Par opposition, la surexpression de *RANKL* induit une ostéoporose. De même, les souris possédant une inactivation du gène *RANK* présentent une absence d'ostéoclastes matures. Afin de réguler finement la différenciation ostéoclastique et de protéger l'os contre une résorption excessive, il existe un autre facteur, l'OPG, qui agit comme un récepteur leurre pour le RANKL (Silva et Branco 2011; Theoleyre *et al.* 2004). En effet, l'OPG est une glycoprotéine soluble qui inhibe la liaison de forte affinité RANK/RANKL, en liant le RANKL membranaire ou sécrété par les ostéoblastes, les ostéocytes mais aussi par le tissu lymphoïde, les cellules endothéliales et fibroblastiques etc. De plus, l'OPG agit également sur les ostéoclastes matures en diminuant leur activité et en entraînant leur apoptose. La balance résorption/formation dépend donc du niveau d'expression de RANKL et de l'OPG (Baud'huin *et al.* 2013).

1.3.2. Dérèglement de la balance apposition/résorption osseuse et pathologies

La création d'un déséquilibre entre la résorption et l'apposition osseuse engendre des pathologies ostéocondensantes si la balance penche en faveur de l'activité ostéoblastique ou des pathologies ostéolytiques si la balance est plutôt du côté de l'activité ostéolytique, bien que

certaines pathologies allient les deux. Ainsi, une activité ostéoclastique accrue peut être observée dans de nombreuses pathologies, comme l'ostéoporose post-ménopause, la polyarthrite rhumatoïde, la maladie de Paget ou les tumeurs osseuses primitives (Heymann *et al.* 2005).

1.3.3. Les différentes pathologies

1.3.3.i. Quelques pathologies osseuses fréquentes

L'ostéoporose est une pathologie fréquente chez les femmes ménopausées du fait de leur carence en œstrogènes, correspondant à la diminution de la résistance et de la densité minérale osseuse, et à une microarchitecture altérée conduisant à une fragilité, une porosité de l'os et à un risque accentué de fractures. En effet, avec l'âge les cellules de la moelle se différencient plutôt en adipocytes, l'activité des ostéoclastes tend à augmenter et celle des ostéoblastes décline (Manolagas 2000). À l'inverse, l'ostéopétrose (ou maladie des os de marbre) correspond à une augmentation anormale de la densité osseuse suite à un défaut de l'activité des ostéoclastes, du à des anomalies génétiques rares (Sobacchi *et al.* 2013).

Une atteinte du remodelage osseux conduisant à des lésions ostéolytiques et des pertes osseuses est souvent observable dans les maladies inflammatoires chroniques comme dans la parodontite et dans certaines formes d'arthrite, notamment la spondylarthrite ankylosante et la polyarthrite rhumatoïde. En effet, la présence des cytokines inflammatoires comme l'IL-6 induit la formation locale d'ostéoclastes qui dégradent l'os sans qu'il y ait de couplage avec la formation osseuse (Souza et Lerner 2013). La polyarthrite rhumatoïde se caractérise par une inflammation chronique de la membrane synoviale des articulations, conduisant à la perte d'os juxtaarticulaire ou de cartilage articulaire (Schett et Gravallesse 2012). La parodontite est une inflammation du tissu conjonctif gingival qui soutient la dent, assez fréquente dans la population, avec 5 à 15% des gens souffrant de formes sévères. Elle est induite par une prolifération bactérienne (souvent liée à *Porphyromonas gingivalis*), et entraîne la destruction de l'os alvéolaire (Yucel-Lindberg et Båge 2013).

L'ostéogénèse imparfaite est une maladie génétique qui touche le gène codant pour le collagène de type I, ou des gènes impliqués dans son métabolisme, causant des défauts de formation osseuse et une fragilité accrue des os (Marini et Blissett 2013).

La maladie de Paget (ou ostéite déformante) est une maladie chronique qui touche les plus de 50 ans, et se caractérise par un remaniement désordonné du tissu osseux induit par des facteurs génétiques et environnementaux. Elle se manifeste par une fibrose de la moelle osseuse et par d'importantes plages d'ostéolyse découlant d'une activité ostéoclastique anormale, qui

entraîne également une formation osseuse aberrante dans d'autres zones (Galson et Roodman 2014).

1.3.3.ii. Les tumeurs osseuses primitives et secondaires

Les tumeurs osseuses primitives peuvent survenir à tout âge, avec néanmoins une occurrence plus élevée chez les enfants et jeunes adultes. Ces pathologies sont rares, et plus souvent bénignes que malignes. Elles sont classées suivant la nature du tissu produit (**Tableau 7**) (Fletcher *et al.* 2013).

	Production de matrice osseuse	Production de matrice cartilagineuse	Production de matrice conjonctive indifférenciée	Autres types de tumeurs
Tumeurs bénignes	Ostéome Ostéoïde Ostéoblastome	Chondrome Ostéochondrome	Fibrome non-ossifiant	Tumeurs à cellules géantes
Tumeurs malignes	Ostéosarcome	Chondrosarcome	Fibrosarcome	Sarcome d'Ewing Lymphome de Parker et Jackson Myélome multiple

Tableau 7 : Les tumeurs osseuses bénignes et malignes.

Ces tumeurs sont classées suivant la nature du tissu qu'elles produisent. Les tumeurs malignes classées dans la catégorie « autres types » appartiennent aux tumeurs osseuses puisqu'elles sont issues de cellules dérivées de la moelle osseuse.

Avec en moyenne 300 nouveaux cas par an en France, les tumeurs osseuses primitives malignes représentent moins de 1% des cancers humains. Néanmoins, ces tumeurs constituent 1/10e des cancers de l'enfant et du jeune adulte, et l'ostéosarcome et le sarcome d'Ewing sont les principales tumeurs osseuses primitives malignes pédiatriques (90% des cas) (Heymann 2010). Ces tumeurs peuvent être ostéolytiques, ostéocondensantes mais sont souvent mixtes pour l'ostéosarcome (Desandes *et al.* 2004; Lacour *et al.* 2010).

Les tumeurs osseuses secondaires correspondent aux métastases osseuses dérivant d'une tumeur primitive généralement d'origine non osseuse, comme les cancers du sein ou de la prostate, et impliquent souvent un dérèglement du système RANKL/OPG (Ando *et al.* 2008; Dougall, Holen, et González Suárez 2014).

2. L'ostéosarcome

2.1. Description de la pathologie

2.1.1. La pathologie et épidémiologie

L'OMS décrit l'ostéosarcome comme étant une tumeur maligne caractérisée par l'élaboration d'une matrice ostéoïde par les cellules tumorales (Fletcher *et al.* 2013), appelée os

ectopique dans la suite de l'étude, mais qui est également associée à des plages d'ostéolyse. Des ostéosarcomes ont pu être mis en évidence sur des squelettes de dinosaures, avec la caractérisation d'un ostéochondrosarcome sur une côte de Dinosaur *Apatosaurus sp.* retrouvée dans des sédiments jurassiques dans le Wyoming (USA) (Capasso 2005). Par ailleurs, d'autres tumeurs osseuses décrites au départ comme étant des ostéosarcomes de Dinosaures seraient en fait des tumeurs osseuses secondaires du fait de leurs importantes traces d'ostéolyse (Rothschild, Witzke, et Hershkovitz 1999). Au contraire, l'autopsie d'une momie péruvienne datant de plus de 800 ans permet de mettre en évidence au niveau du fémur des caractéristiques classiques de l'ostéosarcome, à savoir la formation d'os ectopique en « feu d'herbe » (Capasso 2005) (**Figure 32**).

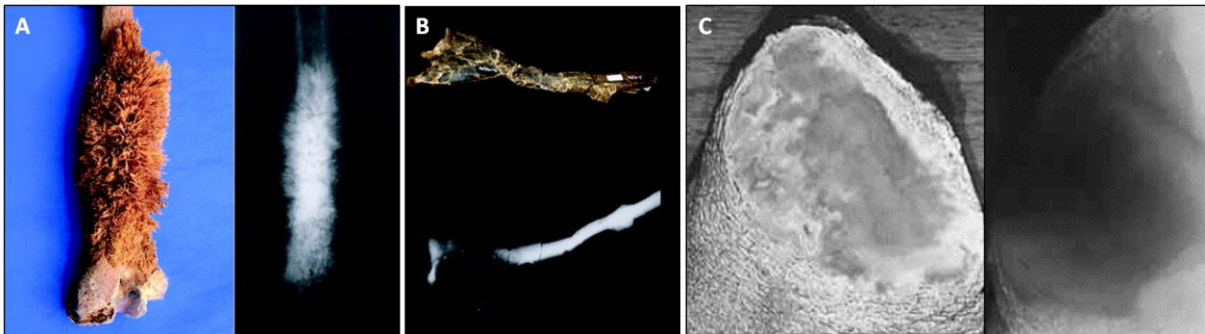


Figure 32 : Les ostéosarcomes historiques.

A) Ostéosarcome du fémur chez un jeune péruvien datant des années 1100. La formation d'os tumoral en feu d'herbe est caractéristique de la pathologie (à gauche à l'œil nu, à droite en radiographie). B) Fragment d'une côte droite d'un gros dinosaure, *Apatosaurus sp.*, entouré d'une masse osseuse multilobulée qui apparaît très dense en radiographie. A) et B) sont issus de la collection paléopathologique du muséum de Chieti, Italie (Capasso 2005) C) À gauche une section d'os de dinosaure datant du Jurassique, dont l'origine est impossible à déterminer. Ce fragment osseux présente une importante zone d'ostéolyse caractéristique d'une métastase osseuse. La radiographie confirme en effet cette destruction de l'os cortical typique de l'invasion tumorale (à droite) (Rothschild, Witzke, et Hershkovitz 1999).

L'ostéosarcome est la tumeur osseuse primitive maligne la plus fréquente avec une incidence annuelle de 3,6 nouveaux cas par million chez les moins de 15 ans (Hauben et Hogendoorn 2010). Comme les autres tumeurs osseuses primitives, l'ostéosarcome touche principalement les jeunes hommes (sex-ratio de 1,4 :1, avec 75% des ostéosarcomes diagnostiqués entre 8 et 25 ans) avec un pic d'incidence autour de 18 ans, et un deuxième pic d'incidence autour de 60 ans consécutif à une autre pathologie (maladie de Paget, etc.) ou à une radiothérapie (Ottaviani et Jaffe 2009; Heymann 2010).

2.1.2. Aspect et localisation de la tumeur

L'ostéosarcome atteint principalement les os longs dont la croissance est la plus importante, notamment le fémur, dans 40% des cas au niveau de l'extrémité inférieure et dans 14% des cas au niveau de l'extrémité supérieure, et l'extrémité supérieure du tibia est touchée dans 15% des cas (**Figure 33**). La métaphyse de l'os est principalement touchée, au niveau de la

plaque de croissance, alors que les diaphyses ne sont touchées que dans 10% des cas, et les épiphyses sont très rarement atteintes (Guinebretière *et al.* 2001; Fletcher *et al.* 2013).

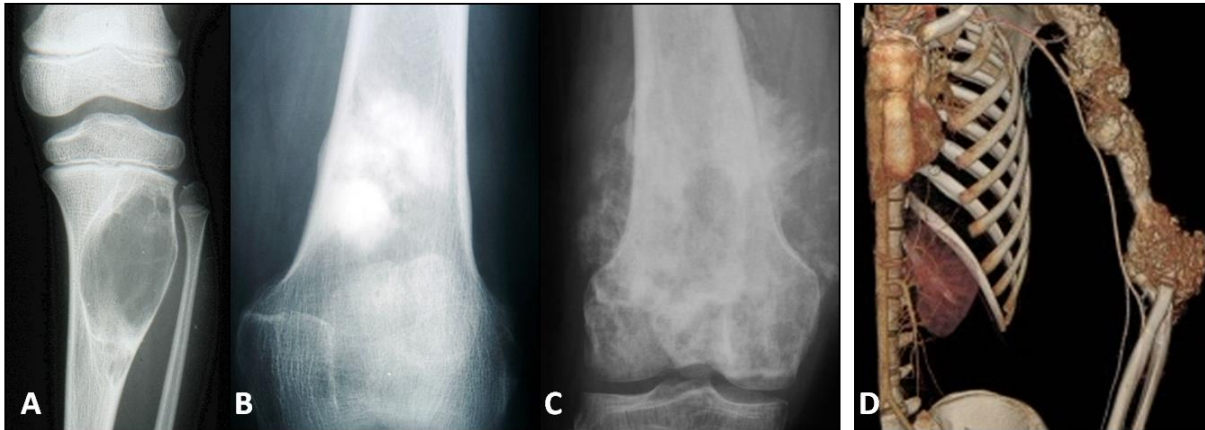


Figure 33 : Déséquilibre du remodelage osseux associé à l'ostéosarcome.

Clichés radiographiques des lésions osseuses associées au développement de l'ostéosarcome, obtenus par le Pr. François Gouin du service d'orthopédie du CHU Hôtel Dieu de Nantes, INSERM UMR957. A) Lésions ostéolytiques, B) Lésions ostéocondensantes, C) Lésions mixtes, avec ostéocondensations hétérogènes de la métaphyse et de l'épiphyse fémorale avec une ostéolyse de l'os cortical et la formation d'os ectopique péri-osseuse dans les parties molles. D) IRM d'un ostéosarcome de l'humérus chez une jeune patiente de 15 ans (Dominique Heymann 2010)

Les ostéosarcomes peuvent être classés en différents groupes suivant leur localisation et leur aspect histologique (Figure 34, tableau 8) (Yarnish *et al.* 2010).

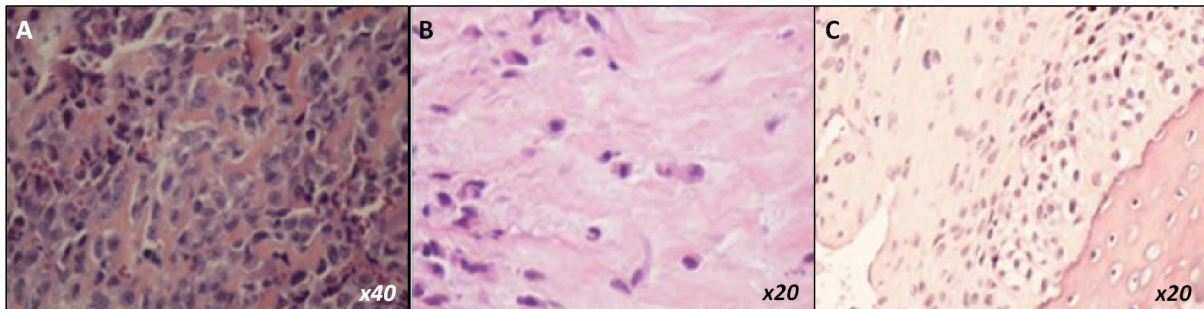


Figure 34: Aspect histologique des ostéosarcomes.

A) Ostéosarcome ostéoblastique, B) Ostéosarcome fibroblastique, C) Ostéosarcome chondroblastique. Photographies obtenues par le Dr. Marie-Françoise Heymann, CHU Hôtel Dieu de Nantes, INSERM UMR957.

L'ostéosarcome métastase préférentiellement aux poumons, avec également dans de rares cas l'apparition de métastases osseuses et hépatiques.

Tissu osseux et pathologies associées : cas particulier de l'ostéosarcome

	Ostéosarcomes centraux conventionnels			Ostéosarcomes centraux non-conventionnels		Ostéosarcomes juxtacorticaux			Ostéosarcomes intracorticaux
Sous-types	Ostéoblastique (50%)	Chondroblastique (25%)	Fibroblastique (25%)	Télangiectasique	À petites cellules rondes et de bas grade lytique	Sclérotique	Périosté	Parostéal	Cas isolés
Localisation		Intramédullaire			Intramédullaire		À la surface de l'os cortical		Au sein de l'os cortical
Occurrence		La plus fréquente		2 à 10 %					Rares
Pronostic				Très mauvais	Très mauvais	Bon		Bon	?
Aspect	Stroma osseux	Stroma cartilagineux	Stroma fibreux	Lésions lytiques Fractures pathologiques Lésion multilobée à contenu hémorragique	Aspect hétérogène Petites cellules rondes peu différenciées comme dans le sarcome d'Ewing	Très différencié Faible invasion des tissus mous			

Tableau 8: Les différents types d'ostéosarcomes. D'après (Yarnish et al. 2010).

2.1.3. Diagnostic

Le diagnostic des ostéosarcomes est complexe et se base sur l'imagerie, la chirurgie et l'analyse anatomopathologique (**Figure 35**). Avant l'apparition d'une masse palpable, des douleurs osseuses se font sentir, liées à des fissures osseuses ou des fractures pathologiques (Picci 2007; Green et Mills 2014). Par ailleurs, des marqueurs peuvent également être utilisés pour caractériser les ostéosarcomes. Ainsi, la détection de MDM2 et CDK4 par immunohistochimie est utilisée dans le diagnostic des ostéosarcomes de bas grade pour différencier les lésions fibreuses bénignes des lésions fibro-osseuses dans des cas atypiques (Dujardin *et al.* 2011). De plus, le dosage de la phosphatase alcaline dans les sérums de patients peut également aider au diagnostic de l'ostéosarcome (Shimose *et al.* 2014).

2.1.4. Etiologie de l'ostéosarcome

Les ostéosarcomes ont une origine mésodermique, et dérivent de cellules souches mésenchymateuses à différents stades de la différenciation ostéogénique, expliquant l'état plus ou moins différenciés des tumeurs. En effet, les cellules d'ostéosarcome expriment des marqueurs ostéoblastiques comme RUNX2, la sialoprotéine osseuse, la phosphatase alcaline ou l'ostéocalcine (Wagner *et al.* 2011). Il faut noter que plus la tumeur est différenciée, meilleur est le pronostic. Par ailleurs, le pic d'incidence de l'ostéosarcome autour de 18 ans, principalement chez les garçons qui grandissent plus que les filles, la localisation de la tumeur principalement au niveau des os longs ainsi qu'une forte occurrence de la pathologie chez les chiens de grandes tailles indiquent un lien entre le remodelage osseux et l'apparition de l'ostéosarcome (Guillon *et al.* 2011). Une première pathologie (tumeurs à cellules géantes, maladie de Paget, *etc.*) et les radiothérapies peuvent également favoriser l'apparition d'un ostéosarcome dit secondaire. Les prédispositions génétiques familiales sont rares dans le cas de l'ostéosarcome humain. Trois maladies congénitales peuvent cependant favoriser son développement : le syndrome de Li-Fraumeni, les rétinoblastomes héréditaires et les pathologies touchant les hélicases RecQ comme le syndrome de Rothmund-Thomson (Hauben *et al.* 2003). La survenue de l'ostéosarcome ne repose donc pas sur une anomalie génétique particulière, et ses causes sont multiples. L'analyse des caryotypes montre de nombreuses anomalies, comme des duplications ou des réarrangements chromosomiques, mais n'a pas permis de mettre en évidence un profil génétique type de l'ostéosarcome, contrairement au sarcome d'Ewing. Cependant, des atteintes au niveau des loci des gènes *TP53* (Sandberg et Bridge 2003) et *RB1* sont observées dans respectivement 50% et 70% des cas (Fuchs et Pritchard 2002). D'autres altérations génétiques touchent également des molécules impliquées dans le contrôle du cycle cellules (CDK4, MDM2, p16, *etc.*) ou qui régulent la prolifération et la différenciation des ostéoblastes (*c-Myc*, *AP-1*, *etc.*). Des mutations sur les gènes codant pour le RTKIII KIT et pour les trois formes de la sous-unité

catalytique p110a de PI3K ont également été caractérisées récemment (Choy *et al.* 2012; Entz-Werlé *et al.* 2005).

2.1.5. Prise en charge médicale

2.1.5.i. Thérapies classiques et problèmes posés

Bien que l'expression de certaines protéines comme p53, c-Myc ou Bcl-2 soient utilisées comme marqueurs de la progression et du pronostic dans l'ostéosarcome (Wu *et al.* 2012), le développement d'approches thérapeutiques ciblées est rendu difficile par le manque d'information sur les mécanismes moléculaires à l'origine du développement de ce cancer. Le protocole thérapeutique actuel repose sur une polychimiothérapie néoadjuvante et post-opératoire associées à la résection chirurgicale. L'amputation pratiquée systématiquement jusqu'aux années 70 ne se fait plus que dans 10% des cas où l'invasion tumorale est trop importante. La chimiothérapie néoadjuvante permet de déterminer lors de l'exérèse de la tumeur si le patient est bon ou mauvais répondeur aux agents chimiothérapeutiques par quantification du pourcentage de nécrose (grade de HUVOS ; le grade IV correspond à la mort de la totalité des cellules tumorales) (**Figure 36**). De plus, en limitant la croissance de la tumeur elle favorise une chirurgie conservatrice. La chimiothérapie post-opératoire est adaptée en fonction de la réponse au traitement néoadjuvant. Un bon répondeur (90 à 95% de nécrose tumorale, soit une tumeur de grade III) continuera alors à suivre le même traitement. Les premiers agents de chimiothérapie administrés dans le traitement de l'ostéosarcome ont été le méthotrexate et l'adriamycine, (doxorubicine), le cisplatine et l'ifosfamide sont également utilisés aujourd'hui. La nature et le grade de l'ostéosarcome ainsi que l'âge du patient déterminent la combinaison des agents, la fréquence d'injection et les doses dépendent de l'âge du patient (Ando *et al.* 2013). La radiothérapie peut être combinée à la chimiothérapie dans des cas particuliers (métastases osseuses multiples par exemple), mais n'est pas utilisée en routine car l'ostéosarcome y est peu sensible (Picci 2007). Les traitements actuels ont permis d'améliorer la survie des patients, qui est de 60 à 70% à 5 ans, et de limiter la dissémination métastatique.

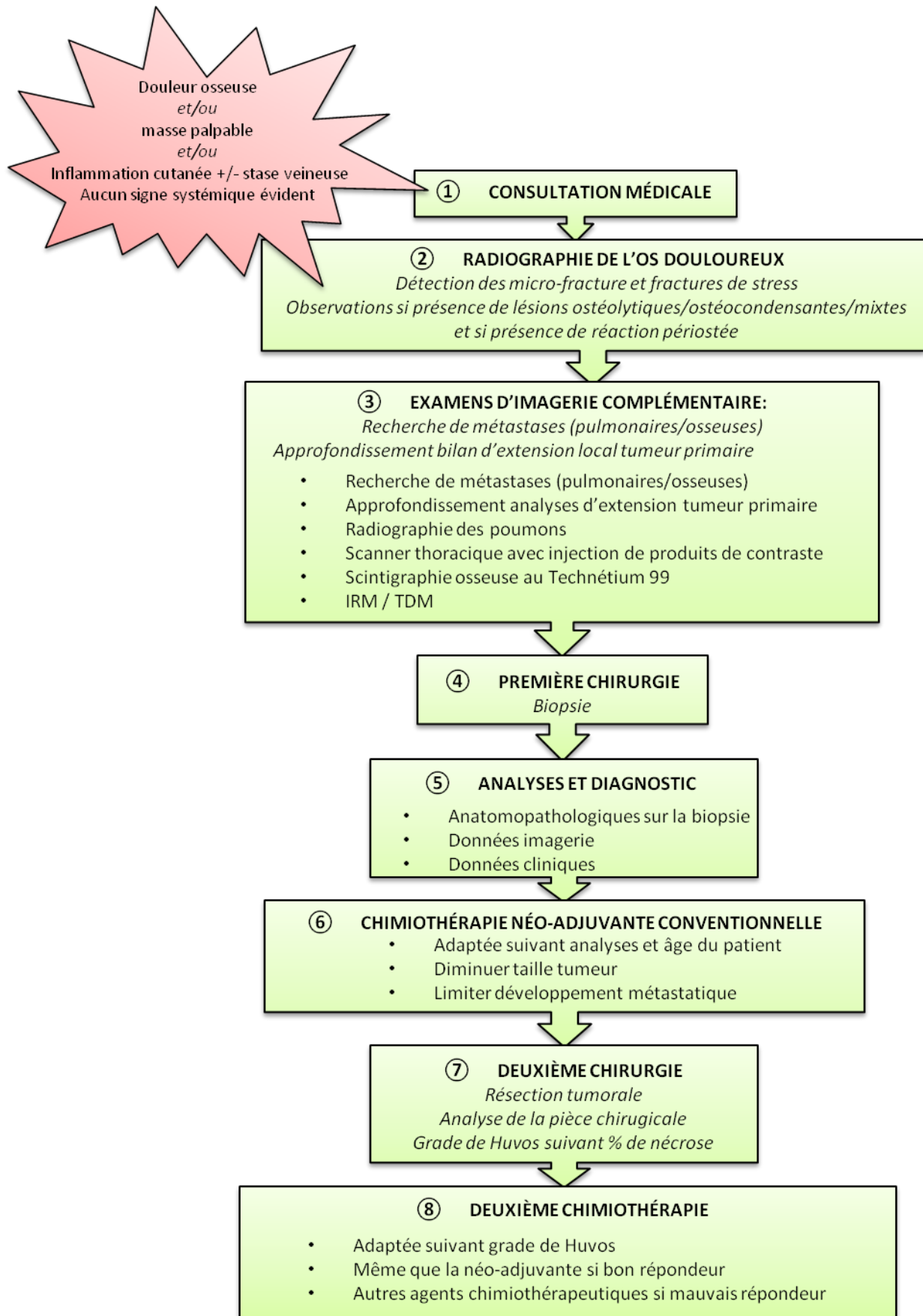


Figure 35: Les différentes étapes du diagnostic et de la prise en charge de l'ostéosarcome.

Néanmoins, 30% des patients présentent déjà des métastases lors du diagnostic, et leur survie à 5 ans est seulement de 30%.

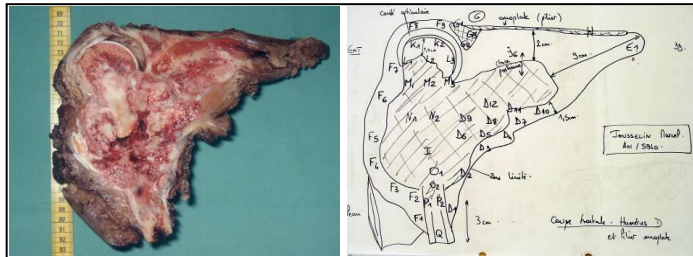


Figure 36 : Estimation du nombre de cellules tumorales résiduelles sur une pièce de résection d'un ostéosarcome de la hanche.

Détermination du % de nécrose et du grade de Huvos. Photographie fournie par le Pr.François Gouin du service orthopédique du CHU Hôtel Dieu.

2.1.5.ii. Les traitements en cours de développement

L'efficacité des traitements en cours est donc limitée en cas de foyers métastatiques, et des résistances aux agents chimiothérapeutiques se mettent en place. De nouvelles approches thérapeutiques sont donc en cours de développement pour tenter de contrer ces échappements aux traitements, et pour améliorer les conditions de vie des patients. Ces traitements en essais pré-cliniques ou cliniques sont basés sur des anticorps ou des inhibiteurs ciblant les oncoprotéines ou les protéines issues de gènes suppresseurs de tumeurs, des molécules pro-angiogéniques impliquées dans le développement tumoral, notamment les RTKs décrits dans la partie 1 qui se retrouvent souvent mutés dans de nombreux cancers (Heymann et Rédini 2013; Gaspar *et al.* 2012). La connaissance des voies de signalisation dérégulées dans l'ostéosarcome s'avère également nécessaire afin de développer de nouveaux traitements inhibant la croissance tumorale, comme l'utilisation de l'inhibiteur de PI3K BYL719 (Gobin *et al.* 2014), l'inhibiteur NVP-BE235 PI3K/mTOR (Gobin *et al.* 2014) ou l'imatinib mésylate qui inhibe l'activité de RTKs comme le PDGFR et le M-CSFR (Gobin *et al.* 2014).

2.2. Etablissement du cercle vicieux entre cellules tumorales et leur microenvironnement

Les cibles thérapeutiques actuelles sont évidemment les cellules tumorales, mais les approches ciblant le microenvironnement tumoral sont en plein essor, avec notamment un ciblage des ostéoclastes via le blocage de la voie RANK/RANKL (injection d'OPG recombinante, de siRNA dirigés contre RANK ou RANKL, de l'anticorps anti-RANKL, le Denosumab, ou de fragments solubles Rank Fc) ou l'utilisation des biphosphonates (Ando *et al.* 2008; Wittrant *et al.* 2004; Clézardin 2011). Plus récemment, il a été montré que l'inhibition des bromodomains dans l'ostéosarcome avec le composé JQ1 inhibait le développement des cellules tumorales, mais aussi l'activité des cellules ostéoblastiques et ostéoclastiques (Lamoureux *et al.* 2014). L'angiogenèse est également une cible thérapeutique et l'utilisation d'anti-VEGF comme le bevacizumab permet de limiter le développement de néovaisseaux tumoraux (Gaspar *et al.* 2012).

En effet, comme les autres types tumoraux, les tumeurs d'ostéosarcome sont très hypoxiques et nécessitent donc une formation accrue de vaisseaux pour apporter des nutriments et de l'oxygène aux cellules tumorales et pour éliminer les déchets issus de la nécrose. Par ailleurs, ces vaisseaux favorisent le recrutement de cellules immunitaires, qui participent également au développement tumoral (invasion tumorale et angiogenèse par le remodelage de la matrice, la sécrétion de facteurs pro-tumoraux et pro-angiogéniques, etc.).

La niche tumorale osseuse (vaisseaux, cellules immunitaires notamment les macrophages, ostéoblastes, ostéoclastes, facteurs solubles, etc.) joue donc un rôle majeur dans le développement de la pathologie selon la théorie de la graine et du sol (Paget 1989). Ainsi, un cercle vicieux s'établit entre les cellules tumorales d'ostéosarcome et le microenvironnement osseux (**Figure 37**).

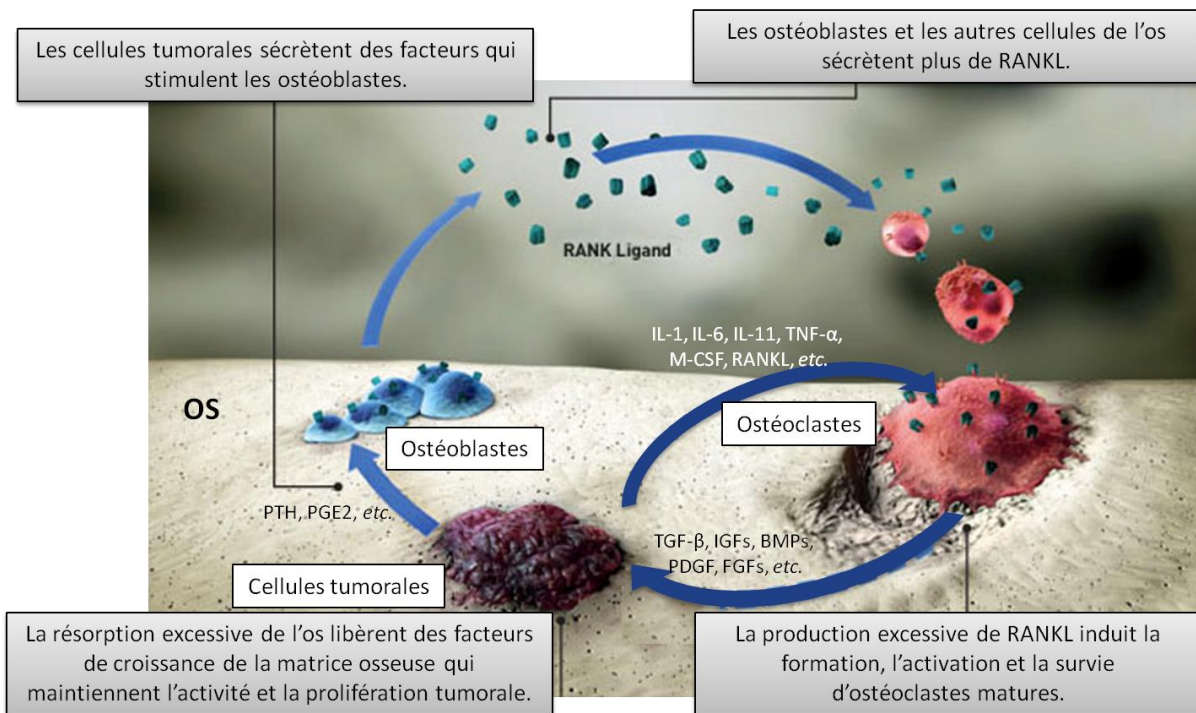


Figure 37: Établissement du cercle vicieux entre cellules d'ostéosarcome et cellules ostéoformatrices.
Modifié d'après <http://dramayyas.blogspot.fr/2013/09/denosumab-in-carcinoma-prostate-with.html>

Les cellules tumorales sécrètent de nombreux facteurs qui activent directement les ostéoclastes comme le TNF α , mais également des facteurs ostéoblastiques (BMPs, IGFs, Wnts, etc.) qui activent indirectement les ostéoclastes en favorisant la production de RANKL. La résorption de la matrice osseuse libère alors des facteurs pro-tumoraux (IGF-1, TGF- β , etc.), qui vont eux-mêmes activer la prolifération tumorale, relançant le cercle vicieux. Par conséquent, une surexpression de RANKL est souvent décrite dans les ostéosarcomes humains, expliquant les lésions ostéolytiques et la formation osseuse anarchique.

Objectifs de la thèse

Le Macrophage Colony-Stimulating Factor (M-CSF) est un acteur moléculaire important dans la biologie de nombreuses pathologies cancéreuses (sein, ovaire, poumon, prostate, etc.), et une forte expression de la cytokine dans les séras de patients est souvent synonyme de mauvais pronostic (Ławicki *et al.* 2008; Richardsen *et al.* 2009). En effet, l'axe M-CSF/M-CSFR stimule de façon autocrine et paracrine la prolifération tumorale chez certaines cellules cancéreuses, comme celles du cancer du sein qui expriment à la fois la cytokine et son ligand (Lin *et al.* 2001). Le M-CSF favorise également l'angiogenèse tumorale notamment grâce au recrutement de macrophages « suppresseurs » de l'immunité anti-tumorale, permettant ainsi l'initiation, la croissance et la dissémination de la tumeur (Curry *et al.* 2008). Malgré l'absence de données cliniques, une étude pré-clinique *in vivo* a mis en évidence ce rôle pro-tumoral du M-CSF dans la pathogenèse de l'ostéosarcome, qui reste la tumeur osseuse primitive maligne la plus fréquente (Kubota *et al.* 2009). La découverte en 2008 de l'interleukine-34 (IL-34) se fixant sur le récepteur au M-CSF (M-CSFR) et partageant de nombreuses activités biologiques communes avec le M-CSF (Lin *et al.* 2008) pose la question du rôle de cette redondance biologique, et de ses conséquences en pathologie. En effet, tout comme le M-CSF, l'IL-34 est un facteur de survie des monocytes qui permet leur différenciation en ostéoclastes et macrophages polarisés de type M2 (Baud'Huin *et al.* 2010; Foucher *et al.* 2013). L'IL-34 est impliquée dans certaines pathologies osseuses comme les tumeurs osseuses à cellules géantes, la polyarthrite rhumatoïde ou les maladies parodontales (Baud'huin *et al.* 2010; Chemel *et al.* 2012; Boström et Lundberg 2013). Par ailleurs, l'action de l'IL-34 semble plus complexe qu'une simple compétition avec le M-CSF sur un récepteur commun, le M-CSFR, puisqu'un autre récepteur à l'IL-34 a récemment été identifié, le RPTPβ/ζ (Nandi *et al.* 2013).

La thèse présentée porte sur l'étude des interactions fonctionnelles entre le M-CSF, l'IL-34 et le M-CSFR. Les objectifs de travail ont donc été de :

- déterminer le rôle de l'interleukine-34 dans la pathogenèse de l'ostéosarcome, caractériser la place de la cytokine dans le microenvironnement tumoral ainsi que son implication dans le cercle vicieux qui s'établit entre la tumeur et le tissu osseux.
- analyser l'impact de l'IL-34 sur les activités biologiques du M-CSF et plus particulièrement de caractériser les activations spécifiques du M-CSFR par ces deux cytokines selon le type cellulaire étudié, et rechercher de nouveaux partenaires permettant la fixation de l'IL-34 et ainsi la modulation de l'activation du M-CSFR.
- étudier les interrelations fonctionnelles entre le M-CSF et l'IL-34, et comprendre les conséquences de la présence des deux cytokines au sein d'un même microenvironnement.

Chapitre 1 : rôle de l'interleukine-34 dans la pathogenèse de l'ostéosarcome

I. Introduction et rationnel de l'étude

1. Généralités : importance du microenvironnement tumoral

L'importance du microenvironnement tumoral est mise en évidence depuis 1889 par les travaux du chirurgien anglais Stephen Paget qui fut le premier à démontrer son rôle dans la progression tumorale et la dissémination métastatique (Paget 1989). Sa théorie selon laquelle les cellules tumorales métastatiques (les « graines ») interagissent spécifiquement avec le microenvironnement d'un organe (le « sol ») repose sur l'observation de sites métastatiques préférentiels pour chaque type de cancer. Après avoir été remis en cause, ses travaux sont confirmés une centaine d'années plus tard par des expériences de greffes de cellules tumorales chez la souris qui démontrent un meilleur potentiel métastatique lorsque les cellules sont implantées en site orthotopique (Gohji *et al.* 1997; Hart 1979). Ainsi, l'os, véritable réservoir de facteurs de croissance, constitue un terrain fertile pour l'implantation des cellules métastatiques de divers cancers, et le maintien d'un cercle vicieux entre cellules d'ostéosarcome et cellules osseuses démontre l'importance du microenvironnement dans les tumeurs osseuses. Plus généralement, le microenvironnement inclut la matrice extracellulaire, les fibroblastes, les vaisseaux, les cellules immunitaires (lymphocytes et macrophages notamment), ainsi que de nombreux facteurs solubles et systémiques qui participent au développement tumoral (Castaño *et al.* 2012). La progression tumorale et la dissémination métastatique nécessitent un remodelage de la matrice extracellulaire, avec la destruction du tissu conjonctif et des membranes basales qui séparent les tissus des vaisseaux. Cette digestion de la matrice extracellulaire est permise par des protéases, sécrétées par les cellules tumorales, ou par les cellules environnantes sous l'action des cellules tumorales. La libération des produits de la matrice induit le chimiotactisme des cellules tumorales, et stimule leur prolifération cellulaire et leur survie, ainsi que l'angiogenèse (libération de facteurs pro-angiogéniques, déstabilisation des interactions cellules-matrice par les protéases, *etc.*). Cette formation de néo-vaisseaux entraîne le passage dans la circulation des cellules tumorales, qui retraverseront par extravasation la membrane basale et l'endothélium pour aller coloniser des sites distants de la tumeur primitive. De plus, ces vaisseaux tumoraux permettent le recrutement de cellules immunitaires sur le site tumoral. Ainsi, les monocytes adhèrent à l'endothélium, s'extravasent dans le tissu tumoral et se différencient en macrophages immunosuppresseurs, qui vont exercer une action anti-tumorale en inhibant la réponse immunitaire T_H1 et la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires (Goubran *et al.* 2014; Mbeunkui et Johann 2009).

2. L'angiogenèse tumorale

2.1. Les acteurs de l'angiogenèse tumorale

Excepté certaines tumeurs comme les chondrosarcomes, la plupart nécessitent un apport sanguin indépendant après avoir atteint une taille de 1 à 2 mm de diamètre, qu'elles acquièrent en détournant le sang des réseaux classiques grâce à la formation de néo-vaisseaux à partir du réseau vasculaire existant. À partir de cette taille, les tumeurs deviennent fortement hypoxiques, et le manque d'oxygène induit l'apoptose des cellules tumorales, mais aussi l'expression du facteur de transcription HIF-1 α , qui va activer la transcription de facteurs pro-angiogéniques (VEGF, PDGF, SDF-1, Ang-1, etc.). L'expression de ces facteurs déclenche le processus angiogénique, et la formation de néo-vaisseaux permet d'apporter l'oxygène, les nutriments et les facteurs de croissance à la tumeur. Par ailleurs, il existe une corrélation positive entre la densité de la microvascularisation tumorale et la probabilité de développer des métastases (Kirsch, Schackert, et Black 2004).

L'angiogenèse est un processus qui peut être physiologique ou pathologique, et correspond à la formation de nouveaux capillaires à partir de vaisseaux sanguins pré-existants par bourgeonnement. Elle résulte d'un équilibre finement régulé entre facteurs pro-angiogéniques et anti-angiogéniques (**Tableau 9**) qui peuvent être de différentes natures : cytokines (facteurs de croissance, chimiokines, etc.) et leurs récepteurs, protéines de la matrice extracellulaire, molécules d'adhérence membranaires, enzymes protéolytiques, etc. (Baeriswyl et Christofori 2009).

Facteurs pro-angiogéniques	Facteurs anti-angiogéniques
Adénosine	ADAMTS-1
Angiogénine, angiopoïétines-1/2, TIE1/2	Angiopoïétine-2
CXCL-12 (SDF-1)/CXCR4 et CXCR7	Angiostatine
Famille de l'EGF	Anti-angiogénique antithrombine III
Famille du FGF	Calréticuline
Famille de l'IGF	Endostatine
Famille des MMPs (MMPs, MT-MMPs, ADAMs, ADAMTSs)	IFN- $\alpha/\beta/\gamma$
Famille de Notch	IL-1/4/12
Famille du PDGF	PEDF
Famille du VEGF	PF-4
Fibronectine, laminine, collagène	Plasminogène fragment Kringle 5
Follistatine, leptine, midkine,	Prolactine 16 kDa fragment
Hypoxie (HIF1- α)	Protéoglycanes (Décorine)
Molécules d'adhérence (ICAM-1, VCAM-1, E- sélectine, Intégrines)	Tétrahydrocortisol-S
Neuropilines et sémaphorines	Rétinoïdes
Oestrogènes, PGE1/2	Thrombospondine-1/2
PIGF, HGF/SF, G-CSF, CTGF	TIMPs
Pléiotrophine, progranuline, proliférine	Vasculostatine/vasostatine
Protéines Bv8 (prokinéticine-1,-2)	VEGFR soluble
Protéoglycanes à héparane sulfate (Endocan, perlécan)	
TGF α , TGF- β , BMPs	
TNF- α , IL-6, IL-8, MCP-1	

Tableau 9: Liste non exhaustive des principaux facteurs stimulant ou inhibant l'angiogenèse.
D'après (Baeriswyl et Christofori 2009; Bergers et Benjamin 2003; Tonini, Rossi, et Claudio 2003).

Dans l'environnement tumoral, cet équilibre est rompu et entraîne une croissance inappropriée des vaisseaux. En effet, les tumeurs sont décrites comme « des lésions qui ne guérissent jamais ». Les vaisseaux tumoraux ne se développent pas de façon conventionnelle et présentent une structure, une organisation et un processus de dissémination archaïques, formant des tubes tortueux de diamètres variables. Les plus gros vaisseaux peuvent présenter des parois semblables à celles des capillaires, ou une membrane basale incomplète associée à une couche de péricytes (Tonini, Rossi, et Claudio 2003). Les facteurs ou agents angiogéniques stimulant directement ou indirectement le développement des vaisseaux sanguins (prolifération des précurseurs endothéliaux, croissance des cellules endothéliales, stabilisation des vaisseaux sanguins etc.) (**Figure 38**) sont sécrétés par la tumeur, mais également par les cellules du microenvironnement tumoral, notamment les cellules endothéliales et les macrophages. Les facteurs pro-angiogéniques les plus connus sont des facteurs de croissance et leurs récepteurs, comme les membres de la famille du VEGF ou du FGF.

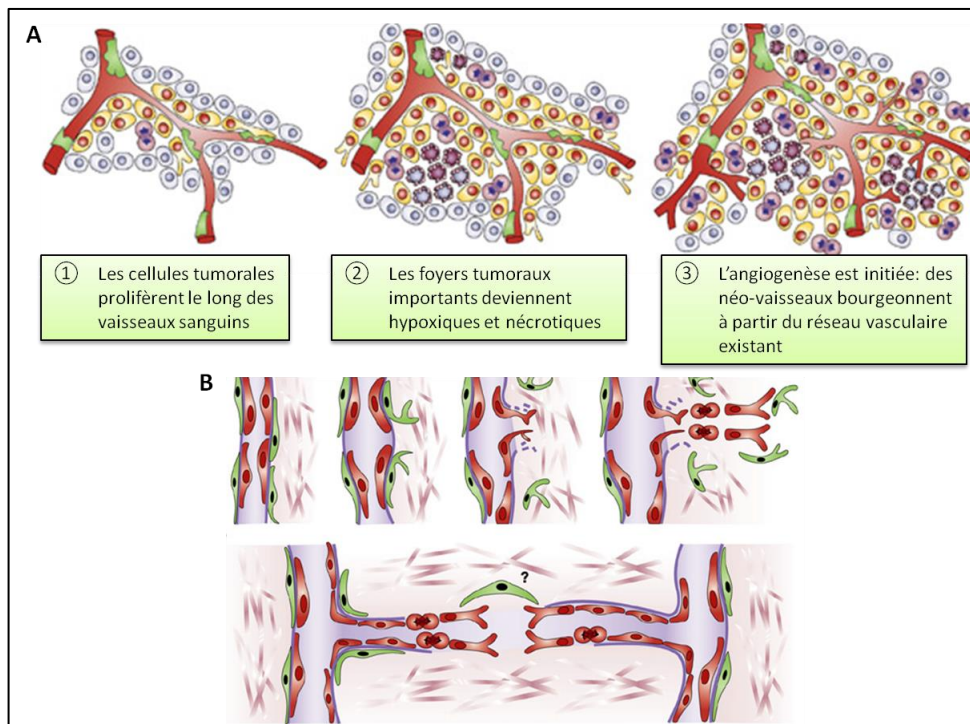


Figure 38 : L'angiogenèse tumorale.

A) Les cellules tumorales détournent le réseau vasculaire existant en formant des néo-vaisseaux par bourgeonnement. En gris, les cellules du tissu sain, en jaune les cellules tumorales, en violet avec un noyau étoilé les cellules en division, en violet foncé les cellules apoptotiques ou nécrotiques. B) Au sein de la tumeur les vaisseaux se forment à partir de capillaires ou de veinules post-capillaires existants. Tout d'abord, les péricytes (en vert) se détachent et le vaisseau sanguin se dilate avant que la membrane basale et la matrice extracellulaire ne soient dégradées. Ceci permet aux cellules endothéliales de migrer dans l'espace péri-vasculaire sous l'influence des stimuli produits par les cellules tumorales ou les cellules du microenvironnement tumoral. Les cellules endothéliales prolifèrent et se suivent, guidées par la cellule coordinatrice (« tip-cell ») et les péricytes. Derrière le front de migration, les cellules endothéliales adhèrent les unes aux autres et forment la lumière du vaisseau, tout en synthétisant la membrane basale à laquelle viennent adhérer les péricytes. Modifié d'après (Bergers et Benjamin 2003).

Le **VEGF-A**, ou facteur de perméabilité vasculaire, est le plus impliqué dans le processus angiogénique, et sa surexpression est souvent corrélée au développement des vaisseaux tumoraux sinueux, fragiles, et souvent associés à des saignements (Ferrara 2004). Son action est potentialisée par les glycosaminoglycanes qui le présentent à son récepteur tout en limitant son internalisation, prolongeant ainsi l'intensité et la durée du signal. Le VEGF est exprimé tout au long du développement tumoral, et agit à trois niveaux. Tout d'abord il a un rôle précoce, permettant **l'établissement de nouveaux vaisseaux** en recrutant les cellules progénitrices vasculaires. Ensuite, au cours du développement tumoral le VEGF permet **la croissance de ces vaisseaux**, et active en parallèle des voies angiogéniques secondaires comme celles du FGF, du TGF- β , du PlGF ou du PDGF (Appelmann *et al.* 2010). De plus, le VEGF induit la **survie** des cellules endothéliales permettant le **maintien** du réseau vasculaire (Hicklin et Ellis 2005).

Les **FGFs** ont également un rôle majeur dans l'angiogenèse tumorale et sont souvent à l'origine des résistances aux thérapies anti-VEGF. En effet, ils stimulent la prolifération et la migration des cellules endothéliales, et le FGF-2 est connu pour entraîner la tubulogenèse de ces cellules (HUVECs, *etc.*) cultivées sur une matrice de collagène et augmenter leur expression de protéases, du VEGF, du SDF-1 et de plusieurs intégrines. Les FGFs n'existent pas sous forme libre dans la circulation, et sont présents dans le cytoplasme, ou stockés sur les chaînes d'héparine des protéoglycanes à la surface cellulaire ou dans la MEC. Les FGFs ne participent pas à toutes les réponses angiogéniques, et sont plutôt impliqués dans le remodelage vasculaire au cours de la réparation tissulaire suite à une libération rapide des chaînes d'héparine (Cully *et al.* 2006).

Le **SDF-1** (ou CXCL-12) est également un facteur de la tumorigenèse puisqu'il induit la survie des cellules tumorales exprimant son récepteur CXCR4, et crée un gradient chimiotactique pour attirer les cellules tumorales. De même, le SDF-1 induit la migration par chimiotactisme des cellules endothéliales, mais également le recrutement de cellules progénitrices de la moelle osseuse, permettant la formation de pseudotubes et l'angiogenèse. Le SDF-1 induit également l'expression de facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF ou l'IL-8 (Domanska *et al.* 2013).

Les **MMPs** sécrétées (MMP-2 et MMP-9), et la MMP membranaire MT1-MMP sont les plus impliquées dans l'invasion tumorale et l'angiogenèse, permettant la dégradation de la matrice extracellulaire et de la membrane basale des vaisseaux pour permettre la migration des cellules tumorales, des cellules endothéliales et le bourgeonnement capillaire. De plus, ces MMPs activent des facteurs pro-angiogéniques, comme le VEGF membranaire qui est libéré par clivage protéolytique par la MMP-9, la MMP-2 qui permet la sécrétion du FGF-2 ou les MMP-14 et MT1-MMP qui libèrent le TGF- β . Les MMPs jouent également un rôle important dans la mobilisation sur la zone d'angiogenèse des progéniteurs endothéliaux et des cellules leucocytaires de la moelle

osseuse. À l'inverse, les TIMPs inhibent la progression tumorale et l'angiogenèse. (Chen *et al.* 2013; Jodele *et al.* 2006).

Les **protéoglycanes**, en particulier ceux à héparane sulfate jouent un rôle majeur dans l'angiogenèse, et sont exprimés de façon constitutive par les cellules vasculaires (Benslimane-Ahmim *et al.* 2013). Ils servent de site de réserve aux facteurs pro-angiogéniques (VEGF, FGF-2, SDF-1, PDGF, éphrines, facteurs Wnt, *etc.*) mais aussi de co-récepteurs, modulant ainsi leur activité. Ainsi, le perlécan joue un rôle pro-angiogénique, tandis que les syndécans et glypicans sont connus pour jouer un rôle majeur dans la croissance tumorale (Iozzo et Sanderson 2011).

2.2. Rôle du M-CSF dans l'angiogenèse

Le M-CSF est sécrété abondamment dans le microenvironnement tumoral par les cellules tumorales elles-mêmes, les cellules endothéliales et les fibroblastes activés, et les cellules myéloïdes. Il joue un rôle clé dans l'angiogenèse tumorale en induisant la formation de néovaisseaux à partir du réseau vasculaire existant de façon indirecte (Lin et Pollard 2007). En effet, le M-CSF recrute directement par chimiotactisme les phagocytes mononucléés sur le site, ou indirectement en activant de façon paracrine la sécrétion de MCP-1 (ou CCL2) (Wang *et al.* 1988). De plus, le M-CSF induit la sécrétion de VEGF biologiquement actif par les cellules myéloïdes, et ce indépendamment de HIF-1 α , par l'activation de la voie des MAPK et en aval du facteur de transcription Sp1. Par ailleurs, le M-CSF induit également la production d'autres facteurs pro-angiogéniques par les phagocytes mononucléés, comme l'IL-8 ou la MMP-9 (Curry *et al.* 2008).

L'inhibition du M-CSF bloque l'angiogenèse pathologique, sans affecter le développement de la vascularisation classique, en diminuant la forte densité du réseau vasculaire formé au sein de la tumeur. De plus, les souris *CSF-1^{op/op}* montrent un défaut de vascularisation associé à une déficience en macrophages, responsable de la diminution de la croissance tumorale et du nombre de métastases (Kubota *et al.* 2009). L'injection de M-CSF recombinant chez ces souris *CSF-1^{op/op}* induit l'angiogenèse, permettant ainsi la correction de certains défauts du phénotype ostéopétrotique (Aharinejad *et al.* 1995).

3. Recrutement leucocytaire sur la tumeur et polarisation des TAMs

3.1. TAMs et progression tumorale

L'infiltrat macrophagique constitue un composant majeur du stroma tumoral, et la densité de la micro-vascularisation tumorale ainsi que le pronostic des patients sont souvent corrélés avec le nombre de macrophages tumoraux (Tang 2013; Obeid *et al.* 2013). L'induction d'un recrutement de macrophages dans des tumeurs peu vascularisées encore à un stade précoce

déclenche le processus angiogénique (« switch angiogénique ») et accélère la progression vers un phénotype malin (**Figure 39**).

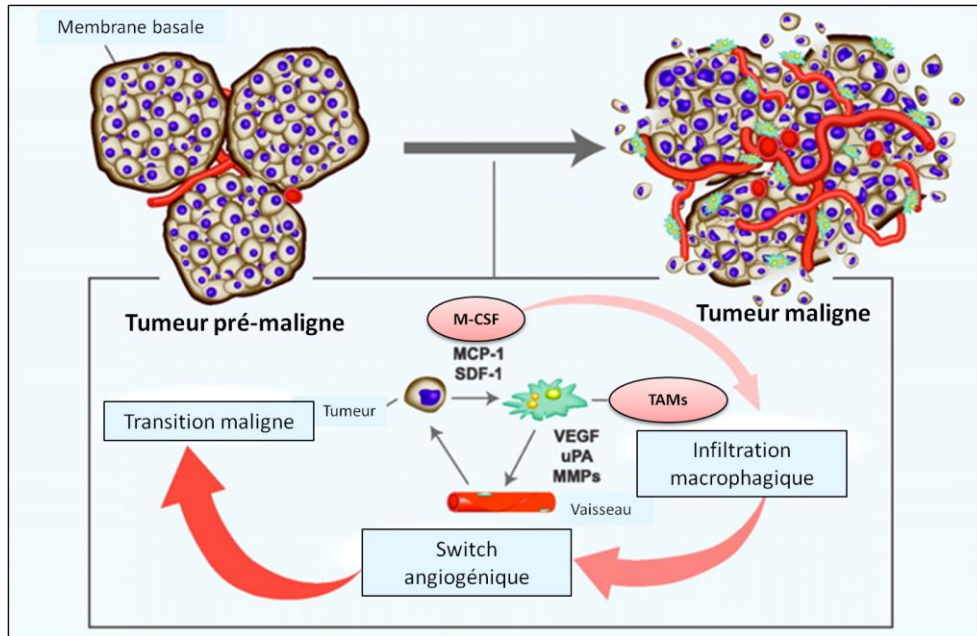


Figure 39 : Les macrophages associés à la tumeur déclenchent le processus angiogénique.

Le « switch » angiogénique est permis grâce à l'interaction entre la tumeur et son microenvironnement. La tumeur produit des facteurs chimioattractants comme le M-CSF ou le MCP-1 qui induisent le recrutement et l'infiltration des macrophages. Ces macrophages associés à la tumeur (TAMs) permettent l'angiogenèse tumorale par la sécrétion de multiples facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF ou les MMPs. Une fois formé, le réseau vasculaire tumoral soutient la progression tumorale et la dissémination métastatique, donnant lieu à une tumeur maligne agressive. Adapté d'après (Lin et Pollard 2007).

De plus, de façon cohérente avec l'expression de M-CSF, une augmentation des cellules mononucléées circulantes est observée au cours de la progression tumorale, et constitue un facteur de risque pour la récurrence des carcinomes hépatocellulaires après résection de la tumeur (Sasaki *et al.* 2006). Ces macrophages recrutés sur le site tumoral sont appelés macrophages associés aux tumeurs. Ils sont issus du recrutement et de la différenciation des monocytes qui arrivent sur le site tumoral par extravasation à travers la paroi endothéliale des vaisseaux sous l'influence des différents signaux chimiotactiques tumoraux (M-CSF, MCP-1, IL-3/6/8, VEGF, SDF-1, PIGF, *etc.*) (Murdoch, Giannoudis, et Lewis 2004) (**Figure 40**).

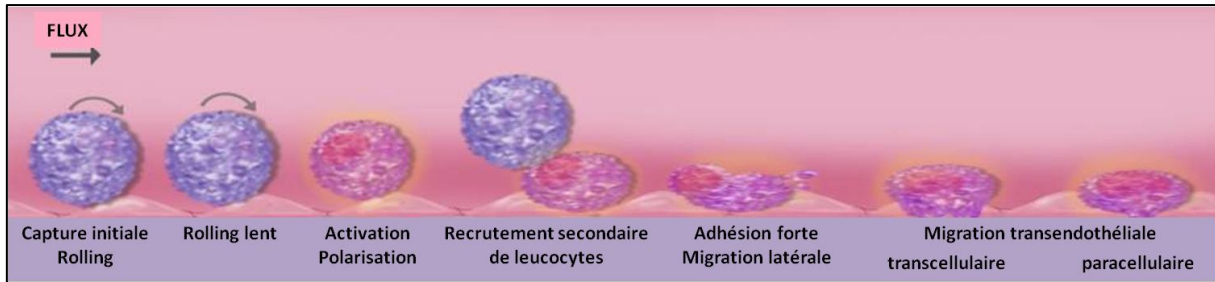


Figure 40: Recrutement de leucocytes au niveau de l'endothélium et extravasation dans les tissus.

Les leucocytes sont capturés à la surface de l'endothélium et commencent à rouler lentement via les sélectines, intégrines $\alpha 4$ ou VCAM-1. Les leucocytes s'activent suite aux interactions avec les molécules d'adhésion et interagissent avec les autres leucocytes. Les intégrines de leucocytes sont alors activées et permettent une adhésion plus forte en se fixant aux molécules ICAM-1 des cellules endothéliales. Les leucocytes migrent ensuite latéralement jusqu'à un site de transmigration où ils migrent classiquement entre les jonctions des cellules endothéliales (migration paracellulaire) ou de façon plus originale à travers la cellule endothéliale (migration transendothéliale). Adapté d'après (Wagner et Frenette 2008).

Contrairement aux macrophages des tissus sains et des tissus inflammatoires, les macrophages associés aux tumeurs perdent leurs capacités immunostimulatrices et n'exercent plus d'effets cytotoxiques sur les cellules tumorales. En effet, les macrophages M1 sont capables d'induire la mort des cellules tumorales en présentant les antigènes tumoraux aux lymphocytes T et en exprimant des cytokines immunostimulatrices qui activent la prolifération et les propriétés anti-tumorales des lymphocytes T et des NK (Elgert, Alleva, et Mullins 1998). Au contraire, du fait de l'environnement hypoxique et de la composition du microenvironnement tumoral en cytokines et chimiokines, notamment sous l'influence de facteurs tumoraux comme l'IL-4, l'IL-10, l'IL-13, le TGF- β 1 ou la PGE2 (Mantovani *et al.* 2002), les macrophages associés aux tumeurs adoptent un phénotype de type M2 anti-inflammatoire, pro-tumoral et pro-angiogénique, et sont généralement associés à la progression tumorale en facilitant l'invasion des cellules tumorales, la dissémination métastatique et l'angiogenèse dans les zones avasculaires et périnécrotiques (Lewis et Pollard 2006). Ces macrophages M2 peuvent être obtenus par différenciation *in vitro* à partir de monocytes en présence de M-CSF ou d'IL-34, et sont probablement différenciés en partie grâce au M-CSF présent sur le site tumoral (Foucher *et al.* 2013). À l'inverse des M1, les TAMs produisent généralement d'importantes quantités de facteurs pro-angiogéniques comme du VEGF-A, du FGF-2, de la MMP-9 mais aussi du TNF- α , de l'IL-6, de l'IL-8 et du MCP-1 et très peu de facteurs anti-angiogéniques comme l'IFN- γ ou l'IL-12. De plus, une sous-population de monocytes appelée TEM (TIE2-Expressing Macrophage) se différencie en un sous-groupe de macrophages associés aux tumeurs particulièrement pro-angiogéniques et uniquement observables dans les tissus néoplasiques. En effet, ces cellules expriment le récepteur TIE-2 et migrent vers l'angiopoïétine-2 sécrétée dans les zones d'angiogenèse (Venneri *et al.* 2007). La caractérisation de ces macrophages M1 et M2 par des marqueurs spécifiques reste difficile, et cette complexité est accrue par les différentes sous-populations qui existent entre l'homme et la souris. Chez la souris, les marqueurs conventionnels de macrophages M1 sont l'iNOS, le CMH de classe II et le CD86, et pour les macrophages M2 l'Arg-1, Fizz et Ym1 (Gordon et Martinez 2010). Les marqueurs

classiquement utilisés en immunohistochimie pour les modèles tumoraux murins sont le F4/80 ou IBA-1 pour les macrophages généraux, iNOS pour les M1, et Arg-1 pour les M2.

4. Importance du M-CSF dans l'ostéosarcome et rôle de sa cytokine jumelle ?

Les taux de M-CSF sont facteurs de mauvais pronostic dans de nombreux cancers, notamment dans les cancers du sein où ils sont corrélés avec l'avancée de la maladie et la présence de métastases (McDermott *et al.* 2002), et la mesure des concentrations de M-CSF est utilisée pour différencier les tumeurs bénignes des cancers du sein relativement avancés (Ławicki *et al.* 2008). Le ciblage du M-CSF par différentes approches (oligonucléotides antisens, anticorps, inhibiteurs, *etc.*) ou la déplétion macrophagique (chlodronate, *etc.*) ont démontré leur efficacité dans différents modèles pré-cliniques tumoraux. Néanmoins, peu d'études cliniques ou pré-cliniques ont été menées pour déterminer le rôle du M-CSF dans les tumeurs osseuses primitives, et en particulier dans l'ostéosarcome. Aucune donnée ne montre de corrélation entre l'expression du M-CSF et le pronostic, ou entre le niveau d'expression et la vascularisation tumorale dans la pathologie. La cytokine est exprimée par les tumeurs humaines d'ostéosarcome, ainsi que dans les différentes lignées d'ostéosarcome. Il a été montré dans des modèles d'ostéosarcomes murins que l'inhibition du M-CSF entraînait la désorganisation des matrices extracellulaires et diminuait donc de façon significative l'angiogenèse tumorale. De façon intéressante, à l'inverse des thérapies ciblant le VEGF, l'interruption du traitement anti-M-CSF ne conduit pas à une revascularisation rapide de la tumeur et à la reprise de la croissance tumorale. De plus, le maintien de l'inhibition du M-CSF n'affecte pas le réseau vasculaire et lymphatique sain (Kubota *et al.* 2009). Le ligand du M-CSFR serait le principal acteur dans la progression tumorale, puisque peu de mutations du M-CSFR conduisant à son activation constitutive ont été reportées dans les différents cancers à l'inverse des autres RTKs III (Masson et Rönstrand 2009; Liang *et al.* 2013). En effet, le M-CSF est fortement exprimé dans le microenvironnement des cancers, et son expression est corrélée positivement avec le grade de la tumeur (Richardson *et al.* 2009). Son action serait principalement indirecte par le recrutement des macrophages qui sécrètent des facteurs pro-angiogéniques, favorisant ainsi la formation de néo-vaisseaux et l'invasion tumorale. Dans l'ostéosarcome en particulier, la progression tumorale semble dépendre principalement de l'axe M-CSF/M-CSFR et non du VEGF/FLT1, et l'inactivation du récepteur au VEGF ne semble pas altérer l'angiogenèse et le recrutement des macrophages associés aux tumeurs contrairement à l'inhibition du M-CSFR (Kubota *et al.* 2009).

Par ailleurs, il a été montré que l'IL-34 induisait, comme le M-CSF, la différenciation de macrophages M2 qui favorise l'angiogenèse et donc la progression tumorale. L'implication de l'IL-34 a été démontrée dans plusieurs pathologies (Baud'Huin *et al.* 2010; Chemel *et al.* 2012; Li *et al.* 2012; Preisser *et al.* 2014), et la cytokine jumelle du M-CSF semble favoriser l'angiogenèse pa-

thologique dans la polyarthrite rhumatoïde, et par conséquent est considérée comme un facteur de mauvais pronostic (Balogh *et al.* 2013).

Le but du travail présenté dans l'article suivant a donc été d'étudier le rôle de l'IL-34 dans la pathogenèse de l'ostéosarcome, et en particulier de déterminer son impact dans l'angiogenèse et dans le recrutement des leucocytes, à la fois *in vitro* et *in vivo* dans des modèles murins d'ostéosarcome.

II. Article n°1, résultats principaux et résultats complémentaires

1. Article 1 : International Journal of Cancer (en révision)

Interleukin-34 promotes tumour progression and metastatic process in osteosarcoma through induction of angiogenesis and macrophage recruitment

Aude Ségaliny^{1,2,#}, Amel Mohammadi^{3,4,#}, Blandine Dizier^{3,4}, Anna Lokajczyk^{3,4}, Régis Brion^{1,2,5}, Rachel Lanel^{1,2}, Jérôme Amiaud^{1,2}, Céline Charrier^{1,2}, Catherine Boisson-Vidal^{3,4,*}, Dominique Heymann^{1,2,5,*}

¹INSERM, UMR 957, Equipe LIGUE Nationale Contre le Cancer 2012, Nantes 44035, France

²Université de Nantes, Nantes atlantique universités, Pathophysiology of Bone Resorption and Therapy of Primary Bone Tumours, Nantes, France

³Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France.

⁴INSERM, UMR 1140, Paris, France.

⁵CHU de Nantes, France

#AS and AM contributed equally to this work

Running title: IL-34 promotes osteosarcoma progression

***Corresponding authors:**

Prof. Dominique Heymann
INSERM UMR 957, Faculty of Medicine,
1 rue Gaston Veil,
44035 Nantes cedex, France
Phone: 33 (0) 272 641 132;
Fax: 33 (0) 240 412 860
E-mail: dominique.heyman@univ-nantes.fr

Dr. Catherine Boisson-Vidal
INSERM UMR 1140, Faculty of Pharmacy
4 av. de l'Observatoire,
75006 Paris, France.
Phone: 33 (0) 153 739 716 ;
Fax 33 (0) 144 071 772.
E-mail: catherine.boisson-vidal@parisdescartes.fr

ABSTRACT

Interleukin-34 (IL-34) was recently characterized as the M-CSF "twin" cytokine, regulating the proliferation/differentiation/survival of myeloid cells. The implication of M-CSF in oncology was initially suspected by the reduced metastatic dissemination in knock-out mice, due to angiogenesis impairment. Based on this observation, the present work studied the involvement of IL-34 in the pathogenesis of osteosarcoma. The *in vivo* effects of IL-34 were assessed on tissue vasculature and macrophage infiltration in a murine preclinical model of osteosarcoma based on a paratibial inoculation of human osteosarcoma cells overexpressing or not IL-34 or M-CSF. *In vitro* investigations using endothelial cell precursors and mature HUVEC cells were carried out to analyse the involvement of IL-34 in angiogenesis and myeloid cell adhesion. The data revealed that IL-34 overexpression was associated with the progression of osteosarcoma (tumour growth, lung metastases) and an increase of neo-angiogenesis. *In vitro* analyses demonstrated that IL-34 stimulated endothelial cell proliferation and vascular cord formation and activated specific intracellular pathways (P-FAK, P-Src, P-ERK_{1/2}). Pre-treatment of endothelial cells by chondroitinases/heparinases reduced the formation of vascular tubes and abolished the associated cell signalling. In addition, IL-34 increased the *in vivo* recruitment of M2 Tumour Associated Macrophages into the tumour tissue. IL-34 increased monocyte/CD34⁺ cell adhesion to activated HUVEC monolayers under physiological shear stress conditions. This work demonstrates that IL-34 contributes to osteosarcoma growth by increasing the neo-angiogenesis and the recruitment of M2 macrophages. By promoting new vessel formation and extravasation of immune cells, IL-34 may play a key role in tumour development and inflammatory diseases.

Key words: Interleukin-34, M-CSF, Endothelial cells, Angiogenesis, Cell adhesion, Tumour Associated Macrophages, Osteosarcoma

Novelty & Impact Statements: IL-34 is a newly-discovered cytokine sharing a common receptor with M-CSF. IL-34 is expressed by osteosarcoma cells, regulated by TNF- α and IL-1 β and is associated with an increase of osteosarcoma growth in bone site as well in the metastatic process as revealed by the higher number of lung metastases. In addition, IL-34 is a pro-angiogenic factor *in vitro* and *in vivo* and promotes the recruitment of M2 macrophages into the tumour mass. By promoting new vessel formation and extravasation of immune cells, IL-34 may play a key role in the pathogenesis of osteosarcoma and in inflammatory diseases.

INTRODUCTION

Angiogenesis and vasculogenesis are central events during embryogenesis and growth [1, 2]. They are also strongly implicated in the pathogenesis of inflammation, by promoting immune cell extravasation, and of cancer, by facilitating tumour initiation and development [3]. Numerous publications underscore the possible contribution in the biological mechanisms of the Macrophage-Colony Stimulating Factor (M-CSF), a cytokine required for the survival and differentiation of mononuclear phagocytic cell lines derived from monocytes such as macrophages and dendritic cells [4,5]. Monocytes migrate to the tumour foci attracted by the chemokines / cytokines produced by tumour cells. Once activated, macrophages are the main source of growth factors and cytokines [6]. Thus, Curry *et al.* reported that M-CSF induced the expression of VEGF from human monocytes and consequently stimulates the angiogenic process [7]. The tumour-associated macrophages (TAMs) significantly contribute to tumour growth and metastasis and are associated with poor prognosis in various forms of cancer. Indeed, they exert tropic roles and promote growth, angiogenesis and tumour cell motility [6, 8]. Based on these data, the infiltrate of mononuclear phagocytes, M-CSF, VEGF and angiogenesis are correlated with poor prognosis in various solid cancers [9, 12]

In 2008, a new cytokine named interleukin-34 (IL-34) was discovered by Lin *et al.* based on its ability to form colony-forming unit-macrophages in human bone marrow

cultures, with the same efficiency as M-CSF [13]. They demonstrated the binding of IL-34 to the M-CSF receptor (CSF-1 receptor or c-fms) expressed on human mononuclear phagocytes. More recently, Wang *et al.* reported that IL-34 was a specific driver of myeloid cell differentiation in the skin epidermis and central nervous system [14]. IL-34 also directs the differentiation of monocytes into immunosuppressive M2 similar to M-CSF [15]. In addition, we demonstrated the role of IL-34 in promoting osteoclastogenesis in which this cytokine can be a substitute for M-CSF [16]. IL-34, like M-CSF, upregulates the chemokines produced by whole blood, identifying both cytokines as key partners in inflammation [17]. The role of IL-34 was confirmed in rheumatoid arthritis where the cytokine levels were significantly higher in the synovial fluids of RA patients compared with osteoarthritis patients and were correlated with inflammation intensity measured by the leucocyte number [18]. IL-34 shares common features with M-CSF, partly explaining their functional overlaps, and can be considered with M-CSF as "twin" cytokines that are functionally related [19].

Based on the role of IL-34 in the differentiation of mononuclear phagocytes and in inflammation, the present manuscript aimed to analyse the potential involvement of IL-34 in pathogenesis of osteosarcoma. This work focused on the role of IL-34 in the neo-angiogenesis and macrophage recruitment associated with tumour development.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Recombinant Interleukin-34 (IL-34), Macrophage-Colony Stimulating Factor (M-CSF), Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α), Interleukine-1 β (IL-1 β) and basic fibroblast growth factor (FGF-2) were obtained from R&D Systems (Abingdon, UK). Growth factor-reduced Matrigel® was from Becton Dickinson (Le Pont de Claix, France). Cell culture products and other biochemical reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) unless otherwise specified.

Tissue specimens

Patient tumour biopsy specimens were col-

lected at Nantes University Hospital (Nantes, France) (Supplementary Data 1). Samples were obtained following patient informed consent, and after ethical approval by the Nantes University Hospital Ethics Committee.

Cell characterization, culture and treatment

Umbilical cord blood samples were collected from consenting mothers (n=20). The study was approved by the ethics committee of the Hôpital des Instructions et des Armées de Bégin (France) (ref. 201008043234797), and the protocol conformed to the Declaration of Helsinki. Endothelial cells from human umbilical cords (HUVECs) and endothelial colony-forming cells (ECFCs) from human umbilical cord blood were isolated, expanded and characterized as previously described [20]. The presence of Weibel-Palade bodies, combined expression of endothelial markers (CD31, KDR, Tie-2, CD144), and dual positivity for Dil-AcLDL uptake and BS-1 lectin binding confirmed the endothelial phenotype of the ECFCs thus obtained. ECFCs do not express leukomonocytic markers such as CD45 and CD14 [21]. One day before the experiments, the cells were growth-arrested for 18 h in EBM2, 3 % FCS and released from growth arrest by adding EBM2, 5 % FCS, with or without 50 ng/mL of IL-34 or 100 ng/mL M-CSF in the presence or absence of FGF-2 (5 ng/mL) at 37°C. Cells were then washed, detached with PBS-EDTA or trypsinized at 37°C, and washed twice with PBS before use. All assays were performed at least in triplicate, with cells cultured for less than 30 days. In some cases, ECFCs were pretreated for 2 h at 37°C with a cocktail of heparinase I, II and III (0.5 U/mL) and 0.2 U/ml chondroitinases A, B and C, for 1 hour at 37°C, then extensively washed with PBS before IL-34 stimulation.

***In vitro* angiogenesis assays**

To investigate the effects of IL-34 and M-CSF on ECFC adhesion, proliferation and tubular morphogenesis, ECFCs were stimulated as described above. Cell outgrowth, adhesion and *in vitro* tube formation were evaluated as previously described [20].

Monocytes and CD34⁺ cell isolation from human peripheral blood

Mononuclear cells were isolated by density-gradient centrifugation from fresh peripheral blood mononuclear cells collected from healthy donors provided by the French blood bank institute (EFS) under an agreement with Paris Descartes University (C CPSL UNT n°12/EFS/064). Monocytes were isolated with the Monocyte Isolation Kit II (MACS Miltenyi Biotec, Paris, France) by negative selection.

Shear-flow adhesion assays

Flow adhesion experiments were conducted with a parallel-plate chamber in physiological shear stress conditions as previously described [22, 23]. Briefly, calcein-labelled freshly isolated monocytes/CD34⁺ cells (3x10⁶) were perfused on activated HUVEC monolayers for 15 min at 37°C at a shear rate of 50 s⁻¹. Cell adhesion was dependent on endothelial activation and on the shear rate, as it was optimal at shear rates below 350 s⁻¹, whereas far fewer cells adhered at 500 s⁻¹. Adherent cells were visualized by phase-contrast microscopy. All experiments were observed in real-time and videotaped for offline analysis. Fluorescence micrographs of 40 random microscopic fields (obj. x10, 1 cm²) were collected with Replay software (Microvision Instruments, France). Data were expressed as the number of adherent cells per field. The results of 4 different experiments were pooled for each study. The pattern of adhesion at 50 sec⁻¹ was also analyzed to determine the number of tethering cells and adherent cells (immediate full arrest). Adherent monocytes were tested for resistance to detachment from the modelled endothelium by increasing the flow rate from 50 to 5000 s⁻¹ over 1 minute, and by counting the number of remaining adherent cells at one-minute intervals.

Murine Matrigel® plug assay

Animal care conformed to French guidelines (Services Vétérinaires de la Santé et de la Production Animale, Ministère de l'Agriculture, Paris France) and experiments were in agreement with the guidelines of the University Paris-Descartes Institutional Animal Care and Use Committee (C75.06.02). Ice-cold Matrigel® (BD, 8 mg/ml) was mixed with phosphate-buffered saline (PBS) plus FGF2 (350 ng/ml) alone or supplemented with 500

ng/ml of IL34 or M-CSF, then injected subcutaneously into male C57BL/6J mice (8 weeks old, from Elevages Janvier, France). The Matrigel® plugs were recovered 14 days later. Haemoglobin content was measured with Drabkin's reagent (Sigma). Functional vessels were identified by light microscopy as vessels containing red blood cells.

Western Blot Analysis

ECFCs or HUVECs treated with 200 ng/mL of IL-34 or M-CSF for 1 to 15 min. The proteins obtained from the cell lysates were separated by SDS-PAGE and transferred to Immobilon-P for Western blot. The membranes were blotted with the antibodies (1/1000) anti-pFAK (Tyr925), anti-pAkt (Ser473), anti-pSrc (Tyr416), anti-p38 (Thr180/Tyr182), anti-pERK 1/2 (Thr202/Tyr204), or with antibodies against the total forms of protein above (Cell Signalling, Danvers, MA, USA). The membrane was probed with the secondary antibody (1/10000) coupled to horseradish peroxidase. Antibody binding was then visualized with an ECL kit (Pierce Protein Biology Products, Thermo Scientific Rockford, USA). The luminescence detected with a Charge Couple Device (CCD) camera was quantified using the GeneTools programme (Syngene, Cambridge, United Kingdom).

Lentivirus production and osteosarcoma cell transduction

Vector pEZ-Lv105 (GeneCopoeia, Rockville, USA) containing either the human IL-34 gene (Accession Number BC029804) or the human M-CSF gene (Accession number NM_000757) were used to produce lentiviral particles. The pEZ-Lv105-eGFP (GeneCopoeia) was used as a control. Lentivirus were produced using packaging vectors as described by Dull *et al.*²⁴ Briefly, 6×10^6 HEK293FT cells (human embryonic kidney cells optimized for viral production) were seeded and transfected 24 h later with 3 µg of each packaging plasmid (pLP-1, pLP-2 and pLP-VSV-G) and 9 µg of the transgene of interest (pEZ-Lv105-eGFP, pEZ-Lv105-M-CSF or pEZ-Lv105-IL-34); virus-containing supernatants were collected 48 h post-transfection and concentrated 60-fold by ultrafiltration. For titration, serial dilutions of virus containing supernatants were tested on HEK293FT cells that were analyzed for EGFP expression 4 days post-infection by flow cytometry (FACSCalibur

Flow cytometer, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). The titres obtained were between 10×10^6 and 10×10^7 viral particles/µL. Human osteosarcoma KHOS/NP (HOS), U2OS, Saos2 and MG63 cells purchased from the ATCC (USA) were cultured in DMEM (Lonza, Belgium) supplemented with 5% of Foetal Bovine Serum (FBS; Hyclone Perbio, France). To generate stably modified HOS cell lines, 2×10^4 HOS cells were seeded in a 24-well plate in 300 µl medium and infected with a multiplicity of infection of 10 particles/cell. After transduction, the cells expressing the transgene were selected at confluence with 2 µg/mL puromycin (Sigma, France) to obtain a stable population. The eGFP, M-CSF and IL-34 expression levels were controlled by flow cytometry analysis for eGFP and IL-34 (R&D), ELISA for M-CSF (R&D) and also RT-qPCR (Supplementary Data 1A,B).

RNA isolation and real-time PCR

Total RNA was extracted using NucleoSpin®RNAII (Macherey Nagel, Duren, Germany) with one stage of DNase I treatment (25 units, 15 min) to prevent genomic contamination. 1 µg of total RNA was used for first strand cDNA synthesis using the ThermoScript RT-PCR System (Invitrogen). Real-time PCR was performed on 20 ng of reverse transcribed total RNA (cDNA), 300 nM of primers and 2x SYBR Green Supermix (Biorad, Marnes-la-Coquette, France). Quantitative PCRs (qPCR) were carried out on a Bio-Rad CFX™ System (Biorad). Analyses were performed using human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) or human hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1 (HPRT1) as invariant controls. The sense and antisense primers used are as follow: human HPRT1 (forward: TGACCTTGATTATTATTTGCATAC C, reverse: CGAGCAAGACGTTCACTCCT); human GAPDH (forward: TGGGTGTGA ACCATGA-GAAGTATG, reverse: GGTGC AG-GAGGCATTGCT); human IL-34 (forward: AATCCGTGTTGTCCCTCTTG, reverse: CAGCAGGAGCAGTACAGCAG); human M-CSF (forward: GTTGTAGACCAGGAACAGTTGAA, reverse CGCATGGTGTCTCCATTAT).

Confocal microscopy

Osteosarcoma cells were cultured in a plastic chamber on microscope glass slides (Millicell EZ Slide, Millipore, Billerica, MA, USA) were stimulated or not with 10 ng/mL of TNF- α or IL-1 β for 24 h. The cells were then washed in PBS, fixed in 4% paraformaldehyde for 10 min at room temperature, permeabilized with triton X-100 0.1% for 20 min and incubated with a blocking solution [BSA 1% with 1% of non-immune goat serum (Dako, Les Ulis, France) and 0.05% triton] for 30 min at room temperature. The cells were incubated with either the primary antibody against IL-34 (Diaclone, INSERM UMR 957) or the blocking solution as the negative control for 90 min at 37°C. After washings, Alexa Fluor 488 secondary antibody (1/200) was added for 90 min at room temperature. Actin filaments were stained using 546-conjugated phalloidin (1/300) and nuclei stained with DAPI (1/5000).

Osteosarcoma mouse model

The mice (Elevages Janvier, Le Genest Saint Isle, France) were housed in pathogen-free conditions at the Experimental Therapy Unit (Faculty of Medicine, Nantes) in accordance with the institutional guidelines of the French Ethical Committee (CEEA PdL 06 ethical committee, authorization number: 1280.01) and under the supervision of the authorized investigators. Five-week-old female Rj:NMRI-nude mice (n=8 per group) were anaesthetized by inhalation of an isoflurane/air mixture (2%, 1L/min) before i.m. inoculation of 1.5×10^6 human HOS osteosarcoma cells over-expressing M-CSF, IL-34 or transduced by the empty vector. Osteosarcoma cells were injected in close proximity to the tibia, rapidly leading to tumour growth in the soft tissue with secondary contiguous bone invasion [25]. Tumours appeared at the injection site 8 days later and their volumes were calculated for 27 days by measuring two perpendicular diameters using calipers, according to the following formula: $V = 0.5 \times L \times (S)^2$, in which L and S are, re-

spectively, the largest and the smallest perpendicular diameters as previously described [25]. To determine the effect of IL-34 in the formation of lung metastases, mice were sacrificed by cervical dislocation at an equivalent volume of 1500 mm³. Lung metastases were macroscopically and manually scored in each animal. The overexpression of M-CSF or IL-34 in explanted tumour tissues established from inoculation of M-CSF- or IL-34-transduced HOS osteosarcoma cells was validated by RT-qPCR (Supplementary Data 1C).

Immunohistochemistry

After euthanasia, tumour samples were preserved and fixed in 10% of PFA, decalcified with 4.13% of EDTA, and 0.2% of PFA in PBS using a microwave tissue processor (KOS, Mikron Instruments, USA) for 4 days and embedded in paraffin. Three micrometer sections were then stained for mouse CD146 (Abcam, 1/200), mouse CD31 (Abcam, 1/100) [25], mouse ionized calcium-binding adapter molecule 1 (IBA-1, Abcam, 1/700) or mouse arginase-1, (BD Biosciences, 1/500). IL-34 was detected as previously described by Chemel et al [18]. Images were automatically numerized (nanozoomer, Hamamatsu photonics) before quantification. The negative control was analysed using a similar procedure, excluding the primary antibody and using a normal rabbit-irrelevant IgG at 1/100 (R&D Systems). The image analysis was performed on the whole tumour sections with FIJI (ImageJ), the region of interest (R.O.I.) excluding necrotic tissue and the skeletal muscle. The percentage of CD146, IBA-1 or Arg-1 positive cell surfaces was quantified after a DAB colour deconvolution function, using the pixel density of the red staining, and reported to the R.O.I. selected. Graphs were plotted and CD146, IBA-1 or Arg-1 signal was denoted as a percentage compared to the control group.

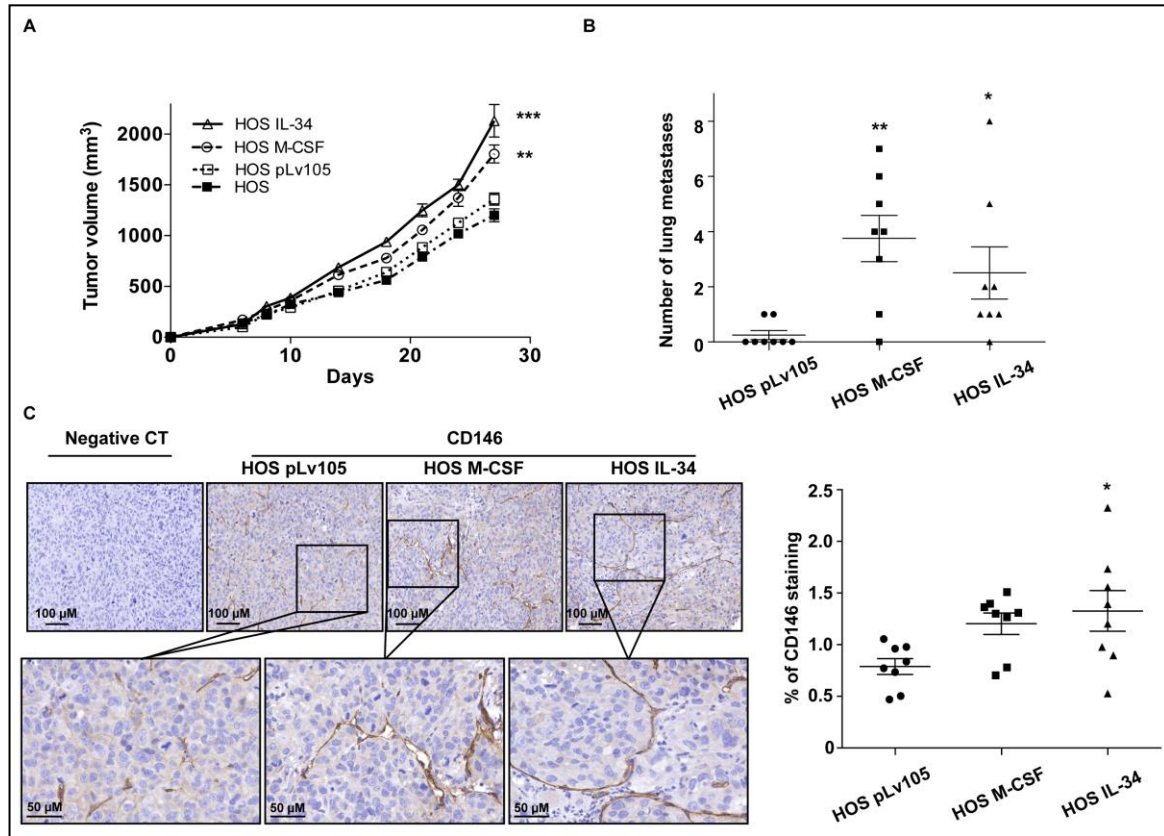


Figure 1: IL-34 promotes osteosarcoma growth, increases the number of lung metastases and the tumour vasculature in a mouse osteosarcoma model. Human HOS osteosarcoma cells overexpressing IL-34 (HOS-IL34), M-CSF (HOS-M-CSF), transduced by the empty vector (HOS) were inoculated in close proximity to the tibia of female Rj;NMRI-nude mice (n=8 per group). (A) Follow-up of tumour volume for 27 days. (B) All mice were sacrificed by cervical dislocation at an equivalent volume of 1500 mm³ and the number of macroscopic lung metastases were scored manually. (C) immunohistochemical assessment of CD146 was carried out (Right panel), and the percentage of CD146 positive vessel area was reported to the region of interest (R.O.I.) determined by ImageJ software (Left panel). *p < 0.05 compared to the control HOS group.

Statistical analysis

Differences between *in vitro* experimental conditions were assessed with Student's t test or one-way ANOVA followed by the Mann-Whitney test, depending on the normality of their distribution. *In vivo* results were analyzed using a non-parametric one-way analysis of variance followed by a Dunn's *post-hoc* test using GraphPad InStat v3.02 software. The results are given as a mean ± SEM of at least three independent experiments. Results were considered significant at p values ≤ 0.05.

RESULTS

IL-34 is expressed by osteosarcoma cells, promotes osteosarcoma progression and increases the establishment of lung metastases

The expression of IL-34 was first analysed by qPCR in 12 biopsies of human osteosar-

comas (Supplementary Data 2A). The results clearly demonstrated that all osteosarcoma tissues expressed IL-34 (Supplementary Data 2B) with apparent heterogeneous expression levels. In addition, our data were validated in a cohort of 27 osteosarcoma biopsies described by Dr Yamada from the National Cancer Center of Tokyo [26] (GEO Series GSE14827) in which all osteosarcoma samples expressed IL-34 (Supplementary Data 2C, D). The expression of IL-34 was next assessed in 4 human osteosarcoma cell lines (HOS, U2OS, SaoS2, MG63) and was demonstrated in all cell lines studied (Supplementary Data 2B). We next assessed the expression of IL-34 by various osteosarcoma cells *in vitro* and its regulation by TNF-α and IL-1β. IL-34 messenger RNA was detectable in non-stimulated cells. Stimulation with TNF-α and IL-1β resulted in a significant dose-dependent induction of IL-34 mRNA (Supplementary Data 3A). Confocal microscopy

analyses confirmed that TNF- α and IL-1 β up-regulated the expression of IL-34 by osteosarcoma cells at the protein level compared to untreated cells (Supplementary Data 3B). IL-34 expression was then analyzed by immunohistochemistry in human osteosarcoma biopsies. In all samples studied, most of osteosarcoma cells exhibited a positive nuclear and/or cytoplasmic immunostaining for IL-34 (Supplementary data 4A-D). As previously observed for giant cell tumours of bone, multinucleated cells also expressed IL-34 staining (Supplementary Data 4A) [16] in contrast to osteocytes which were negative (Supplementary Data 4B).

To determine the potential role of IL-34 in the pathogenesis of osteosarcoma, human HOS osteosarcoma cell line expressing a very low level of IL-34 (Supplementary Data 2B), was genetically modified to overexpress the corresponding cytokine. The volume of the tumours induced in Nude mice by the different cell line generated was then compared (Figure 1A). IL-34 overexpression increased significantly the tumour progression compared to the control groups (non transduced cells and HOS cells transduced with an empty vector) ($p < 0.001$). Indeed, the mean tumour size of established tumours from IL-34-overexpressing HOS cells (2131 +/- 392 mm³) was 57% higher compared to control group (1359 +/- 146 mm³ for the empty vector transduced HOS cells (Figure 1A).

Similarly, the progression of the tumours induced by M-CSF-transduced HOS cells was significantly upmodulated compared to the control groups (at day 27, tumour volumes: 1805 +/- 218 mm³ for the M-CSF group, compared to 1201 +/- 180 mm³ for the non transduced control group, $p < 0.01$) (Figure 1A). Because osteosarcoma cells exhibit a high ability to induce lung metastases, we compared the number of lung metastases formed with the different cell lines generated (Figure 1B). Interestingly, at an equivalent volume of primary tumours (1500 mm³), the number of lung metastases formed in groups overexpressing IL-34 and M-CSF were significantly higher than in the control groups ($p < 0.05$ and $p < 0.001$ respectively) (Figure 1B). Overall, these data reveal that IL-34 and M-CSF promote osteosarcoma development and facilitate the lung metastatic process.

IL-34 upmodulates the formation of neo-vessels in HOS mouse osteosarcoma

To examine the mechanisms underlying the effect of IL-34 and M-CSF on tumour progression, histopathological investigations were carried out on the tumour tissues. At the endpoint of the experiment (tumour size: 1500 mm³), CD146⁺ vessels into the tumour mass were assessed by immunohistochemistry (Figure 1C). The density of neo-vessels was significantly increased in tumours overexpressing IL-34 compared to the control group (Figure 1C, $p < 0.05$). CD31 showed similar patterns of expression strengthening the pro-angiogenic effect of IL-34 (Supplementary Data 2). M-CSF over-expressing HOS cells exhibited a slight but not significant increase in the CD146⁺ and CD31⁺ vessels (Figure 1C, Supplementary Data 2). To confirm the pro-angiogenic effect of IL-34 *in vivo*, we used an *in vivo* Matrigel® plug assay, a non tumour model. As shown in Supplementary Data 3, plugs from the PBS control group and plugs containing M-CSF alone were mostly translucent and pale, indicating little or no vessel formation after two weeks. In contrast, plugs containing FGF-2 and IL-34 alone were redder, indicating the very early stages of a vasculature. However, plugs containing IL-34 and FGF-2 together had a modest non-stimulatory effect on angiogenesis compared to FGF-2 alone. IL-34 alone was able to recruit endothelial cells to form vascular structures within the Matrigel® plugs. In addition, plugs treated concurrently with FGF-2 and M-CSF had an intense red colour, indicating the presence of abundant new capillary vasculature formation. An analysis of haemoglobin content confirmed that FGF-2 and M-CSF together enhanced neo-angiogenesis compared to M-CSF alone (Supplementary Data 3). Thus, M-CSF appeared to enhance the FGF-2-induced recruitment of circulating cells, suggesting a synergistic effect on angiogenesis *in vivo*. These data demonstrate that IL-34 is a pro-angiogenic factor *in vivo* and suggest its implication in tumour development.

IL-34 induces tubular morphogenesis of ECFCs in Matrigel® and its activity depends on cell surface glycoaminoglycans

We next explored *in vitro* the mechanistic effect of IL-34 in endothelial cells. We first focused our work on ECFCs because this cell

type is currently proposed as the cell type at the origin of newly-formed vessels. Proliferation was examined by measuring cell phosphatase activity based on the release of pNPP measured after 48 h of incubation in basal medium (EBM2, 5% FCS) containing IL-34 or M-CSF.

M-CSF, remaining as individual cells or small aggregates (Figure 2D). In contrast, 18h after seeding, pretreatment with FGF-2 promoted ECFC organization into branched structures and pseudotubes with enclosed areas ($p < 0.01$) (Figure 2E).

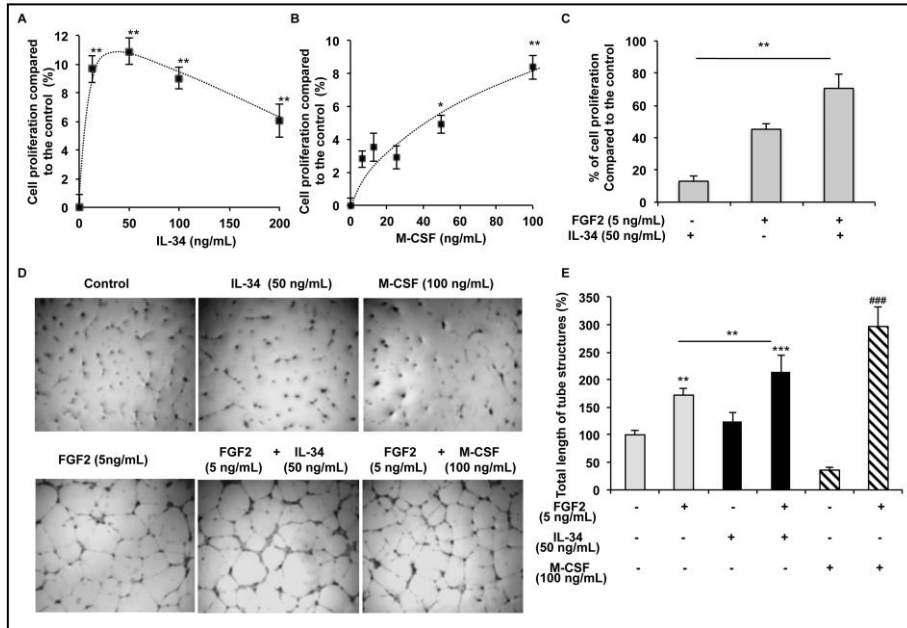


Figure 2: IL-34 and M-CSF mediates the proliferation of endothelial colony-forming cells (ECFCs) and the tubule formation. (A-B) IL-34 and M-CSF induce ECFC proliferation in a dose-dependent manner after 48h of incubation. (C) IL-34 induces additive effect in the presence of FGF-2 after 24h of culture. (D-E) After 24h of culture in basal medium, in the presence or absence of 50 ng/mL IL34 and 100 ng/mL M-CSF, ECFCs were immediately seeded on Matrigel® in growth factor-depleted basal medium. After 18h of culture the cells were fixed and stained with Giemsa. IL-34 and M-CSF induce tubular morphogenesis by ECFCs cultured in Matrigel®. (D) Light-micrographs showing the typical appearance of tubules formed by control and pretreated ECFCs in Matrigel® (original magnification: x4). (E) Comparison of the mean (\pm SEM) total length of tubules (% of control ECFCs) formed in 4 independent experiments. Results are normalized to untreated ECFCs * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$, ### $p < 0.001$ vs FGF2-stimulated ECFCs.

IL-34 clearly demonstrated a bell-shaped response curve with optimum proliferation occurring at 50 ng/mL ($p < 0.01$) and an inhibitory activity at high doses (Figure 2A) whereas M-CSF enhanced ECFC proliferation in a concentration-dependent manner, starting at 6 ng/mL after 48h of incubation (Figure 2B). IL-34 acts in synergy with FGF-2 to enhance cell proliferation ($p < 0.01$ versus FGF-2 alone, Figure 2C).

ECFCs were incubated overnight in starvation medium then stimulated for 24h with IL-34 or M-CSF in basal medium, with or without FGF-2 before seeding on Matrigel® for 18h. Without FGF-2 pretreatment, ECFC did not form any tubular structures, even in the presence of 50 ng/mL IL-34 and 100 ng/mL

The tubular network was significantly more extensive in the presence of 50 ng/mL IL-34 ($p < 0.001$) or 100 ng/mL M-CSF ($p < 0.001$), inferring enhanced differentiation (1.3- and 1.8-fold respectively).

This effect is correlated with the activation of signalling pathways in ECFCs and in HUVECs (Figure 3, Supplementary Data 7). In ECFCs, IL-34 rapidly induced the phosphorylation of FAK, Src and ERK1/2 compared to the non-treated cells, in contrast to Akt phosphorylation, which was slightly reduced after 15 minutes of treatment (Figure 3A, Supplementary Data 7). Similarly, IL-34 induced a very rapid increase of Src and FAK phosphorylation in HUVECs, in contrast to ERK1/2, which was slightly activated and to

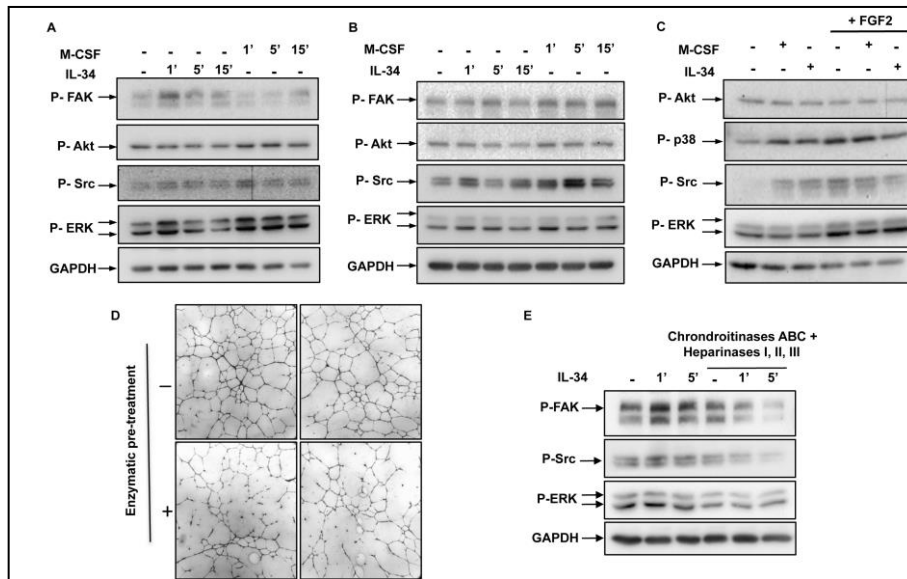


Figure 3: The cell signalling induced by IL-34 in endothelial cells depends on cell surface glycosaminoglycans.

Human ECFCs (A) and HUVECs (B-C) were treated with 200 ng/mL of IL-34 or M-CSF in the presence or absence of 5 ng/mL FGF-2 for 1 to 15 minutes. FAK, Akt, Src, ERK1/2 and p38 phosphorylations were analyzed by Western blot compared to the levels of GAPDH. (D) ECFCs were pretreated for 2 h at 37°C with a mixture of 0.5 U/mL heparinase I, II and III, and 0.2 U/ml chondroitinases A, B, and C, for 30 min before 50 ng/mL IL-34 stimulation. ECFCs were then seeded on Matrigel® in growth factor-depleted basal medium. After 18h of culture the cells were fixed and stained with Giemsa. Light-micrographs show the typical appearance of tubules formed by IL-34 pretreated ECFCs in Matrigel®, markedly reduced after enzymatic treatment (original magnification: x4). (E) Same enzymatic treatment as described above abolishes the IL-34-induced signalling pathways in HUVECs.

Akt phosphorylation which decreased after 15 minutes of treatment (Figure 3B, Supplementary Data 7). In addition, after 10 minutes of treatment, IL-34 induced the phosphorylation of p38 in HUVECs (Figure 3C, Supplementary Data 7). In both cell types, M-CSF induced the phosphorylation of Src, FAK and ERK1/2 and did not modulate Akt phosphorylation (Figures 2A, B). As expected, FGF-2 markedly increased the phosphorylations of p38, ERK1/2 and Src that are not altered in the presence of M-CSF (Figure 3C). P-38 and P-Src induced by FGF-2 were decreased by addition of IL-34 (Figure 3C). We analysed by RT-qPCR the expression of M-CSFR, the main IL-34 receptors, in the endothelial cells studied (data not shown). Because M-CSFR was not expressed by endothelial cells (data not shown) and that glycosaminoglycans are strongly involved in the biology of endothelial cells, we investigated their involvement in IL-34-induced angiogenesis (Figures 3D, 3E). The pretreatment of HUVECs by a cocktail of enzymes composed by chondroitinases and heparinases resulted in a disorganization of branched structures and pseudotubes formed in Matrigel® (Figure 3D). In addition,

the abrasion of glycosaminoglycans resulted in impaired IL-34 signalling in HUVECs (Figure 3E). Overall, these data strengthen the implication of glycosaminoglycans in IL-34-induced angiogenesis.

IL-34 promotes the recruitment of M2 TAM in osteosarcoma

Given the involvement of IL-34 in osteosarcoma tumour growth and its ability to induce, *in vitro*, the differentiation of human monocytes into immunosuppressive macrophages [15], we investigated by immunohistochemistry the populations of osteosarcoma-associated macrophages. As shown in Figure 4, HOS osteosarcoma was moderately infiltrated by macrophages revealed by IBA-1 staining. Interestingly, IL-34-overexpressing tumours exhibit a three fold increase of the IBA-1 positive TAM compared to the control group (Figure 4A, $p < 0.01$) whereas M-CSF-overexpressing tumours showed a slight but non significant increase of TAM number. We then investigated the infiltration of M2 macrophages by arginase-1 expression (Figure 4B). The number of Arginase-1 macrophages was markedly increased in the tumour tissue formed by IL-34-

and M-CSF-transduced cells compared to the control group [a 5- ($p < 0.05$) and 6- ($p < 0.01$) fold increase for M-CSF and IL-34 respectively compared to the empty vector HOS cells, Figure 4B]. These data demonstrate that IL-34 promotes the recruitment of M2 macrophages in osteosarcoma.

versus 100% control after 10 min; $p < 0.05$), an effect similar to that observed with SDF-1 pre-treatment [22].

IL-34 pre-treatment increased the rate of cell tethering to the activated modelled endothelium by about 50% at a shear rate of 50 sec^{-1} (Figure 5C).

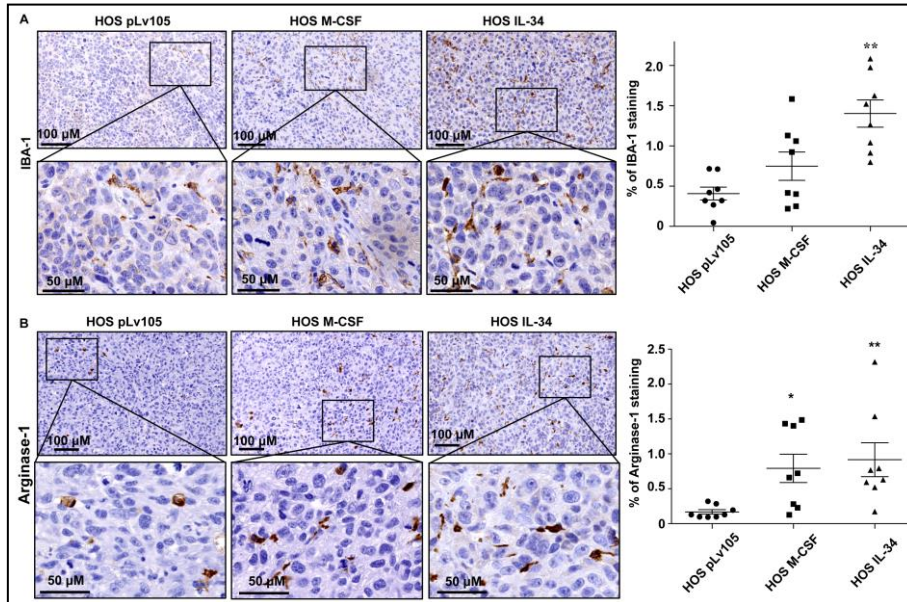


Figure 4: IL-34 increases the recruitment of TAM and their differentiation toward M2 phenotype. Human HOS osteosarcoma cells overexpressing IL-34 (HOS-IL34), M-CSF (HOS-M-CSF) or transduced by the empty vector (HOS pLv105) were inoculated in close proximity to the tibia of female Rj:NMRI-nude mice ($n=8$ per group). All mice were sacrificed by cervical dislocation at an equivalent volume of 1500 mm^3 and immunohistochemical assessment of IBA-1 and Arginase-1 was carried out. (A) Total IBA-1⁺ macrophages infiltrate into the tumor mass. (B) M2 Arginase-1⁺ macrophage infiltrate in the tumours. The percentage of IBA-1 and Arginase-1 positive staining area was reported to the region of interest (R.O.I.) determined by ImageJ software (B). * $p < 0.05$ compared to the control HOS group.

IL-34 pre-conditioning promotes monocyte/CD34⁺ adhesion to activated HUVEC monolayers under physiological shear stress conditions

We next investigated whether IL-34 had a direct effect on monocyte adhesion to the endothelium, under physiological flow conditions. Freshly isolated monocytes were stimulated for 30 min with 50 ng/mL in medium supplemented with 5% FCS, prior to adhesion. We used a flow-based adhesion assay using HUVEC monolayers to investigate the binding of cytokine-stimulated monocytes to an activated endothelium. The experimental conditions mimicked the shear forces encountered by cells adhering to vascular endothelial cells *in vivo*. As shown in Figures 5A-B, incubation of monocytes with recombinant IL-34 significantly increased the percentage of adherent monocytes (163%

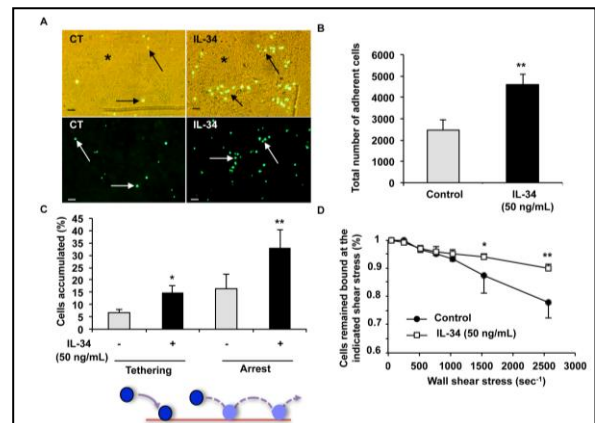


Figure 5: IL-34 significantly increases the adherence of monocytes to activated-endothelium under shear stress conditions. Before flow perfusion, freshly isolated mononuclear cells were incubated for 30 min in RPMI 1640, 10% FCS, supplemented or not with 50 ng/mL IL-34, labelled with calcein and then perfused over a confluent HUVEC monolayer previously activated at a shear rate of 50 s^{-1} according to the procedure described in Zemani *et al.*²². (A, B) Adhesion of treated mononuclear cells to HUVEC monolayer. Arrow: calcein-labelled mononuclear cells adherent to the HUVEC monolayer.

(C) Fractions of adherent and tethering cells in each experimental group. (D) Differential adherence between IL-34-treated monocytes and control cells at shear rates up to 2500 s⁻¹. Values are mean ± SEM of seven determinations. * p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 compared to the untreated control group. In addition, IL-34-stimulated monocytes adhered more strongly and were more resistant to washing than control untreated cells, at shear rates up to 2500 s⁻¹ (Figure 5D). A similar experiment was carried out on CD34⁺ cells and the results were compared to those of monocytes. IL-34 treatment of CD34⁺ cells resulted in a further 2-fold increase in cell adhesion similarly to monocytes (p<0.001, Figures 6A-B) (Supplementary Video 1, Supplementary Video 2).

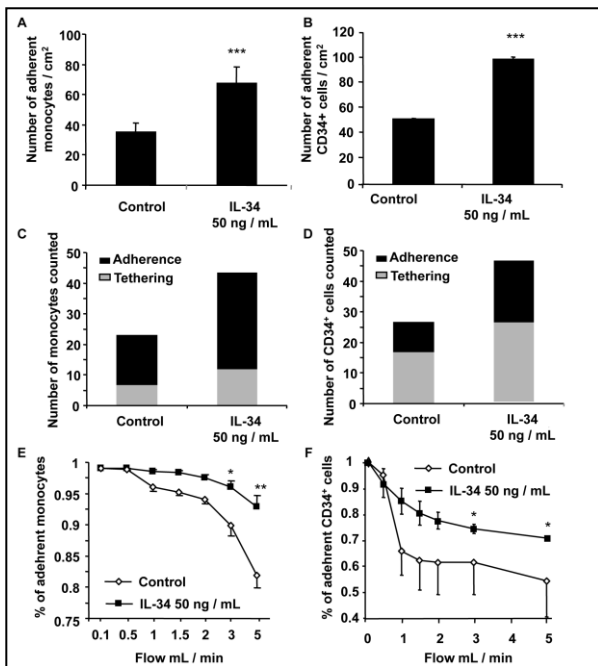


Figure 6: IL-34 significantly increases the adherence of CD34⁺ cells to activated-endothelium. CD34⁺ cells were incubated as described in Figure 5 and the results were compared to those of monocytes. IL-34 treatment of CD34⁺ cells resulted in a further 2-fold increase in cell adhesion on activated HUVECs, similar to monocytes (A-B). The effects on CD34⁺ stem cell tethering were comparable to those observed with monocytes (C-D). However, the resistance to detachment of IL-34-treated CD34⁺ cells was lower than with monocytes in the same experimental conditions (E-F). * p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 compared to the control group.

The effect on CD34⁺ stem cell tethering was comparable to that observed with monocytes (Figure 6C-D). However, the resistance to detachment of IL-34-treated CD34⁺ cells was lower than with monocytes in the same experimental conditions (Figures 6E-F) (Supplementary Video 3)

DISCUSSION

Inflammation is a key biological process enabling the tissues to develop a host de-

fense mechanism to injury, infectious agents, cancers or immune dysregulation. It is now recognized that endothelial cells play a central role in these mechanisms [27]. The inflammatory environment is effectively characterized by an enrichment of immune cells (neutrophils, eosinophils, mast cells, NK cells, macrophages, dendritic cells and lymphocytes) that promote angiogenesis by releasing pro-angiogenic factors and by remodeling the extracellular matrix, allowing blood vessel formation [28]. In return, endothelial cells from neo-vessels increase the inflammation by recruiting immune cells locally, facilitate their extravasation and macrophage polarization [29]. In addition, the hypoxia environment exacerbates this phenomenon [30].

The present data demonstrated that osteosarcoma cells express IL-34. Osteosarcoma cells originate from a mesenchymal stem cell committed toward osteoblastic differentiation [31]. Previous works showed that IL-34 was produced in bone marrow [32] and in osteoblasts [33] and that expression was increased by inflammatory cytokines such as TNF- α and IL-1 β [18, 33]. Similarly, TNF- α and IL-1 β upmodulated the expression of IL-34 in osteosarcoma cell lines. It is admitted that an inflammatory environment is established during the tumour development. In this context, the IL-34 production by osteosarcoma cells (as shown in human biopsies) would facilitate the formation of blood vessels and the macrophage infiltration by modifying the tumour microenvironment. Indeed, IL-34 exerts pro-angiogenic function both *in vitro* and *in vivo* and for the first time that IL-34 can regulate the proliferation of endothelial colony-forming cells. Our data are in then agreement with those published by Emese *et al.* revealing a potential role of IL-34 in angiogenesis associated to inflammatory arthritis [34]. The indirect role of M-CSF in angiogenesis has already been reported by its ability to recruit mononuclear phagocytes that increase VEGF levels [7] or by the induction of systemic VEGF from skeletal muscles [35]. Based on the present data, and similar to M-CSF, IL-34 exhibits direct effects on endothelial cells. IL-34 effectively activates the signalling pathway in endothelial cells, and controls their proliferation and the formation of pseudotubes *in vitro* and in Matrigel® plugs *in vivo*. In addition, the pro-

angiogenic activity of IL-34 required the presence of glycosaminoglycans. Heparan sulfate and chondroitin sulfate influence multiple cellular properties such as proliferation, differentiation, migration and angiogenesis, most often by regulating the biological activities of cytokine/growth factors [36-38]. While the effects observed are independent of the autocrine SDF-1 (data not shown), IL-34 may modulate angiogenesis by stimulating the secretion of VEGF, IP-10, MCP-1 or IL-8 (data not shown), data in agreement with those published by Eda *et al.* [17]. Recently, Nandi *et al.* identified the receptor-type protein-tyrosine phosphatase ζ (PTP- ζ) as a novel IL-34 receptor [39]. PTP- ζ is in fact predominantly expressed as a chondroitin sulfate proteoglycan and is highly abundant in the brain. In addition, PTP- ζ is expressed by endothelial cells and regulates endothelial cell migration by a strong interaction with $\alpha_v\beta_3$ [40]. Overall, these data established a direct effect of IL-34 in endothelial cells through its binding to cell membrane-associated glycosaminoglycans. This binding may explain in part the therapeutic benefit of glycosaminoglycans in the treatment against synovial inflammation in arthritis [41].

IL-34, like M-CSF, plays a part in the inflammatory process by the control of macrophage survival, migration and polarization [13, 14, 16, 18]. IL-34 drives *in vitro* the polarization of macrophages towards an immunosuppressive phenotype and function [15], data in agreement with our present *in vivo* observations. Numerous reports have described the accumulation of TAMs in tumour mass during their development. TAM density is associated with poor prognosis and release of trophic factors for tumour cells and angiogenesis. Consequently, TAMs facilitate the metastatic process [42]. In osteosarcoma, Buddingh *et al.* demonstrated that macrophages in osteosarcoma have both M1 and M2 characteristics. In addition, these authors observed an interesting relationship between CD14+/CD163+ M2 macrophage and angiogenesis [43]. Our results are in agreement with these data and strengthen the involvement of IL-34 in the inflammation associated with cancer development. Indeed, IL-34 promotes the adhesion of mononuclear phagocytes (monocyte/CD34+) to activated endothelial cells under physiologi-

cal shear stress conditions. IL-34 may maintain the cancer inflammatory process by facilitating the extravasation of mononuclear phagocytes and may orientate the polarization of these cells toward an M2 phenotype. The phenomenon would be completed by the pro-angiogenic effect of IL-34 related to the M2 macrophage polarization and/or recruitment that increases the tumour vasculature as shown *in vivo* in the osteosarcoma model. Tumour growth and metastatic dissemination are significantly reduced in mice bearing an inactivation of the Macrophage-Colony Stimulating Factor (M-CSF) gene, due to angiogenesis impairment [44]. Similarly, DeNardo *et al.* provide evidence that the response to chemotherapeutic agents is partly controlled by the invaded mononuclear phagocytes [45]. In their work, chemotherapy induces mammary epithelial cells to produce pro-monocyte/macrophage factors such as M-CSF and IL-34 which enhance TAM infiltration. Interestingly, an antagonist inhibitor of the M-CSF receptor abolished M-CSF and IL-34 activities and improved the survival of animal-bearing tumours (reduced initial tumour development and lung metastases).

In conclusion, our results identify IL-34 as a novel cytokine promoting osteosarcoma progression by increasing the tissue vasculature, by stimulating the recruitment of macrophages and their differentiation toward M2 phenotype. Consequently, IL-34 appears as a pro-metastatic regulator in osteosarcoma. By regulating mononuclear phagocyte adhesion to the endothelium, angiogenesis and macrophage recruitment, our data suggest also that IL-34 may play also a major role in inflammatory diseases. Targeting the M-CSF/IL-34/M-CSFR triad represents promising therapeutic approaches in oncology and autoimmune disorders.

Acknowledgements: Aude Ségally received a PhD fellowship from the Region des Pays de la Loire. We thank Prof. Virginie Ferré from the virology department of the Nantes University Hospital (Nantes, France) for the access to the L3 laboratory to make our lentivirus production. We are also very grateful to Dr Valérie Trichet (UMR957, Nantes) for her advices concerning the lentivirus production, Prof François Guin (UMR957, Nantes) for human osteosarcoma samples and Dr

Marie-Françoise Heymann (UMR957, Nantes) for the histopathologic investigations. We thank V. Nivet-Antoine, I. Dubail and the technicians from the IMTCE animal facilities (Paris Descartes University) as well as the staff of the Paris Descartes University imaging platform (B. Saubaméa, V. Mignon, R. Lai-Kuen). We are also indebted to the nursing services of Hôpital des Diaconesses (Paris) for providing umbilical cord blood samples. This study was supported by the Region des Pays de la Loire (CIMATH research project) and by the Ligue Nationale Contre le Cancer (Equipe LIGUE 2012). CNRS pays the salary of C Boisson-Vidal. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Conflict of interest: The authors have declared that no competing interests exist.

REFERENCES

- Adams RH, Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;**8**:464-478.
- Marcelo KL, Goldie LC, Hirschi KK. *Circ Res* 2013;**112**:1272-1287.
- Cao Z, Bao M, Miele L, Sarkar FH, Wang Z, Zhou Q. Tumour vasculogenic mimicry is associated with poor prognosis of human cancer patients: a systemic review and meta-analysis. *Eur J Cancer* 2013;**49**:3914-3923.
- Pixley FJ, Stanley ER. CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action. *Trends Cell Biol* 2004;**14**:628-638.
- Chitu V, Stanley ER. Colony-stimulating factor-1 in immunity and inflammation. *Curr Opin Immunol* 2006;**18**:39-48.
- Lin EY, Pollard JW. Role of infiltrated leucocytes in tumor growth and spread. *Br J Cancer* 2004;**90**:2053-2058.
- Curry JM, Eubank TD, Roberts RD, Wang Y, Pore N, Maity A, Marsh CB. M-CSF signals through the MAPK/ERK pathway via Sp1 to induce VEGF production and induces angiogenesis *in vivo*. *PLoS One* 2008; **3**:e3405.
- Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; **420**:860-867.
- McDermott RS, Deneux L, Mosseri V, Védrenne J, Clough K, Fourquet A, Rodriguez J, Cosset JM, Sastre X, Beuzeboc P, Pouillart P, Scholl SM. Circulating macrophage colony stimulating factor as a marker of tumour progression. *Eur Cytokine Netw* 2002; **13**:121-127.
- Scholl SM, Lidereau R, de la Rochefordiere A, Le-Nir CC, Mosseri V, Noguès C, Pouillart P, Stanley FR. Circulating levels of the macrophage colony stimulating factor CSF-1 in primary and metastatic breast cancer patients. A pilot study. *Breast Cancer Res Treat* 1996;**39**:275-283.
- Sasaki A, Iwashita Y, Shibata K, Matsumoto T, Ohta M, Kitano S. Prognostic value of preoperative peripheral blood monocyte count in patients with hepatocellular carcinoma. *Surgery* 2006;**139**:755-764.
- Espinosa I, Edris B, Lee CH, Cheng HW, Gilks CB, Wang Y, Montgomery KD, Varma S, Li R, Marinelli RJ, West RB, Nielsen T, Beck AH, van de Rijn M. CSF1 Expression in Non gynecological leiomyosarcoma is associated with increased tumor angiogenesis. *Am J Pathol* 2011;**179**:2100-2107.
- Lin H, Lee E, Hestir K, Leo C, Huang M, Bosch E, Halenbeck R, Wu G, Zhou A, Behrens D, Hollenbaugh D, Linnemann T, Qin M, Wong J, Chu K, Doberstein SK, Williams LT. Discovery of a cytokine and its receptor by functional screening of the extracellular proteome. *Science* 2008;**320**:807-811.
- Wang Y, Szretter KJ, Vermi W, Gilfillan S, Rossini C, Cella M, Barrow AD, Diamond MS, Colonna M. IL-34 is a tissue-restricted ligand of CSF1R required for the development of Langerhans cells and microglia. *Nat Immunol* 2012; **13**:753-760.
- Foucher ED, Blanchard S, Preisser L, Garo E, Ifrah N, Guardiola P, Delneste Y, Jeannin P. IL-34 induces the differentiation of human monocytes into immunosuppressive macrophages. Antagonistic effects of GM-CSF and IFN γ . *PLoS One* 2013;**8**:e56045.
- Baud'huin M, Renault R, Charrier C, Riet A, Moreau A, Brion R, Gouin F, Duplomb L, Heymann D. Interleukin-34 is expressed by giant cell tumours of bone and plays a key role in RANKL-induced osteoclastogenesis. *J Pathol* 2010;**221**:77-86.
- Eda H, Zhang J, Keith RH, Michener M, Beidler DR, Monahan JB. Macrophage-colony stimulating factor and interleukin-34 induce chemokines in human whole blood. *Cytokine* 2010; **52**:215-220.
- Chemel M, Le Goff B, Brion R, Cozic C, Berreur M, Amiaud J, Bougras G, Touchais S, Blanchard F, Heymann MF, Berthelot JM, Verrecchia F, Heymann D. Interleukin 34 expression is associated with synovitis severity in rheumatoid arthritis patients. *Ann Rheum Dis* 2012; **71**:150-154.
- Nakamichi Y, Udagawa N, Takahashi N. IL-34 and CSF-1: similarities and differences. *J Bone Miner Metab* 2013;**31**:486-495.
- Benslimane-Ahmim Z, Heymann D, Dizier B, Lokajczyk A, Brion R, Laurendeau I, Bièche I, Smadja DM, Galy-Fauroux I, Collic-Jouault S, Fischer AM, Boisson-Vidal C. Osteoprotegerin, a new actor in vasculogenesis, stimulates endothelial colony-forming cells properties. *J Thromb Haemost* 2011;**9**: 834-843.
- Zemani F, Benisvy D, Galy-Fauroux I, Lokajczyk A, Collic-Jouault S, Uzan G, Fischer AM, Boisson-Vidal C. Low-molecular-weight fucoidan enhances the proangiogenic phenotype of endothelial progenitor cells. *Biochem Pharmacol* 2005; **70**:1167-1175.
- Zemani F, Silvestre JS, Fauvel-Lafeve F, Bruel A, Vilar J, Bieche I, Laurendeau I, Galy-Fauroux I, Fischer AM, Boisson-Vidal C. Ex vivo priming of endothelial progenitor cells with SDF-1 before transplantation could increase their proangiogenic potential. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;**28**:644-650
- Dias JV, Benslimane-Ahmim Z, Egot M, Lokajczyk A, Grelac F, Galy-Fauroux I, Juliano L, Le-Bonniec B, Takiya CM, Fischer AM, Blanc-Brude O, Morandi V, Boisson-Vidal C. A motif within the N-terminal domain of TSP-1 specifically promotes the proangiogenic activity of endothelial colony-forming cells. *Biochem Pharmacol* 2012;**84**:1014-1023.
- Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, Naldini L (1998) A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* 1998;**72**:8463-8471
- Gobin B, Battaglia S, Lanel R, Chesneau J, Amiaud J, Rédini F, Ory B, Heymann D. NVP-BE235, a dual

PI3K/mTOR inhibitor, inhibits osteosarcoma cell proliferation and tumor development in vivo with an improved survival rate. *Cancer Lett* 2014;**344**:291-298.

26. Kobayashi E, Masuda M, Nakayama R, Ichikawa H, Satow R, Shitashige M, Honda K, Yamaguchi U, Shoji A, Tochigi N, Morioka H, Toyama Y, Hirohashi S, Kawai A, Yamada T. Reduced argininosuccinate synthetase is a predictive biomarker for the development of pulmonary metastasis in patients with osteosarcoma. *Mol Cancer Ther* 2010; **9**:535-544.

27. Kim YW1, West XZ, Byzova TV. Inflammation and oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. *J Mol Med* 2013;**91**:323-328.

28. Noonan DM, De Lerma Barbaro A, Vannini N, Mortara L, Albin A. Inflammation, inflammatory cells and angiogenesis: decisions and indecisions. *Cancer Metastasis Rev* 2008;**27**:31-40

29. Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol* 2013;**229**:176-185.

30. Eltzschig HK, Carmeliet P. Hypoxia and inflammation. *N Engl J Med* 2011;**364**:656-665.

31. Heymann D and Redini F. Bone sarcomas: pathogenesis and new therapeutic approaches. *BoneKey Rep.* 2011;**8**:402-414.

32. Chen Z, Buki K, Vääräniemi J, Gu G, Väänänen HK. The critical role of IL-34 in osteoclastogenesis. *PLoS One* 2011;**6**:e18689.

33. Eda H, Shimada H, Beidler DR, Monahan JB. Proinflammatory cytokines, IL-1 β and TNF- α , induce expression of interleukin-34 mRNA via JNK- and p44/42 MAPK-NF-kB pathway but not p38 pathway in osteoblasts. *Rheumatol Int* 2011;**31**:1525-30.

34. Balogh E, Connolly M, Biniecka M, McCormick J, Veale DJ, Fearon U. Interleukin-34 regulates angiogenesis and cell proliferation in inflammatory arthritis. This effect is potentiated by hypoxia. *Ann Rheum Dis* 2013;**72**(Suppl3):140.

35. Okazaki T, Ebihara S, Takahashi H, Asada M, Kanda A, Sasaki H. Macrophage colony-stimulating factor induces vascular endothelial growth factor production in skeletal muscle and promotes tumor angiogenesis. *J Immunol* 2005;**174**:7531-7538.

36. Fuster MM, Wang L. Endothelial heparan sulfate in angiogenesis. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2010;**93**:179-212.

37. Thelin MA, Bartolini B, Axelsson J, Gustafsson R, Tykesson E, Pera E, Oldberg Å, Maccarana M, Malmstrom A. Biological functions of iduronic acid in chondroitin/dermatan sulfate. *FEBS J* 2013;**280**:2431-2446.

38. Benslimane-Ahmim Z, Poirier F, Delomenie C, Lokajczyk A, Grelac F, Galy-Fauroux I, Mohamedi A, Fischer AM, Heymann D, Lutomski D, Boisson-Vidal C. Mechanistic study of the proangiogenic effect of osteopontin. *Angiogenesis* 2013;**16**:575-593

39. Nandi S, Cioce M, Yeung YG, Nieves E, Tesfa L, Lin H, Hsu AW, Halenbeck R, Cheng HY, Gokhan S, Mehler MF, Stanley ER. Receptor-type protein-tyrosine phosphatase ζ is a functional receptor for interleukin-34. *J Biol Chem* 2013;**288**:21972-21986.

40. Mikelis C, Sfaelou E, Koutsoumpa M, Kieffer N, Papadimitriou E. Integrin $\alpha(v)\beta(3)$ is a pleiotrophin receptor required for pleiotrophin-induced endothelial cell migration through receptor protein tyrosine phosphatase $\beta/zeta$. *FASEB J* 2009;**23**:1459-69.

41. Henrotin Y, Lambert C, Richette P. Importance of synovitis in osteoarthritis: Evidence for the use of glycosaminoglycans against synovial inflammation. *Semin Arthritis Rheum* 2014;**43**:579-587.

42. Cook J, Hagemann T. Tumour-associated macro-

phages and cancer. *Curr Opin Pharmacol* 2013;**13**:595-601.

43. Buddingh EP, Kuijjer ML, Duim RA, Bürger H, Agelopoulos K, Myklebost O, Serra M, Mertens F, Hogendoorn PC, Lankester AC, Cleton-Jansen AM. Tumor-infiltrating macrophages are associated with metastasis suppression in high-grade osteosarcoma: a rationale for treatment with macrophage activating agents. *Clin Cancer Res* 2011;**17**:2110-2119.

44. Nowicki A, Szenajch J, Ostrowska G, Wojtowicz A, Wojtowicz K, Kruszewski AA, Maruszynski M, Aukerman SL, Wiktor-Jedrzejczak W. Impaired tumor growth in colony-stimulating factor 1 (CSF-1)-deficient, macrophage-deficient op/op mouse: evidence for a role of CSF-1-dependent macrophages in formation of tumor stroma. *Int J Cancer* 1998;**65**:112-119.

45. DeNardo DG, Brennan DJ, Rexhepaj E, Ruffell B, Shiao SL, Madden SF, Gallagher WM, Wadhvani N, Keil SD, Junaid SA, Rugo HS, Hwang ES, Jirström K, West BL, Coussens LM. Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. *Cancer Discov* 2011;**1**:54-67.

2. Figures supplémentaires de l'article et résultats complémentaires

2.1. Expression de l'IL-34 dans l'ostéosarcome

Le M-CSF est fortement exprimé dans différentes lignées humaines d'ostéosarcome (KHOS, U2OS, Sa-OS2 et MG63) alors que l'expression de l'IL-34 est faible (**Figure 41**).

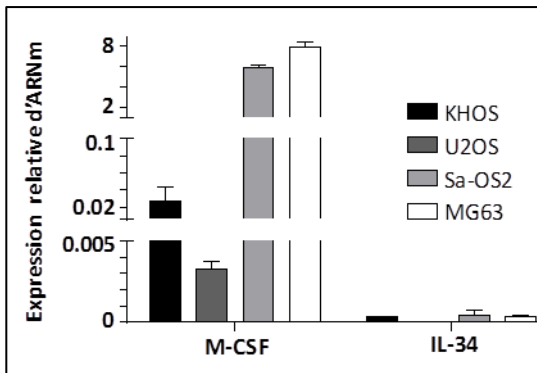


Figure 41 : Expression de M-CSF et d'IL-34 dans les lignées d'ostéosarcome.

Le M-CSF est fortement exprimé dans quatre lignées d'ostéosarcome : KHOS, U2OS, Sa-OS2 et MG63, alors que l'expression d'IL-34 est très faible.

Les cellules MG63 sont celles qui expriment le plus le M-CSF, ce qui est cohérent avec leur production de M-CSF soluble (500 pg/mL environ). Cependant, aucune lignée n'exprime le récepteur au M-CSF, et ces résultats ont été confirmés par cytométrie en flux en prenant les CD14⁺ comme contrôle positif (**données personnelles**). Malgré une expression d'IL-34 faible dans les lignées d'ostéosarcome, son expression est plus importante dans les biopsies d'ostéosarcome obtenues chez 12 patients de 16 à 80 ans qui présentaient en majorité une tumeur localisée au niveau du fémur. Cette expression d'IL-34 est confirmée par une analyse transcriptomique réalisée sur 27 biopsies d'ostéosarcome et présente dans la banque de données GEO (NCBI) (**Figure 42**). Les cellules HOS transduites surexpriment bien le M-CSF et l'IL-34 avant inoculation des cellules *in vivo* à la fois au niveau transcriptionnel et protéique. En effet, la lignée HOS M-CSF produit environ 500 pg/mL de M-CSF pour une densité moyenne de cellules (40 000/cm²) contre environ 50 pg/mL pour la lignée parentale, et l'IL-34 est exprimée pour plus de 30% des cellules HOS IL-34 alors que la protéine n'est pas détectable dans la lignée parentale. Les populations obtenues sont polyclonales pour représenter l'hétérogénéité tumorale.

Cette expression est stable puisqu'à la fin des expériences *in vivo* (environ une trentaine de jours après inoculation des cellules) les tumeurs surexpriment toujours le M-CSF et l'IL-34 (**Figure 43**).

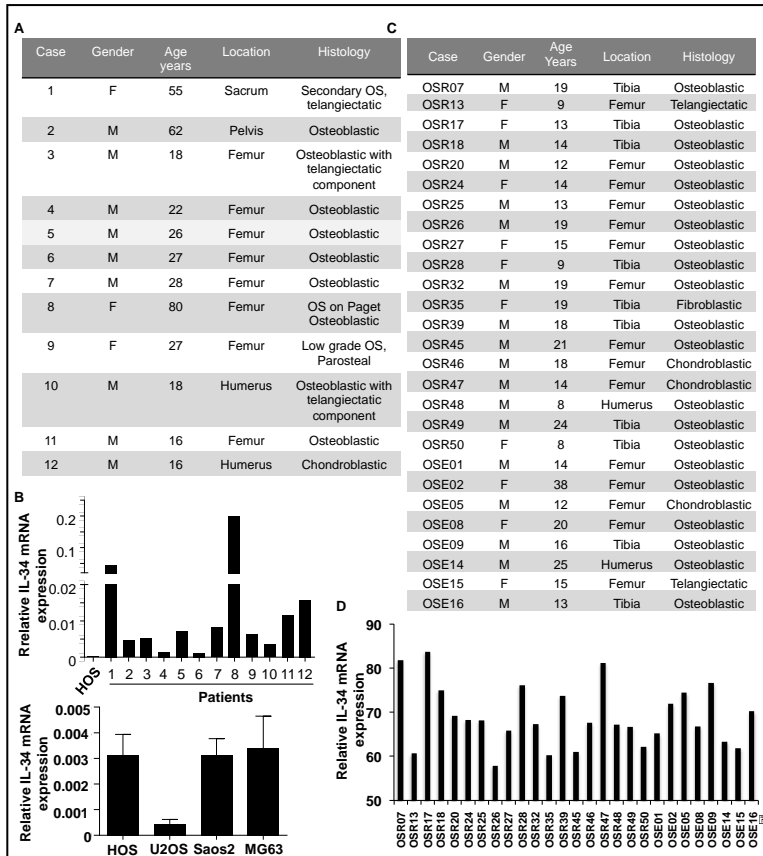
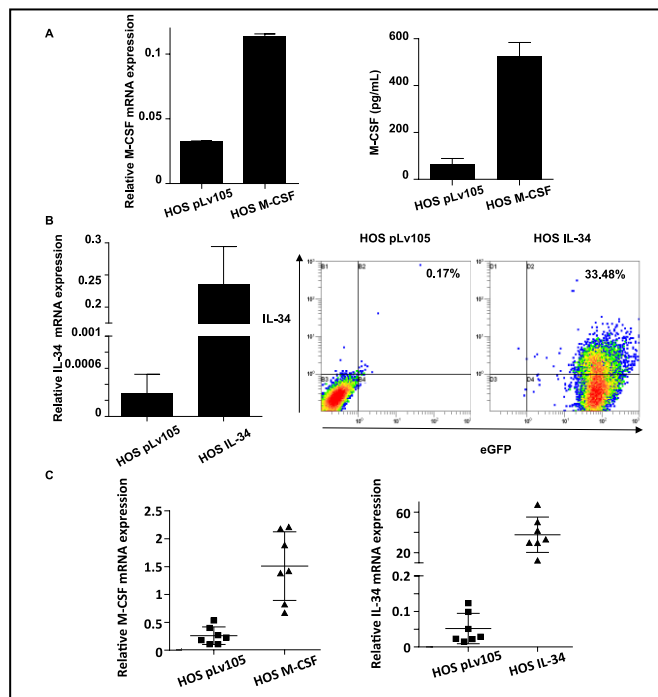


Figure 42 : Supplementary Data 1 de l'article 1

Human osteosarcoma expressed IL-34. (A) Clinical features of 12 osteosarcoma treated at the University Hospital of Nantes (Department of Orthopaedic Surgery, France). (B) IL-34 expression by quantitative PCR performed in human osteosarcoma biopsies (patients 1-12) and in human HOS, U2OS, Saos2 and MG63 osteosarcoma cell lines. IL-34 mRNA expression was normalized to the HPRT expression. (C) Clinical characteristics of 27 osteosarcoma patients and (D) relative IL-34 expression in the corresponding biopsie specimens from GEO bank. OS: osteosarcoma.

Figure 43 : Supplementary Data 2 de l'article 1. Validation data of the IL-34 and M-CSF expression by transduced HOS osteosarcoma cells. HOS osteosarcoma cells transduced by M-CSF (A) and IL-34 (B) overexpressed *in vitro* the corresponding cytokines compared to the control cells (empty vector, pLv105) at the transcriptional level [as demonstrated by quantitative PCR (A, B)] and at the protein level [as demonstrated by ELISA assay (A) and flow cytometry (B)]. Similarly, M-CSF and IL-34 were also overexpressed compared to control group (pLv105 vector) in explanted tumour tissues established from inoculation of M-CSF- or IL-34-transduced HOS osteosarcoma cells (C). For quantitative PCR, HPRT gene expression was used as the invariant control.



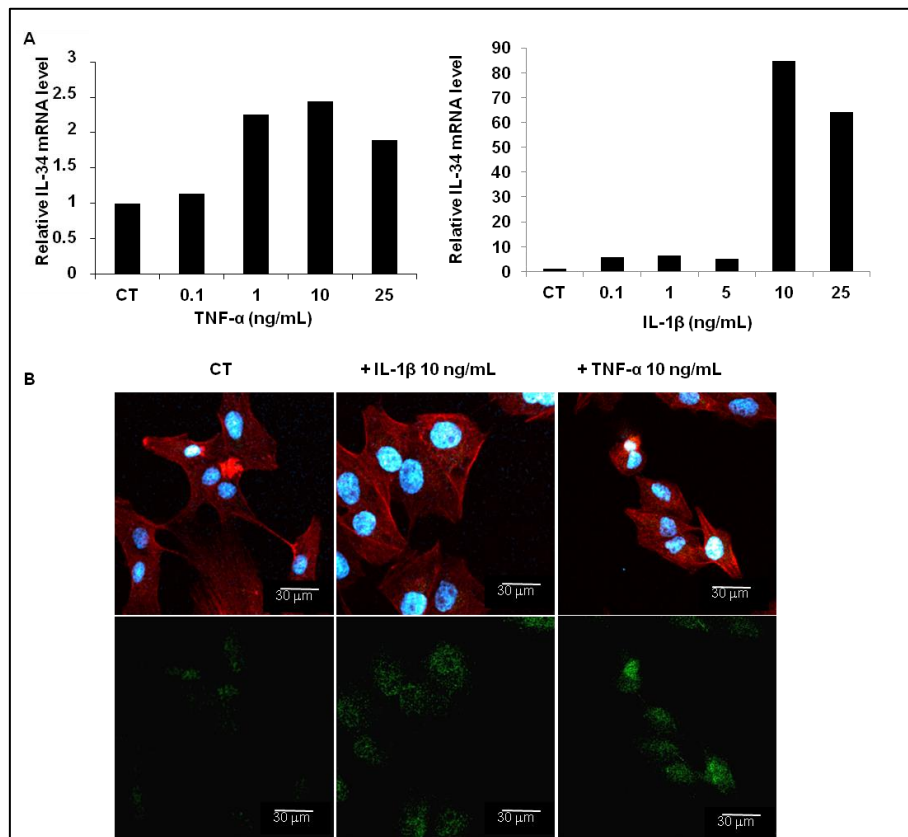


Figure 44 : Supplementary Data 3 de l'article 1.

TNF- α and IL-1 β increase IL-34 mRNA expression in various osteosarcoma cells. (A) U2OS osteosarcoma cells were stimulated with increased dose (0,1–25 ng/ml) of TNF- α or IL-1 β for 8 h. After incubation, IL-34 mRNA levels were determined by RTqPCR, normalised to GAPDH. (B) MG63 osteosarcoma cells cultured on plastic chamber on microscope glass slides were treated or not with 10 ng/mL of TNF- α or IL-1 β for 24 h. IL-34 expression detected by Alexa Fluor 488-conjugated antibody (green), actin filaments detected by alexa fluor 546-conjugated phalloidin (red), and nuclei stained by DAPI (blue) were observed by confocal microscopy. A representative experiment is shown.

Il faut noter que l'expression d'IL-34, comme l'expression du M-CSF, peuvent être induites dans ces lignées d'ostéosarcome après stimulation par des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α ou l'IL-1 β (Figure 44), comme cela avait été montré sur des ostéoblastes (Eda *et al.* 2010) ou sur des fibroblastes synoviaux (Chemel *et al.* 2012). Suivant la lignée d'ostéosarcome utilisée, la cinétique d'expression ou la dose minimale pour induire le pic d'expression des cytokines varient. De plus, certaines cellules semblent mieux répondre au TNF- α qu'à l'IL-1 β et inversement. Ainsi, chez la lignée U2OS, l'expression de l'IL-34 est plus fortement induite par l'IL-1 β (x80) que par le TNF- α (x2,5). Au contraire, l'expression du M-CSF est plus fortement induite par le TNF- α (x13) que par l'IL-1 β (x2,5). De même, il faut de plus fortes doses d'IL-1 β pour induire l'expression d'IL-34 (10 ng/mL) alors qu'1 ng/mL de TNF- α est suffisant pour obtenir l'induction maximale. Le comportement inverse est observé pour le M-CSF (Figure 45). De la même façon, le TNF- α et l'IL-1 β induisent l'expression de M-CSF et d'IL-34 dans la lignée humaine d'ostéosarcome HOS, et comme dans la lignée U2OS l'expression de M-CSF est induite plus fortement par le TNF- α (x13), alors que

celle de l'IL-34 l'est plus par l'IL-1 β (x17). La régulation de l'expression du M-CSF et de l'IL-34 par les cytokines pro-inflammatoires est rapide, avec un pic d'expression dès 2 heures de traitement (Figure 46).

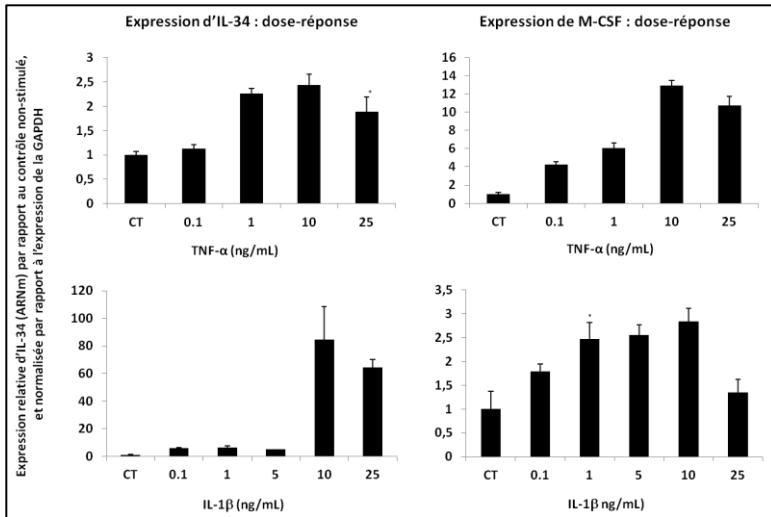
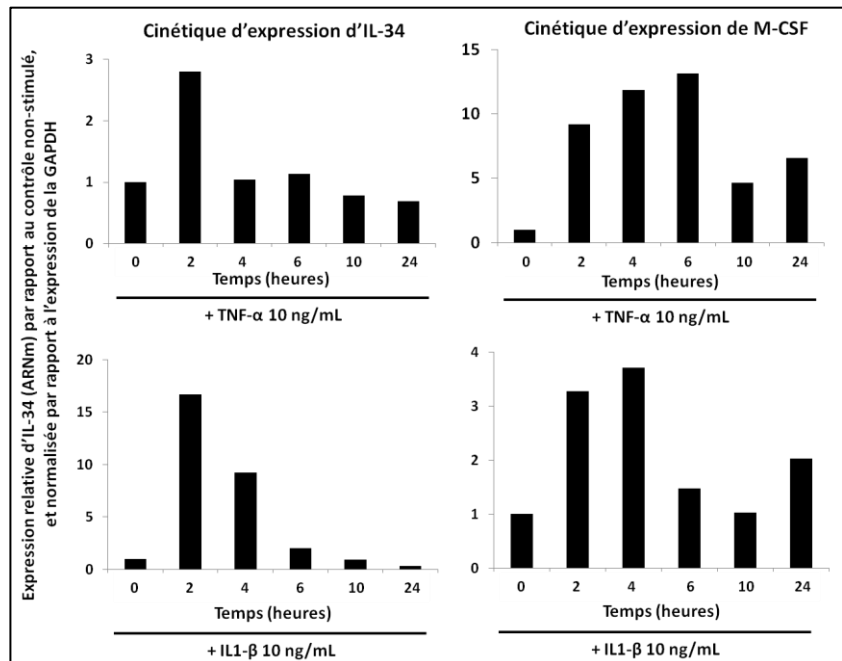


Figure 45 : L'expression du M-CSF et de l'IL-34 peut être induite par les cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IL-1 β de façon dose-dépendante dans la lignée U2OS.

Les cellules d'ostéosarcome humaines U2OS ont été stimulées pendant 8 heures en présence de 0,1 à 25 ng/mL de TNF- α ou d'IL-1 β , puis l'expression du M-CSF ou de l'IL-34 est analysée par RT-qPCR, normalisée par rapport à l'expression de la GAPDH et rapportée au contrôle non-stimulé (CT) pour observer l'induction. Les différents graphes représentent la moyenne de trois expériences indépendantes avec les écarts-types standards.

Figure 46 : L'expression du M-CSF et de l'IL-34 est induite par les cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IL-1 β dans la lignée HOS de façon temps-dépendante.

Les cellules d'ostéosarcome humaines HOS ont été stimulées de 2 à 24 heures en présence de 10 ng/mL de TNF- α ou d'IL-1 β , puis l'expression du M-CSF ou de l'IL-34 est analysée par RT-qPCR, normalisée par rapport à l'expression de la GAPDH et rapportée au contrôle pris au temps initial pour observer l'induction.



Un marquage immunohistochimique de l'IL-34 sur des biopsies d'ostéosarcome permet de localiser l'expression de la cytokine, qui se trouve principalement au niveau du cytoplasme ou du noyau des cellules d'ostéosarcome et de cellules multinucléées proches des cellules tu-

morales. Au contraire certaines cellules comme les ostéocytes et la matrice osseuse sont bien négatives (**Figure 47**).

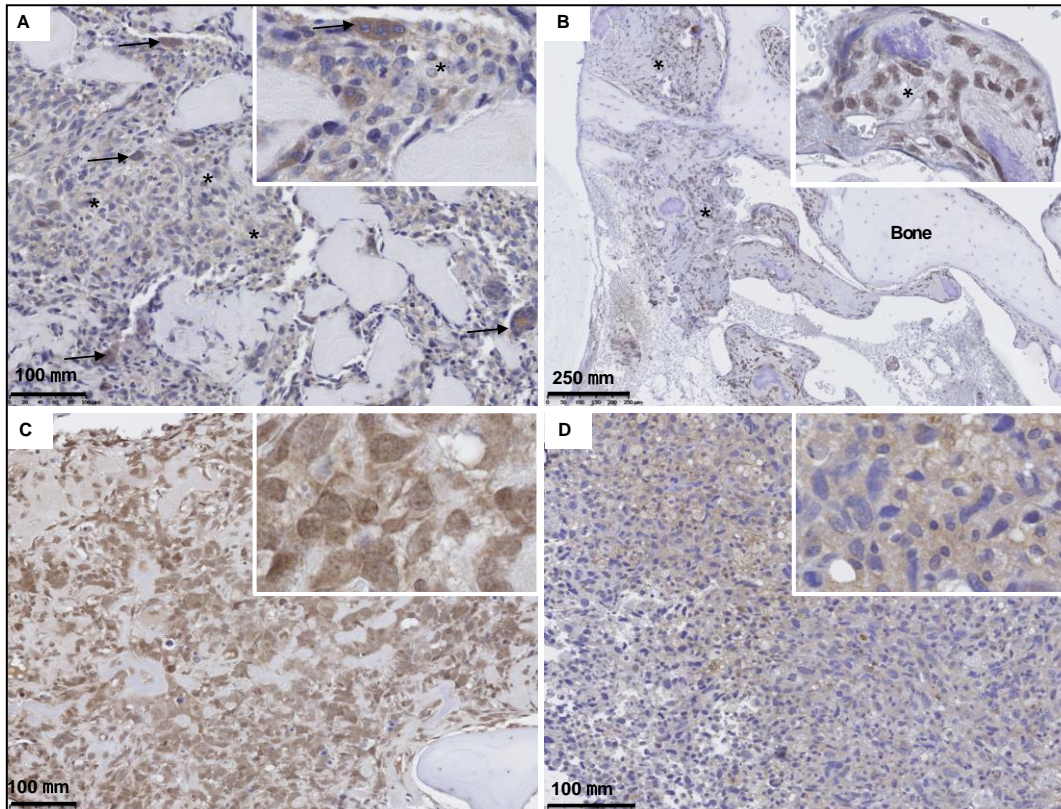


Figure 47 : Supplementary Data 4 de l'article 1.

IL-34 is expressed by osteosarcoma cells. IL-34 expression was analyzed by immunohistochemistry in human osteosarcoma biopsies. In all samples studied, most of osteosarcoma cells showed a positive immunostaining for IL-34 (A-D). (A) Multinucleated cells (arrow) closely located to tumour cells (asterisk) also expressed IL-34 staining. (B) In contrast to osteosarcoma cells (asterisk), no IL-34 expression was observed in osteocytes. Osteosarcoma cells exhibited a nuclear (C) and a cytoplasmic immunostaining (D).

2.2. Rôle pro-tumoral de l'IL-34 dans un modèle murin d'ostéosarcome

Après inoculation de cellules d'ostéosarcome HOS en site paratibial chez la souris immunodéficiente (Rj :NMRI-nude), les cellules qui surexpriment le M-CSF ou l'IL-34 favorisent la vitesse de développement de la tumeur (**Figure 1A article 1**). De la même façon, dans une seconde expérience où les souris sont euthanasiées à volume tumoral équivalent de 1500 mm³, le nombre de métastases pulmonaires est plus important dans les groupes HOS M-CSF et HOS IL-34 (**Figure 1B article 1 et Figure 51**).

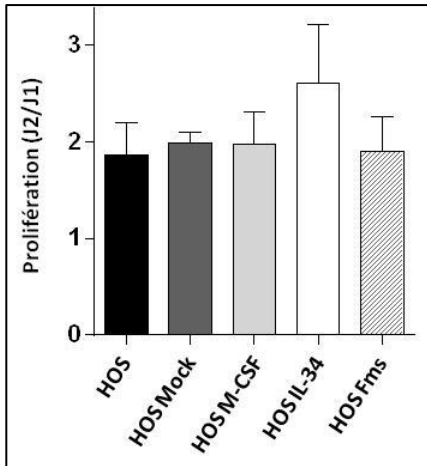


Figure 48 : Prolifération de la lignée parentale HOS et des lignées modifiées avec le vecteur vide (Mock), avec un vecteur codant pour le M-CSF humain (M-CSF), avec un vecteur codant pour l'IL-34 humaine (IL-34) ou avec un vecteur codant pour le M-CSFR humain (Fms).

150 000 cellules sontensemencées à J0, et les cellules sont comptées manuellement à J1 puis J2 pour évaluer la prolifération. Le graphique représente la moyenne des ratios J2/J1 sur trois expériences indépendantes réalisées en triplicats. Aucune différence significative n'est observable entre les différentes lignées.

Il faut noter que la prolifération des différentes lignées obtenues à partir de la lignée parentale est similaire *in vitro* (**Figure 48**). Le développement tumoral est corrélé à l'importance de l'angiogenèse, puisque le nombre de vaisseaux CD146⁺ ou CD31⁺ est significativement plus important dans le groupe IL-34 (**Figure 1C article 1 et Figure 49**). En effet, une différence de vascularisation était déjà visible macroscopiquement après euthanasie des souris, avec de gros vaisseaux apparents dans les tumeurs M-CSF et IL-34 (**Figure 50**).

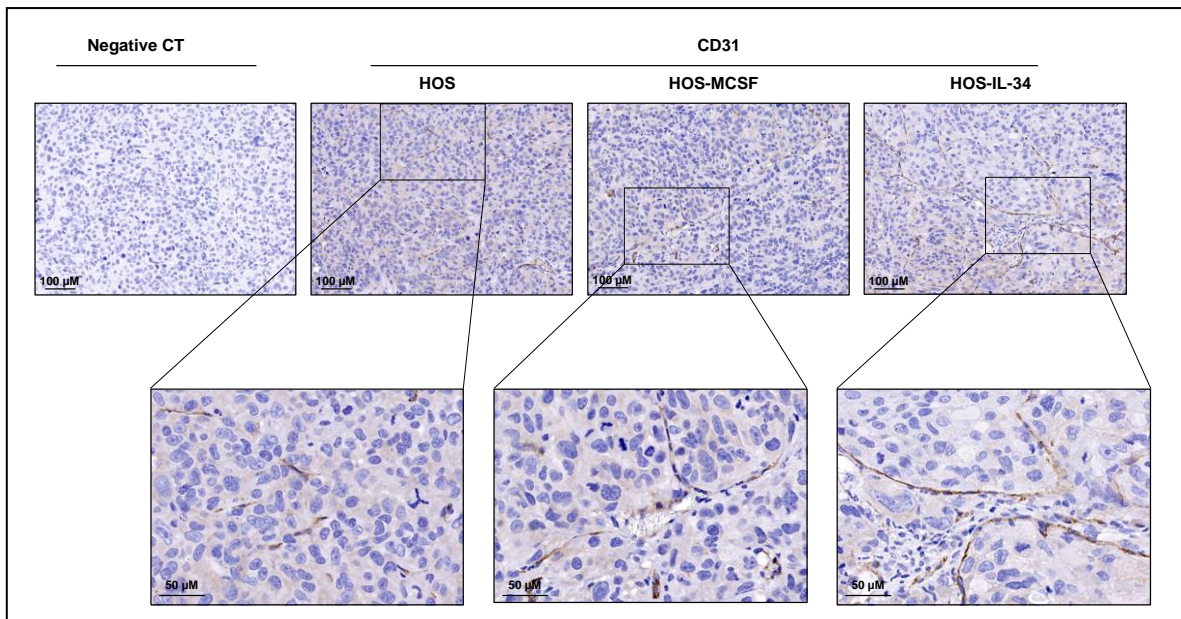


Figure 49 : Supplementary Data 5 de l'article 1.

IL-34 and M-CSF increase the neo-formation of CD31⁺ vessels in a mouse osteosarcoma model. Human HOS osteosarcoma cells over-expressing IL-34 (HOS-IL34), M-CSF (HOS-M-CSF) or transduced by the empty vector (HOS) were inoculated in close proximity to the tibia of female Rj:NMRI-nude mice. All mice were sacrificed by cervical dislocation at an equivalent volume of 1500 mm³ and immunohistochemical assessment of CD31 was carried out, as previously done for the CD146 staining.

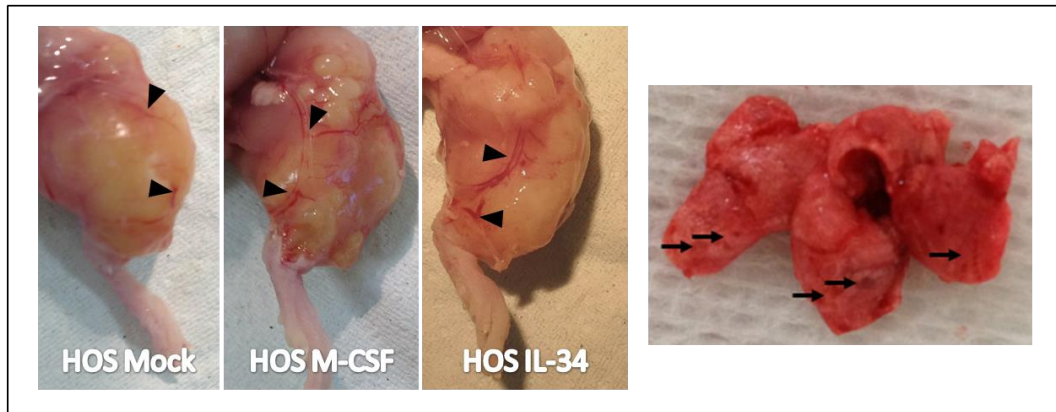


Figure 50 : Aspects des tumeurs et des métastases pulmonaires après euthanasie des souris.

À gauche, les tumeurs des groupes M-CSF et IL-34 semblent présenter un réseau vasculaire plus dense, avec de plus gros vaisseaux (flèches noires). Les tumeurs apparaissent un peu vertes car les cellules tumorales ont été modifiées pour exprimer l'eGFP. À droite, un poumon d'une souris M-CSF qui présente plusieurs métastases dont certaines sont indiquées par des flèches noires.

En effet, l'angiogenèse et le développement tumoral sont également corrélés à l'infiltration des macrophages associés aux tumeurs, puisque la densité de macrophages IBA-1⁺ est plus importante dans le groupe IL-34 (**Figure 4A article 1**). Comme la plupart des macrophages associés aux tumeurs, ces macrophages ne sont pas de type M1, puisque peu de cellules sont INOS⁺, même s'il est possible d'en observer quelques-unes dans certaines tumeurs (**Figure 51**).

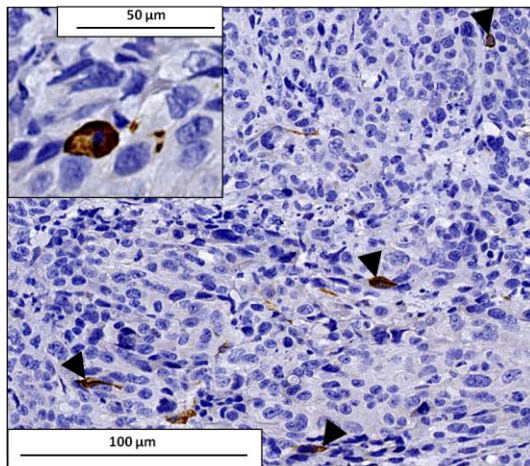


Figure 51 : Exemple de marquage INOS sur une tumeur du groupe contrôle possédant quelques macrophages positifs. Les flèches noires indiquent des macrophages fortement positifs pour INOS.

De plus, les macrophages immunosuppresseurs de type M2 sont significativement plus nombreux dans les groupes M-CSF et IL-34 (**Figure 4B article 1**).

Les tibias des souris ont également été analysés par microtomodensitométrie aux rayons X pour évaluer l'impact de la tumeur sur l'os sain. L'analyse de la morphologie osseuse révèle une ostéolyse importante du tibia et du péroné, mais également une formation d'os ectopique en feu d'herbe au contact de la tumeur caractéristique de la pathologie. Une fracture au niveau

de la plaque de croissance est souvent observée dans les groupes contrôles, et s'avère systématique dans le groupe M-CSF. Au contraire, ces fractures ne sont pas observables dans le groupe IL-34, dont le tibia est recouvert jusqu'à l'épiphyse proximale d'un os compact dense, et beaucoup plus épais que dans les autres groupes (**Figure 52**).

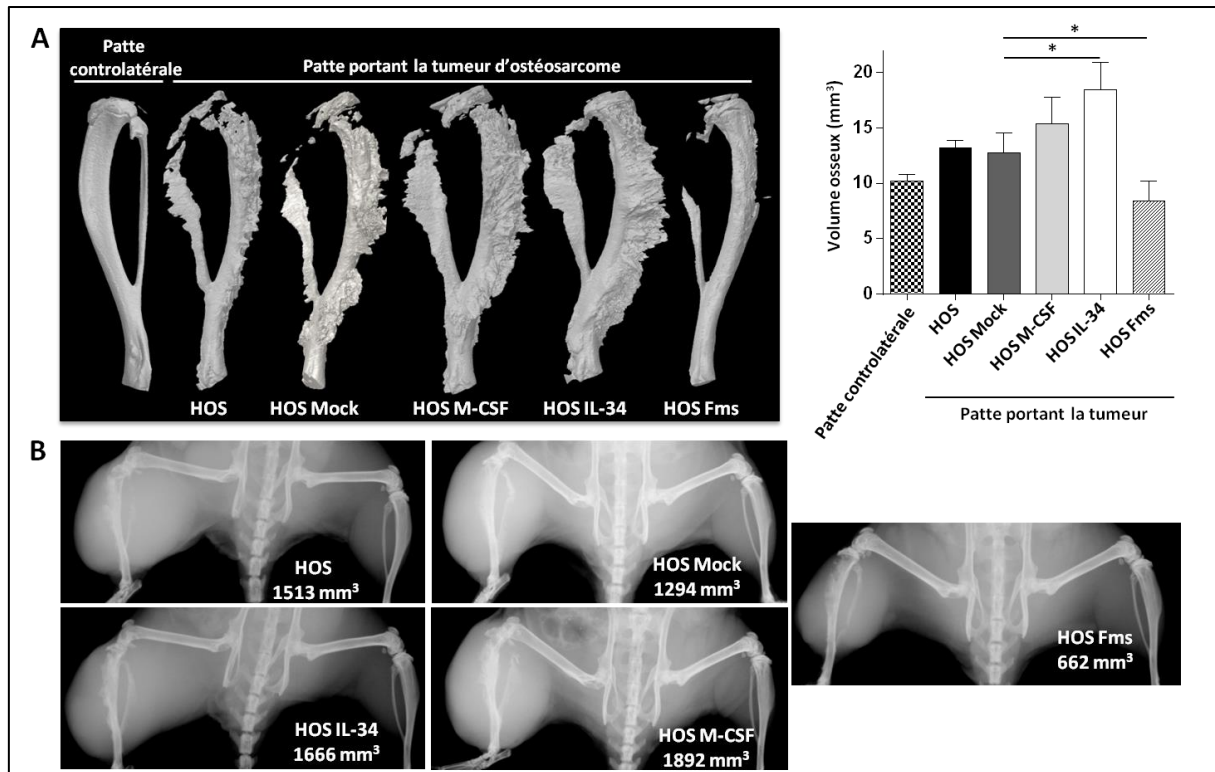


Figure 52 : Analyse du volume osseux au niveau du tibia et du péroné dans l'expérience arrêtée à temps équivalent.

A) Reconstitutions 3D après analyse des tibias par microtomographie à rayons X. Le tibia de la patte controlatérale est pris comme témoin d'un os sain. Les pattes portant des tumeurs contrôles (HOS et HOS Mock) et M-CSF ont subi une ostéolyse importante qui se traduit par des fractures, notamment au niveau de la métaphyse et du haut du péroné. Ces fractures ne sont pas observables dans le groupe HOS IL-34. Excepté les tibias des souris du groupe HOS Fms qui présentent une légère ostéolyse, tous les tibias portent une formation d'os ectopique importante en feu d'herbe. Le volume osseux total est significativement plus important dans le groupe HOS IL-34 comparé aux groupes contrôles. B) Radiographie des animaux permettant de voir la masse tumorale, les plages d'ostéolyse et la formation anormale de tissu osseux. Les tibias portant les tumeurs apparaissent déformés comparé aux pattes controlatérales, sauf pour les souris du groupe Fms où le tibia présente une morphologie normale avec quelques plages d'ostéolyse.

Des analyses similaires ont été faites sur la deuxième expérience arrêtée à volume tumoral équivalent. La surexpression du M-CSF et de l'IL-34 dans le microenvironnement tumoral induit un remodelage osseux plus important, puisque le volume d'os ectopique est significativement augmenté (x1,5). Au niveau proximal du tibia, l'os cortical est détruit pour être remplacé par un tissu osseux anarchique induit par la tumeur (**Figure 53**).

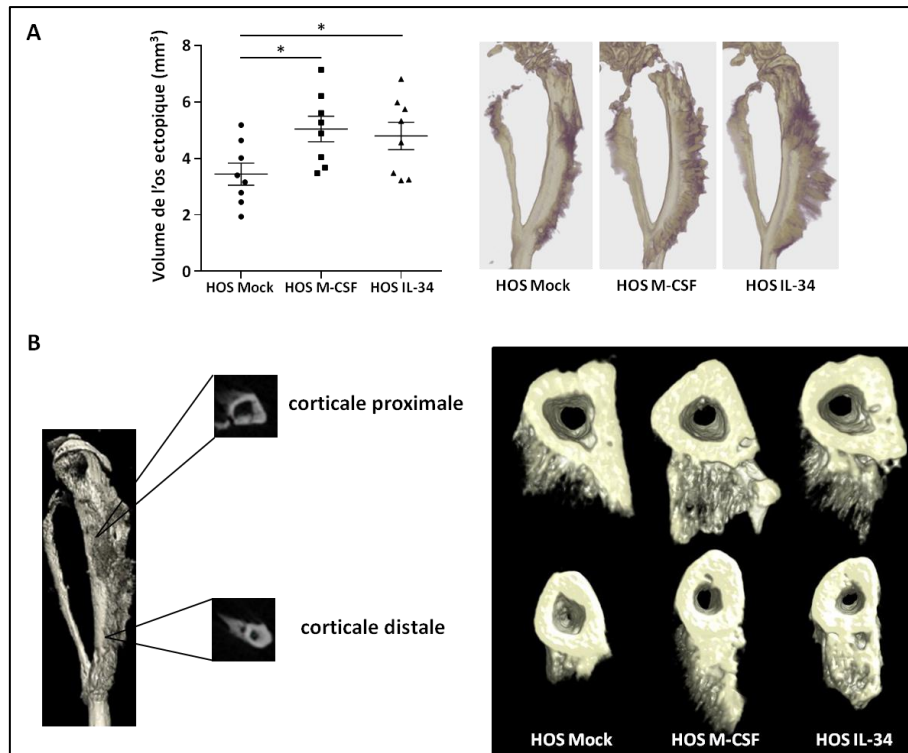


Figure 53 : Analyse du volume osseux au niveau du tibia et du péroné dans l'expérience arrêtée à volumes tumoraux équivalents.

A) Reconstitutions 3D après analyse des tibias par microtomographie à rayons X. L'os sain est en blanc cassé, et l'os ectopique apparaît en gris-violet. À un développement tumoral équivalent, les tibias des groupes contrôles et M-CSF présentent toujours une ostéolyse importante au niveau de la métaphyse du tibia, tandis que dans le groupe IL-34 ces fractures liées à l'ostéolyse sont peu présentes. Le volume d'os ectopique formé par la tumeur est significativement plus important dans les groupes M-CSF et IL-34 comparé au groupe contrôle Mock. B) Coupes transversales de l'os cortical au niveau du tibia proximal et distal. L'apposition d'os ectopique en feu d'herbe est plus marquée dans les groupes M-CSF et IL-34 dans les deux zones du tibia.

2.3. L'IL-34 induit la formation de vaisseaux *in vitro* et *in vivo* et l'adhérence des leucocytes sur l'endothélium

L'injection de FGF-2 ou d'IL-34 recombinants en sous-cutané chez la souris C57/BL6J dans des implants de Matrigel® induit la formation de néo-vaisseaux, quantifiée par le taux d'hémoglobine au sein de l'implant. Au contraire, le M-CSF n'induit presque pas l'angiogenèse au sein de l'implant. Néanmoins, l'injection de M-CSF ajouté au FGF-2 semble potentialiser la formation de capillaires induite par le FGF-2 seul. Au contraire, l'ajout d'IL-34 au FGF-2 n'a pas d'effet (**Figure 54**). *In vitro*, le M-CSF et l'IL-34 induisent la prolifération des précurseurs endothéliaux (ECFCs), avec une dose-dépendante néanmoins différente (**Figure 2A-B article 1**), et les deux cytokines potentialisent l'effet pro-prolifératif du FGF-2 (**Figure 2C article 1**). Par ailleurs, l'addition de M-CSF ou d'IL-34 seuls est incapable d'induire la formation de tubes en Matrigel®, contrairement au FGF-2. Néanmoins, l'addition de M-CSF ou d'IL-34 potentialise la formation de tubes induite par le FGF-2 (**Figure 2D article 1**).

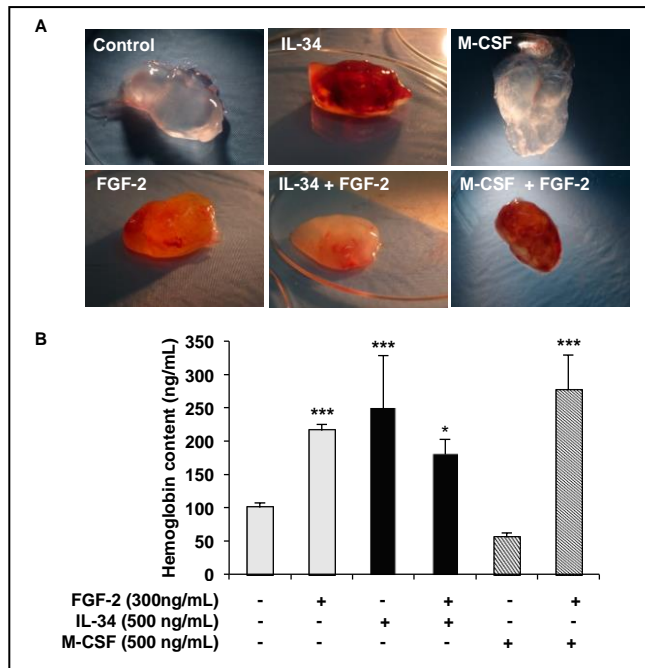


Figure 54 : Supplementary Data 6 de l'article 1.

IL-34 and M-CSF modulate angiogenesis *in vivo*, in a mouse model of Matrigel® plug Assay. (A) Representative photographs of plugs excised on day 14 containing PBS (negative control); FGF-2 (350 ng/mL) used as a positive control, alone or with IL-34 (500 ng/mL), M-CSF (500 ng/mL). (B) Haemoglobin quantification: values represent mean ± SEM of the haemoglobin content in Matrigel® plugs excised from C57Bl/6 mice (n=6 to 7 per experimental group). * p<0.05, ** p<0.01 and *** p<0.001 compared to the FGF-2 control group.

Ces effets passent par l'activation des FAKs, de Src et de la voie MAPK (p38 et ERK1/2), alors que l'activation de la voie PI3K-Akt semble au contraire réduite (**Figure 3A-C, Figure 55**). De plus, ces effets semblent indépendants du M-CSFR, puisqu'aucune expression du récepteur n'a pu être détectée au niveau protéique (cytométrie, western blot) et au niveau transcriptionnel quelles que soient les conditions testées (hypoxie, extraction en Matrigel®, stimulation cellulaire par différents facteurs, etc.). Le RPTPβ/ζ est quant à lui détecté très faiblement au niveau transcriptionnel, et l'IL-34 agit en partie via les glycosaminoglycanes membranaires puisque leur abrasion diminue la signalisation et la formation de tubes induite en présence de FGF-2 (**Figure 3A-C article 1**).

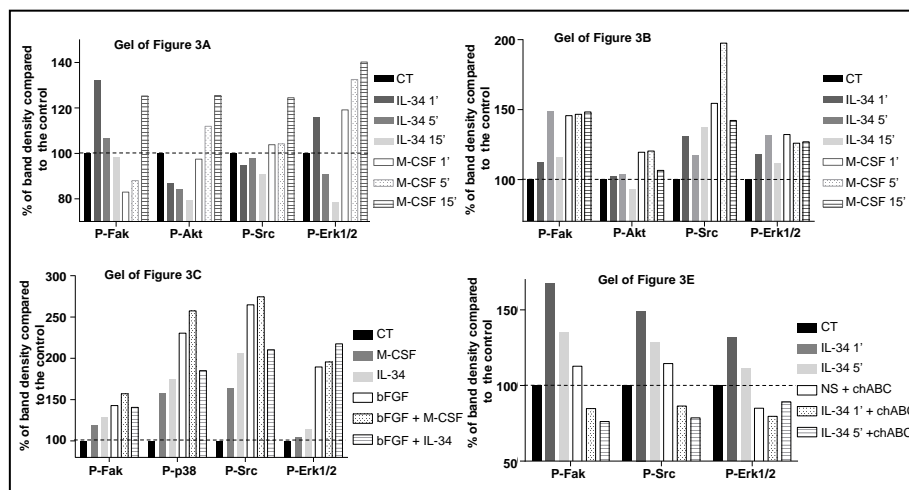
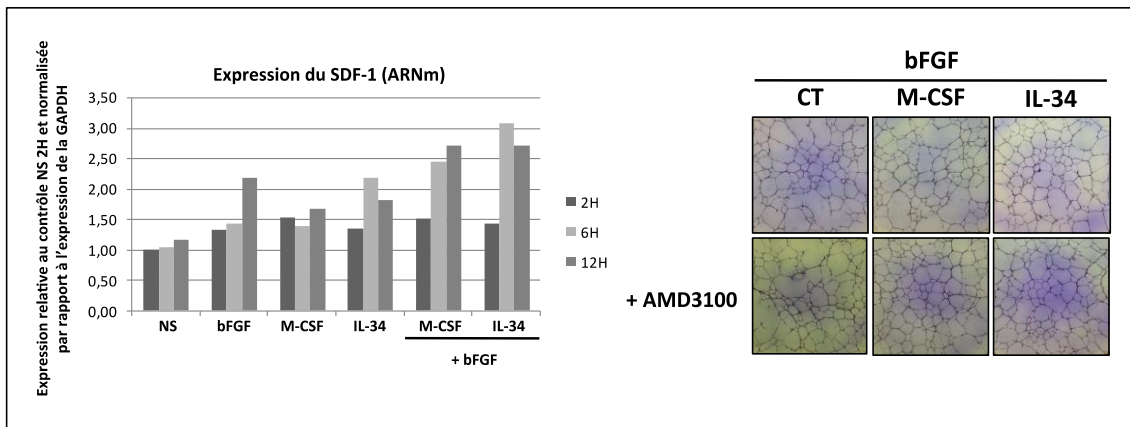


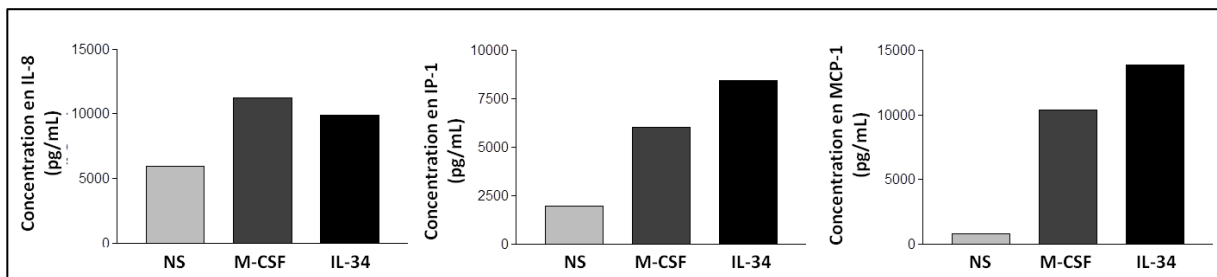
Figure 55 : Supplementary Data 7 de l'article 1.

Western blot quantification. Bar graphs represent the relative densitometric values of phosphoproteins detected in Figure 3. The luminescence detected with a Charge Couple Device camera was quantified using the GeneTools programme (Syngene, Cambridge, United Kingdom).

Par ailleurs, le M-CSF ou l'IL-34 induisent légèrement l'expression du SDF-1 au niveau transcriptionnel, mais aucune différence significative n'a été observée dans les surnageants de culture après un dosage ELISA. De plus, l'ajout de l'inhibiteur de son récepteur principal (CXCR4) n'inhibe pas la formation de tubes potentialisée par le M-CSF ou l'IL-34 (**Figure 56**). Ces effets semblent indépendants du VEGF et des MMPs puisqu'un traitement au M-CSF ou à l'IL-34 n'induit pas de variations nettes dans la production de VEGF, de MMP-2, de MMP-9 (**testé par ELISA, données personnelles**).



Un pré-traitement de monocytes ou de cellules CD34⁺ à l'IL-34 augmente leur migration et leur adhérence sur un tapis de cellules endothéliales activées au TNF- α , dans un courant de cisaillement mimant les conditions physiologiques de la circulation sanguine. Enfin, la stimulation des monocytes à l'IL-34 conduit à la production de cytokines pro-angiogéniques comme l'IL-8, le MCP-1 ou l'IP-1 (ou CXCL-10) (**Figure 57**).



2.4. Expression du M-CSFR dans les cellules d'ostéosarcome et développement tumoral

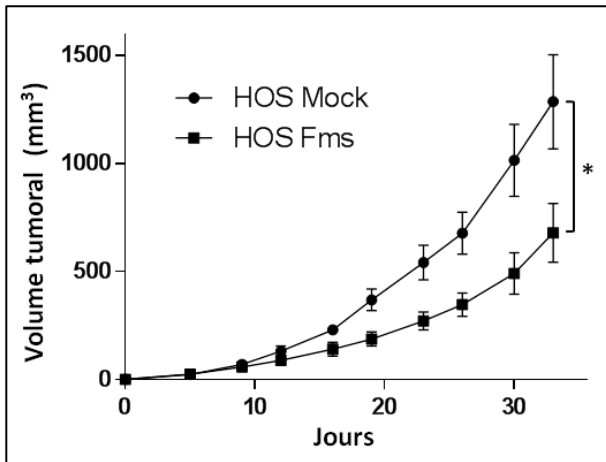


Figure 58 : Cinétique de développement tumoral de cellules HOS exprimant le récepteur au M-CSF (HOS Fms) ou exprimant le vecteur vide correspondant.

Le récepteur au M-CSF a été cloné dans un vecteur pCDNA3, puis les cellules HOS ont été modifiées par transfection stable soit avec le vecteur vide, soit avec le vecteur codant pour le M-CSFR. Les cellules ainsi modifiées sont injectées en paratibial chez les souris Rj : NMRI-nude (8 souris par groupe), et le volume tumoral est mesuré trois fois par semaine. La courbe représente les volumes tumoraux moyens \pm SEM.

Aucune des lignées d'ostéosarcome humaines testées n'expriment le M-CSFR, et la transfection stable du récepteur dans ces cellules (HOS Fms) ne semble pas stimuler de façon auto-crine ou paracrine la croissance des cellules (**Figure 48**). De plus, après injection *in vivo* en paratibiale la croissance tumorale des cellules HOS Fms est plus faible que celle des cellules modifiées avec le vecteur vide correspondant (HOS Mock) (**Figure 58**), et la microarchitecture osseuse est moins altérée, avec quelques plages d'ostéolyse mais très peu de formation ectopique osseuse (**Figure 53**).

III. Conclusions et discussion

Les cellules humaines d'ostéosarcome expriment toutes fortement le M-CSF, mais n'expriment que faiblement l'IL-34 dans des conditions conventionnelles de culture. Cependant, l'expression de l'IL-34 dépend du microenvironnement dans lequel se trouvent les cellules tumorales (**Figures 45-48**), et de façon similaire aux ostéoblastes l'expression de l'IL-34 peut être induite par le TNF- α ou l'IL-1 β (Eda *et al.* 2010). Ces résultats pourraient expliquer la différence d'expression entre la lignée HOS en culture et les biopsies de tumeurs HOS/HOS Mock du modèle *in vivo* puisque les taux d'IL-34 exprimés par les cellules tumorales pourraient être augmentés par les facteurs du microenvironnement. L'analyse réalisée à partir des biopsies incluant le microenvironnement de la tumeur, il est également possible que l'expression d'IL-34 provienne du microenvironnement. Il a été montré que l'IL-34 était fortement exprimée par les fibroblastes du microenvironnement inflammatoire de certaines maladies chroniques (Boström et Lundberg 2013; Chemel *et al.* 2012). De plus, une forte expression de l'IL-34 avait été montrée dans les tumeurs osseuses à cellules géantes tant au niveau des cellules géantes multinucléées de type ostéoclastique qu'au niveau des cellules stromales (Baud'Huin *et al.* 2010).

Nous avons pu montrer que l'IL-34 exerçait au même titre que le M-CSF un rôle pro-angiogénique probablement indirect via le recrutement des macrophages associés aux tumeurs dans le modèle d'ostéosarcome. En effet, les tumeurs qui surexpriment l'IL-34 sont plus vascularisées et possèdent un infiltrat macrophagique plus important avec une proportion plus importante de macrophages qui expriment l'arginase-1, marqueur des M2 chez la souris. Dans le modèle de plug de Matrigel®, la présence de FGF-2 seul dans l'implant induit la formation de néovaisseaux, ce qui semble cohérent étant donné le rôle pro-angiogénique de ce facteur (Cully *et al.* 2006). La présence de M-CSF ou d'IL-34 seuls induit également la formation d'un réseau vasculaire *in vivo*, alors que *in vitro* les cytokines seules n'induisent pas la formation de tubes à partir de précurseurs endothéliaux (PECs) ou de cellules endothéliales (HUVECs) mises dans une matrice de Matrigel®. De façon étonnante, l'addition de M-CSF et d'IL-34 potentialise le nombre et la taille des tubes formés en présence de FGF-2 suggérant un effet direct des cytokines sur les cellules endothéliales. Le M-CSF ou l'IL-34 contenus dans les implants de Matrigel® pourraient donc agir en synergie avec le FGF-2 présent *in situ* pour induire la vascularisation des implants. Néanmoins, étant donnée la présence faible de vaisseaux des implants contrôles de Matrigel™, il semble plus probable que le M-CSF et l'IL-34 permettent le recrutement dans les implants des macrophages qui induiront indirectement l'angiogenèse. En effet, dans le même modèle d'implants sous-cutanés de Matrigel®, Curry *et al.* ont récemment montré qu'au bout de 10 jours la présence de 100ng/mL de M-CSF dans l'implant induisait un recrutement important de ma-

crophages et une vascularisation conséquente de l'implant (Curry *et al.* 2008). Il faudrait donc réaliser un marquage des macrophages au sein de l'implant afin de conforter cette hypothèse.

Il est important de souligner la pertinence du modèle murin d'ostéosarcome utilisé, avec l'injection de cellules tumorales en site orthotopique paratibial, qui, contrairement au modèle utilisé dans l'étude très intéressante de Kubota, permet d'étudier le métabolisme osseux (Kubota *et al.* 2009). En effet, ce modèle mime les caractéristiques majeures de la pathologie humaine, avec la formation de tissu tumoral mou lobulé, d'os ectopique en feu d'herbe, et l'existence de plages d'ostéolyse avec une destruction importante de l'os au niveau de la plaque de croissance. Nous avons pu ainsi constater que de façon surprenante, la surexpression de M-CSF et d'IL-34 augmentait le volume osseux par la formation d'os ectopique. Néanmoins, les données histologiques et microtomographiques montrent la présence d'une ostéolyse massive, avec une destruction souvent totale de la plaque de croissance, en particulier dans le groupe M-CSF. Étant donné le rôle du M-CSF et de l'IL-34 dans l'ostéoclastogénèse, ces fractures ostéolytiques ne sont pas surprenantes, contrairement à la formation osseuse importante comme observée dans le groupe IL-34. Une cinétique de développement tumoral pourrait apporter quelques précisions sur ces mécanismes (Baud'Huin *et al.* 2010). En effet, une ostéoclastogénèse massive a certainement lieu dans un premier temps, faisant suite à une formation osseuse anarchique liée à la libération de nombreux facteurs ostéogéniques de la matrice osseuse. En effet, les activités ostéoclastiques et ostéoblastiques sont couplées par différents acteurs moléculaires, et le cercle vicieux qui s'établit entre les cellules tumorales et le microenvironnement osseux perturbe cet équilibre (Sims et Vrahnas 2014). L'activité ostéoclastique est augmentée, et des facteurs libérés de la matrice osseuse comme la PTH ou la PTHrP stimulent l'activité des ostéoblastes, et induisent la différenciation ostéogénique des cellules tumorales. Cependant, cette différenciation reste immature puisque les marqueurs de différenciation ostéogénique terminale comme l'ostéopontine ou l'ostéocalcine restent très peu exprimés dans l'os. En restant à un stade peu différencié les tumeurs conservent ainsi leur agressivité, leurs capacités prolifératives et de réponse aux facteurs de croissance de l'environnement (Wagner *et al.* 2011). Par ailleurs, le RPTP β/ζ est surexprimé dans 73% des biopsies analysées de patients atteints d'ostéosarcome comparé à son expression dans des biopsies d'os sain. Cette différence significative n'est pas corrélée à la survie des patients ou à d'autres paramètres cliniques, mais étant donnée l'action de l'IL-34 via le RPTP β/ζ la cytokine pourrait agir dans le microenvironnement via ce récepteur (Toledo *et al.* 2010).

Ces différents résultats montrent des effets de l'IL-34 sur des cellules du microenvironnement tumoral : vaisseaux, macrophages et cellules osseuses (ostéoblastes et ostéoclastes). En effet, contrairement au TFG- β qui joue un rôle autocrine et paracrine sur les cellules d'ostéosarcome, l'IL-34 agit sur des cellules du microenvironnement, puisque les cellules tumorales n'expriment pas le M-CSFR (Lamora *et al.* 2014). De plus, le TFG- β est également respon-

sable de la polarisation des macrophages en M2, et l'IL-34 est capable d'augmenter son expression (Ma *et al.* 2012).

En conclusion, ce travail montre dans un modèle *in vivo* d'ostéosarcome que l'IL-34 favorise la croissance tumorale et l'apparition de métastases pulmonaires, probablement grâce au recrutement des macrophages associés aux tumeurs polarisées en M2 qui permettent l'invasion tumorale, induisent l'angiogenèse au sein de la tumeur et régulent l'immunité anti-tumorale. L'IL-34 exerce un rôle pro-angiogénique direct sur les cellules endothéliales, par un mécanisme encore indéterminé indépendant du M-CSFR mais qui pourrait impliquer les glycosaminoglycanes membranaires et des protéoglycanes comme le RPTP β/ζ . Des marquages immunohistochimiques complémentaires permettraient de déterminer s'il existe des corrélations entre expression d'IL-34 d'une part et vascularisation et infiltrat macrophagique d'autre part. Ces résultats seront à confronter avec les données cliniques des patients (présence de métastases, grade de la tumeur, etc.). Des précisions sur le rôle de l'IL-34 dans le remodelage osseux lié à la pathologie de l'ostéosarcome seront également à apporter, et il faudra dans un premier temps observer la co-localisation de l'IL-34 et du RPTP β/ζ .

Chapitre 2 : le syndécan-1 est un récepteur de l'IL-34

I. Introduction et rationnel de l'étude

1. Les syndécans : des protéoglycanes membranaires complexes

1.1. La famille des syndécans : structure et expression tissulaire

Les syndécans sont des protéoglycanes transmembranaires de type I dont le squelette protéique fait 20 à 45 kDa, mais dont le poids moléculaire dépasse les 100 kDa une fois glycosylés. Leur squelette protéique possède un long domaine extracellulaire constitué d'un peptide signal N-terminal et de 3 à 5 séquences consensus au niveau des résidus sérine des motifs sérine/glycine, permettant l'attachement des chaînes d'héparane sulfate, chondroïtine sulfate/dermantane sulfate. L'unique domaine transmembranaire d'une vingtaine d'acides aminés permet l'insertion dans la membrane plasmique, et son motif très conservé GXXXG permet la dimérisation du syndécan. Le domaine C-terminal cytoplasmique (28 à 34 acides aminés) possède deux régions constantes C1 et C2 séparées par une région V variable (Tkachenko, Rhodes, et Simons 2005). Néanmoins, le syndécan est également présent sous forme soluble suite au clivage protéolytique de son domaine extracellulaire. Il existe quatre membres dans la famille des syndécans, codés par quatre gènes différents (**Figure 59**).

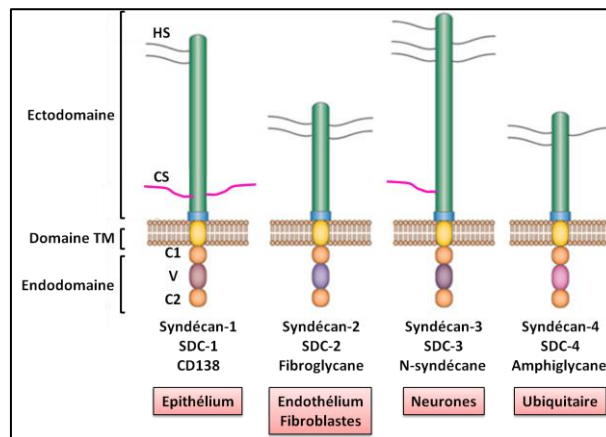


Figure 59 : La famille des syndécans.

Modifié de (Pap et Bertrand 2013).

Seuls les syndécans 1 et 3 peuvent posséder des chaînes de chondroïtine sulfate, sur des sites de glycosylation très proches de la membrane plasmique. Hormis le syndécan-4 (SDC-4 ou amphiglycane) dont l'expression est ubiquitaire, les autres syndécans sont exprimés de manière tissu-spécifique. Le syndécan-1 (SDC-1, syndécan ou CD138) est majoritairement localisé dans les tissus épithéliaux, le syndécan-2 (SDC-2 ou fibroglycane) est essentiellement exprimé dans les cellules mésenchymateuses comme les fibroblastes, et le syndécan-3 (SDC-3 ou N-syndécan) est surtout présent dans le système nerveux central et dans les cellules dérivant de la crête neurale.

Cependant, une expression du syndécan-3 est observée au niveau des plaques de croissance des os longs dans des embryons de poulet ou de souris, et ses transcrits sont très abondants dans le périoste diaphysaire alors qu'il est faiblement exprimé au niveau des ostéoblastes et des ostéocytes de l'os trabéculaire (Lamoureux *et al.* 2007).

1.2. Fonction des syndécans et signalisation

Les syndécans possèdent des fonctions biologiques variées, accordées au nombre, au type et au degré de modification de leurs chaînes de glycosaminoglycanes. Ils sont impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire, la différenciation, la migration et l'adhérence, ainsi que dans la coagulation sanguine, le métabolisme lipidique et la réponse immunitaire suite aux infections (Kwon *et al.* 2012). Les syndécans sont ainsi impliqués dans les contacts cellulaires en formant des complexes membranaires avec les molécules d'adhérence comme les intégrines. Les syndécans servent également de co-récepteurs capables de réguler l'action des facteurs de croissance comme le FGF en les liant par leurs chaînes d'héparane sulfate, formant ainsi des complexes de haute affinité. De même, le syndécan-3 possède la protéine midkine et le bFGF comme ligands dépendants de l'héparane sulfate. Les syndécans peuvent également induire directement un signal intracytoplasmique après fixation de leur ligand extracellulaire. Comme leurs domaines intracellulaires sont non-catalytiques, cette transduction passe essentiellement par la liaison de protéines impliquées dans la transduction du signal, ou par la liaison et la réorganisation de protéines du cytosquelette. En formant des complexes membranaires avec les intégrines, la multimérisation du syndécan-4 (tétramérisation ou octamérisation) induit l'adhérence focale et la formation de fibres de stress via l'activation de la PKC par la région V intracytoplasmique du syndécan-4 (Okina *et al.* 2009). Les syndécans possèdent des résidus tyrosines très conservés au sein de leurs domaines C1 et C2, qui peuvent, une fois phosphorylés, servir directement de sites de recrutement pour des protéines à domaines SH2 comme les kinases. L'action de la pléiotrophine sur la croissance des neurites, par exemple, passe par le recrutement d'effecteurs cytoplasmiques sur le syndécan-3. En effet, des protéines du cytosquelette comme la cortactine et la tubuline, ou des protéines SFKs comme Src ou Fyn se lient au domaine intracellulaire C1 du syndécan-3 et régulent l'adhérence focale et la migration cellulaire par l'activation de Src qui va par exemple phosphoryler la cortactine, et diminuer sa liaison à l'actine. Les syndécans lient aussi d'autres protéines comme la synténine au niveau de leur domaine intracellulaire C2 par l'intermédiaire de leur région globulaire PDZ (Rovira-Clavé *et al.* 2014). Ces protéines intracellulaires contiennent des domaines SH3 ou des tyrosines phosphorylées pouvant être reconnues par les résidus SH2 d'autres protéines, responsables de l'activation de voies de signalisation comme la voie MAPK, ou du remaniement du cytosquelette. Enfin, le regroupement des syndécans à la membrane permet également l'internalisation des ligands extracellulaires.

1.3. Le syndécan-1

Le squelette protéique du syndécan-1 est constitué de 310 acides aminés (32,5 kDa sans les chaînes de glycosaminoglycanes). Le domaine extracellulaire porte des chaînes d'héparane sulfate auxquelles se lient les ligands du syndécan-1, mais également des chaînes de chondroïtine sulfate. Différents facteurs comme l'hypoxie ou la transformation néoplasique semblent jouer sur la sulfatation des glycosaminoglycanes, influençant ainsi la fixation des ligands. Il existe des formes solubles du syndécan-1 obtenues par clivage de ce domaine extracellulaire juste après la membrane plasmique. Le domaine transmembranaire permet son ancrage dans la membrane, et le domaine intracytoplasmique contient deux régions constantes C1 et C2, qui interagissent avec des molécules de signalisation ou des protéines du cytosquelette (Zimmermann et David 1999). Comme pour les autres syndécans, le syndécan-1 participe à la prolifération, à la survie et à la différenciation cellulaire, mais aussi à la migration et aux remaniements du cytosquelette. Ce protéoglycane permet également les interactions avec les protéines matricielles, mais aussi les cellules environnantes grâce à son interaction avec les intégrines $\alpha\beta_3$ et $\alpha\beta_5$ (Beauvais *et al.* 2009). Il sert de co-récepteur aux bFGF et VEGF en présentant ces ligands à leurs récepteurs respectifs. Ainsi, le syndécan-1 membranaire forme un complexe multimérique avec le FGFR1, et régule l'activation des voies de signalisation, tandis que le syndécan-1 soluble sert de réservoir aux FGFs, en contrôlant leur diffusion dans la matrice extracellulaire et en les protégeant de la protéolyse (Elenius et Jalkanen 1994). La forme soluble joue donc également un rôle majeur, et son importance a été reportée dans de nombreuses pathologies notamment en cancérologie où elle favorise l'angiogenèse. Elle fixe le bFGF et le VEGF pour les transporter jusqu'aux sites de néo-vascularisation. Il faut noter que des changements dans l'expression du syndécan-1 ont pu être notés au cours du développement, de la réparation tissulaire ou de la transformation néoplasique (Pantazaka et Papadimitriou 2014). Le syndécan-1 est utilisé comme marqueur tumoral pour détecter les cellules de myélome. Sa surexpression, et plus particulièrement celle de sa forme clivée, est facteur d'agressivité et de mauvais pronostic dans certains cancers comme le myélome multiple (Nikolova *et al.* 2009; Seidel *et al.* 2000). Dans le cas du myélome multiple, la destruction du tissu osseux est une complication majeure conduisant à une morbidité sévère. Cette ostéolyse est liée à la réduction des concentrations sériques d'OPG et à une biodisponibilité accrue de RANKL induisant l'activation des ostéoclastes et la prolifération tumorale. L'OPG se fixe sur les chaînes d'héparane sulfate du syndécan-1, puis est internalisée et dégradée par les cellules de myélome multiple (Standal *et al.* 2002). De plus, il faut souligner l'implication du syndécan-1 dans la migration des monocytes induite par l'OPG (Mosheimer *et al.* 2005).

2. Le M-CSFR : un récepteur commun au M-CSF et à l'IL-34

De nombreux RTKs possèdent des co-récepteurs, comme les neuropilines pour le VEGFR, et leur activité peut être modulée par des protéoglycanes comme le syndécan-1 (FGFR, VEGFR) (Kirkbride, Ray, et Blobe 2005). Néanmoins, le M-CSF a toujours été décrit comme l'unique ligand du M-CSFR. La découverte de l'IL-34 en 2008 bouscule ce dogme, démontrant l'existence d'un deuxième ligand pour le M-CSFR (Lin *et al.* 2008). Les deux cytokines se fixent sous forme dimérique sur le récepteur, activant la phosphorylation de ses résidus tyrosines et les voies de signalisation sous-jacentes comme celle des MAPKs (**Figure 60**). Malgré une phosphorylation des mêmes résidus tyrosines du M-CSFR, Chihara et son équipe reportent des différences au niveau de l'intensité et de la cinétique de phosphorylation. En effet, l'IL-34 induit une phosphorylation plus forte et plus transitoire du M-CSFR exprimé par transfection stable dans la lignée érythroblastique TF-1.

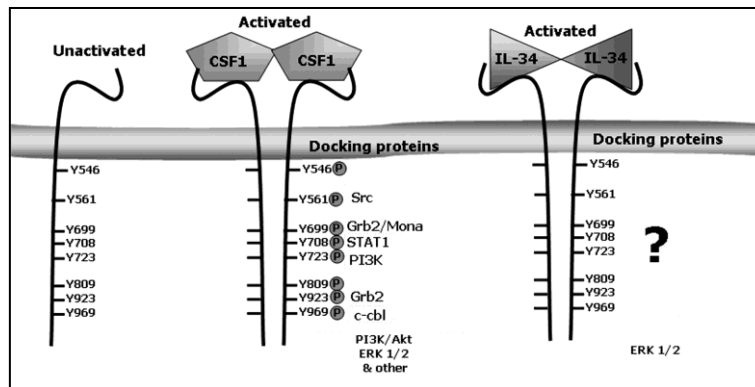


Figure 60 : Le M-CSF et l'IL-34 partagent un récepteur commun, le M-CSFR.
Tiré de (Droin et Solary 2010).

Cette différence dans le profil de phosphorylation est très nette au niveau des tyrosines 546 et 699, et se traduit par des variations au niveau de la signalisation intracellulaire, puisque l'activation des protéines FAKs est également plus intense, mais décroît rapidement en présence d'IL-34 (**Figure 61**).

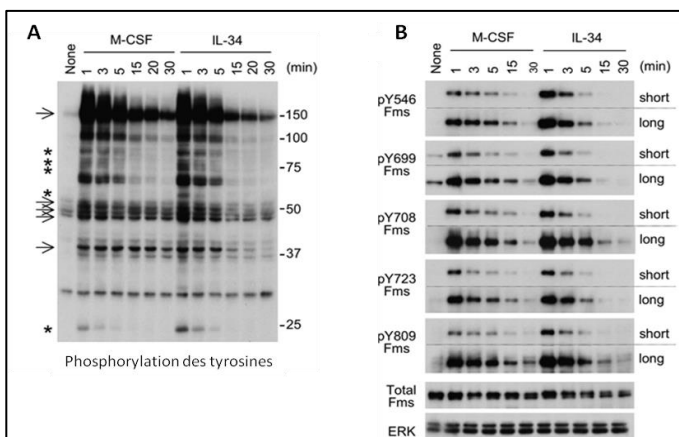


Figure 61 : Activation du M-CSFR par le M-CSF et l'IL-34 dans la lignée érythroblastique TF-1 modifiée pour exprimer le récepteur.

A) Détection de la phosphorylation totale des résidus tyrosines par un anticorps anti-phosphotyrosines. Les flèches indiquent une baisse plus rapide de la phosphorylation de certaines protéines en présence d'IL-34, dont celle du M-CSFR (150kDa), et les étoiles indiquent une phosphorylation plus importante en présence d'IL-34. B) Profil de phosphorylation de différentes tyrosines du M-CSFR en présence des cytokines jumelles.

De plus, les MAPKs semblent légèrement plus phosphorylées chez des macrophages en présence d'IL-34, à l'inverse des STATs (Chihara *et al.* 2010). Néanmoins, d'autres auteurs décrivent une activation comparable du M-CSFR et de la voie MAPK-ERK1/2 en présence de M-CSF et d'IL-34 dans une lignée de macrophages (Wei *et al.* 2010).

3. Le récepteur à activité tyrosine protéine phosphatase beta/zeta (RPTPβ/ζ)

3.1. Identification et structure du RPTPβ/ζ

Le RPTPβ/ζ, encore appelé PTPζ, RPTPβ, PTPRZ ou PTPRB est codé par le gène *PTPRZ1*, et est localisé sur le chromosome 7q31.3. Il ne doit pas être confondu avec le PTPβ, PTPRB, PTPB, ou encore VE-PTP dont le gène est localisé sur le chromosome 12q15-q21, et qui ne possède qu'un domaine à activité phosphatase, et un domaine extracellulaire composé uniquement de répétitions de 16 motifs de fibronectine III. Ce dernier régule, en fonction du flux sanguin, la fonction des cellules endothéliales (survie, migration, etc.), et l'activation des VEGFR (Matozaki *et al.* 2010). Le RPTPβ/ζ fut tout d'abord isolé en 1990 puis cloné en 1992 par Krueger and Saito sous le nom de RPTPβ (Krueger et Saito 1992). Ensuite, le PTPζ a été entièrement caractérisé par l'équipe de Levy en 1993, comme étant un protéoglycane de 250 à 300 kDa suivant son état de glycosylation (Levy *et al.* 1993). Le RPTP β/ζ possède une séquence signal de 19 acides aminés, un large domaine extracellulaire de 1616 acides aminés, un domaine transmembranaire de 26 acides aminés et un domaine cytoplasmique de 653 acides aminés. Le domaine extracellulaire N-terminal possède une partie anhydrase carbonique de 680 acides aminés idéale pour la liaison de petites molécules solubles, suivie de motifs de fibronectine III et d'un domaine espaceur. Le RPTPβ/ζ existe sous trois formes, résultant d'un épissage alternatif : une forme longue (ou PTPζ-A), une forme courte ne possédant pas les 860 acides aminés du domaine espaceur (PTPζ-B), et une forme sécrétée (PTPζ-S) composée uniquement du domaine extracellulaire du PTPζ-A, appelée aussi protéoglycane 3F8 ou DSD-1-PG, ou encore phosphacane (Canoll *et al.* 1996) (**Figure 62**). Ces trois formes possèdent des chaînes de chondroïtine sulfate essentielles à la liaison des différents ligands, bien que la forme PTPζ-B soit aussi détectée sans chaînes de glycosaminoglycane (Nishiwaki, Maeda, et Noda 1998).

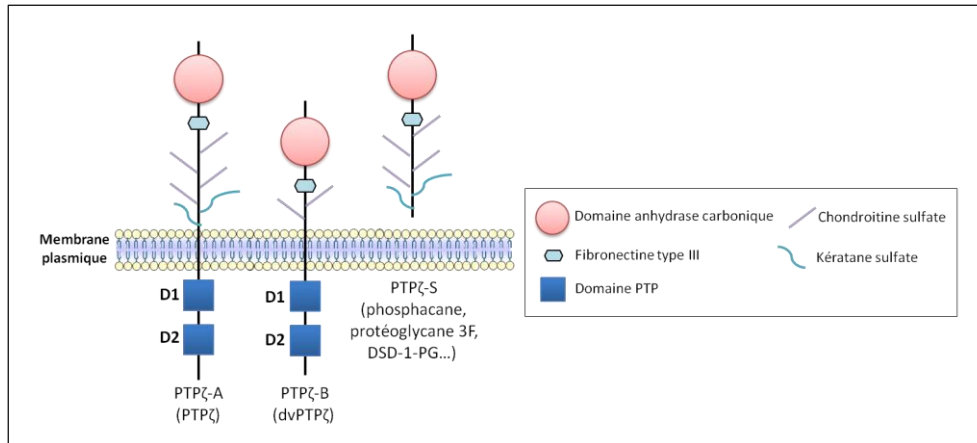


Figure 62 : Les trois formes de RPTPβ/ζ.
D1 et D2 représentent les deux domaines phosphatases.

3.2. Expression et fonction des différentes formes

Le RPTPβ/ζ est très exprimé dans le cerveau, et joue un rôle dans le développement du système nerveux central du stade embryonnaire à l'âge adulte (**Tableau 10**). En effet, le RPTPβ/ζ permet la migration des cellules neuronales, l'élongation des axones, la formation et le fonctionnement des synapses en régulant la phosphorylation et donc l'activation des canaux sodium II.

	Système nerveux central	Moelle osseuse	Appareil génital féminin	Tube digestif	Peau
M-CSFR	Progéniteurs neuronaux Microglie	Progéniteurs myéloïdes Monocytes Macrophages Ostéoclastes Cellules dendritiques	Cellules déciduales Cellules du trophoblaste Cellules placentaires Cellules pré-implantatoires de l'embryon/ oocytes	Cellules épithéliales des cryptes du côlon Cellules de Paneth	Cellules de Langerhans
RPTPβ/ζ	Neurones Microglie Astrocytes Oligodendrocytes Cellules de Schwann <i>Glioblastome</i> <i>Neuroblastome</i>	-	?	?	<i>Mélanome</i>

Tableau 10 : Expression comparée du M-CSFR et du RPTPβ/ζ dans différents tissus.

Les formes transmembranaires sont plutôt exprimées dans les cellules progénitrices gliales en prolifération tandis que le phosphacan est fortement exprimé dans les cellules gliales matures et donc plutôt lors de la différenciation cellulaire. De plus, l'expression du PTPζ-A est maintenue durant la période prénatale, et diminue rapidement après la naissance, alors que des quantités constantes de PTPζ-B sont exprimées tout au long de l'existence de la souris (Harroch *et al.* 2000).

3.3. Activation et signalisation

La pléiotrophine (PTN) est un ligand du RPTP β/ζ qui inhibe son activité phosphatase, de même que la protéine Midkine (ou *18-kDa heparin-binding protein*) (Deuel *et al.* 2002). La liaison

des ligands conduit à la dimérisation du RPTP β/ζ , et une hélice de chaque domaine phosphatase d'une unité réceptrice se déforme pour venir bloquer le site catalytique de l'autre chaîne du RPTP β/ζ . L'accès des substrats au domaine phosphatase est alors bloqué, et ces protéines restent phosphorylées sur leurs résidus tyrosines, entraînant une activation accrue du signal transmis par ces protéines (Deuel 2013). Le maintien de la phosphorylation des tyrosines de la β -caténine, de la β -adducine et de la p190RhoGAP explique ainsi les effets de la PTN sur l'adhésion cellulaire et le remaniement du cytosquelette (formation de faisceaux d'actine, migration neuronale, etc.) (Meng *et al.* 2000). Outre ces facteurs de croissance, le RPTP β/ζ est aussi capable de se lier à des protéines matricielles comme les tenascines-C et -R, ou les molécules d'adhésion (Nr-CAM, L1/Ng-CAM, F3/contactin, N-CAM, et TAG-1/axonin-1).

3.4. Un nouveau récepteur pour l'IL-34

L'équipe de Stanley a montré récemment par chromatographie d'affinité avec de l'IL-34 immobilisée à partir de lysats de cerveau de souris que le RPTP β/ζ était également capable de fixer l'IL-34 (Nandi *et al.* 2013). Certaines zones du cerveau expriment fortement l'IL-34 sans que le M-CSFR y soit exprimé, suggérant l'existence d'un autre récepteur pour l'IL-34 (Nandi *et al.* 2012). L'IL-34 est capable d'induire une signalisation indépendamment du M-CSFR via le RPTP β/ζ dans la lignée de glioblastome U251, et augmente la phosphorylation des FAKs et de la paxilline, entraînant l'inhibition de la prolifération, de la formation de colonies dans des essais clonogéniques et de la motilité cellulaire. Ces effets disparaissent après un traitement à la chondroïtinase ABC qui permet d'abraser les chaînes de chondroïtine sulfate à la surface cellulaire. La liaison de l'IL-34 au RPTP β/ζ est donc dépendante des chondroïtines sulfates (Nandi *et al.* 2013). L'expression abondante du RPTP β/ζ dans le cerveau et sa colocalisation avec l'expression de l'IL-34 pourraient expliquer le rôle prédominant de la cytokine dans le développement de la microglie (Wang *et al.* 2012; Greter *et al.* 2012). L'expression abondante du RPTP β/ζ dans les mélanomes suggère que ce protéoglycane participe au développement des mélanocytes, qui sont issus de la crête neurale (Goldmann, Otto, et Vollmer 2000). De plus, l'IL-34 est fortement exprimée par les kératinocytes et participe au maintien des cellules de Langherans dans la peau (Wang *et al.* 2012; Greter *et al.* 2012).

4. Existence d'autres récepteurs à l'IL-34 ?

Yamane *et al.* décrivent la différenciation d'un sous-type particulier de monocytes de la rate (Lin^{-c-kit}) en lien avec l'axe IL-34/M-CSFR, mais qui dépend aussi du contact avec des cellules dendritiques folliculaires, et donc d'une (des) autre(s) molécule(s) de surface. Le rôle spécifique de l'IL-34 sur ces cellules myéloïdes immatures pourrait être lié au RPTP β/ζ , dont la présence n'a pas été vérifiée chez ces types cellulaires. Cependant, la fixation requise de l'IL-34 sur le M-CSFR pour induire la différenciation cellulaire suggère plutôt l'existence d'un co-récepteur. De

plus, le contact avec les cellules DCs folliculaires est nécessaire comme le montre la co-culture en chambre, et implique l'existence d'une autre molécule, suggérant un signal co-stimulateur comme celui fourni par le CD137, un membre de la famille du TNF exprimé par les cellules dendritiques lorsqu'elles induisent directement la prolifération des cellules B (Yamane *et al.* 2014).

L'objectif de ces travaux a donc été d'étudier l'activation du M-CSFR dans des types cellulaires d'origine variée afin de regarder s'il existait une signalisation propre à l'IL-34 via ce récepteur commun au M-CSF. Ces travaux se sont en particulier focalisés sur l'existence de sites de fixation indépendants du M-CSFR et sur la caractérisation d'un autre récepteur pour l'IL-34.

II. Article n°2, résultats principaux et résultats complémentaires

1. Article n°2: BBA Molecular Cell Research (en révision)

Syndecan-1 regulates the biological activities of interleukin-34

Aude SEGALINY^{1,2}, Regis BRION^{1,2,3}, Erwan MORTIER⁴, Mike Maillasson⁴, Michel CHEREL⁵, Yannick JACQUES⁴, Benoît LE GOFF^{1,2,3}, Dominique HEYMANN^{1,2,3}

¹INSERM, UMR 957, Equipe Ligue 2012, Nantes F-44035, France

²Université de Nantes, Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, Nantes, France

³Centre hospitalier universitaire de Nantes, France

⁴INSERM, U892, CNRS, U6299, Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers, équipe Cytokines et Récepteurs en Immuno-Hémato-Cancérologie, Université de Nantes, Nantes, France

⁵INSERM, U892, CNRS, U6299, Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers, équipe Recherche en Oncologie Nucléaire, Université de Nantes, Nantes, France

Running title: Syndecan-1 is a receptor for IL-34

Corresponding author: Prof. Dominique Heymann, INSERM UMR 957, Faculty of Medicine, 1 rue Gaston Veil, 44035 Nantes cedex, France, Tel.: 33 (0) 272 641 132; Fax: 33 (0) 240 412 860 ; E-mail : dominique.heyman@univ-nantes.fr

Keywords: Chondroitin sulfate; co-receptor; cytokine bioavailability; interleukin-34; M-CSFR; syndecan-1

Background: Interleukin-34 (IL-34) is a twin cytokine for the M-CSF that displays redundant and also singular activities.

Results: IL-34 binds to chondroitin sulfates on cells lacking the M-CSFR, and syndecan-1 modulates IL-34 activities.

Conclusion: Syndecan-1 and chondroitin sulphates regulate IL-34 bioavailability and activities.

Significance: New therapies targeting the IL-34/M-CSF/M-CSFR axis must now take into account the existence of other receptors for IL-34.

ABSTRACT

IL-34 is a challenging cytokine sharing functional similarities with M-CSF through M-CSFR activation. It also plays a singular role that has recently been explained in the brain, through a binding to the receptor protein tyrosine phosphatase RPTPβ/ζ. The aim of this paper was to look for alternative binding of IL-34 on other cell types. Myeloid cells (HL-60, U-937, and THP-1) were used as cells intrinsically expressing M-CSFR, and M-CSFR was expressed in TF-1 and HEK293 cells. IL-34

binding was studied by Scatchard and binding inhibition assays, using ¹²⁵I-radiolabelled cytokines, and surface plasmon resonance. M-CSFR activation was analysed by Western blot after glycosaminoglycans abrasion and syndecan-1 overexpression. M-CSF and IL-34 induced different patterns of M-CSFR phosphorylations, suggesting the existence of alternative binding for IL-34. Binding experiments and chondroitinase treatment confirmed low affinity binding to chondroitin sulfate chains on cells lacking both M-CSFR and RPTPβ/ζ. Amongst the proteoglycans with chondroitin sulphate chains, syndecan-1 was able to modulate M-CSFR activation by sequestering IL-34 and by acting as a co-receptor for IL-34, inducing signalling pathways through the M-CSFR. This paper provides evidence of alternative binding of IL-34 to chondroitin sulfates and syndecan-1 at the cell surface, which may control IL-34 bioavailability and modulate M-CSFR activation.

INTRODUCTION

The discovery of interleukin-34 (IL-34) in 2008 upset the functional biological concepts that had been admitted for many years between Macrophage Colony-Stimulating Factor (M-CSF) and its receptor, the M-CSF receptor (M-CSFR) (1,2). Like M-CSF, IL-34 promotes the survival and proliferation of monocytes, as well as their differentiation into macrophages (3). Macrophages induced by IL-34 have phenotypes and functions that are similar to those differentiated by M-CSF, as both cytokines polarize these macrophages into immunosuppressive macrophages M2 (4). In addition, and in association with the Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand (RANKL), IL-34 can replace M-CSF to induce osteoclast formation by stimulating the proliferation and adhesion of osteoclast precursors (5). The cytokine also overlaps with the roles played by M-CSF in inflammation in degenerative bone diseases such as rheumatoid arthritis (6) and periodontal inflammation (7). All these effects are mediated by a cell-surface tyrosine kinase activity receptor, M-CSFR, encoded by the proto-oncogene *c-fms*, and also called *c-fms*, CD115 or CSF-1R (8). The homodimeric cytokines M-CSF or IL-34 bind in a close way to the extracellular domain of M-CSFR, but with a different binding mode (9, 10), leading to receptor dimerization and differential autophosphorylation on its eight tyrosine residues (11). M-CSF/M-CSFR and IL-34/M-CSFR crystals have quite a similar shape, except a higher stability for the IL-34/M-CSFR complex (12). Chihara *et al.* showed some differences in the kinetics of M-CSFR phosphorylations and in the nature and intensity of phosphorylated tyrosine residues after M-CSF or IL-34 binding, which partly explains their ability to differentially activate the monocyte/macrophage lineage (13).

M-CSFR knockout mice (14) exhibit a similar but more pronounced phenotype than *op/op* mice (14, 15) characterized by a more severe osteopetrosis and reduction of tissue macrophages. This observation suggested the existence of another ligand for the M-CSFR, and IL-34 was a perfect candidat. Although IL-34 expression under the promoter of the M-CSF gene rescues the phenotype of *op/op* mice, the cytokine also plays singular roles during brain development (16). Microglia and Langerhans cells effectively decrease dramatically in IL-34 knockout mice, as in M-CSFR de-

ficient mice, while monocytes, lymphoid tissue macrophages and dendritic cells are not affected. Besides, *op/op* mice show quite a conventional development of these cells (17-19). These results identify specific IL-34 activity during embryogenesis and tissue homeostasis, and make it possible to better understand the tissue distribution and independent activity of IL-34 (20).

IL-34 is highly expressed in both post-natal and adult brains, whereas M-CSFR expression, which is maximal in early development, dramatically decreases in adult brains (21). High expression of IL-34 despite an almost undetectable expression of its receptor suggests the existence of other receptors for the cytokine. In spite of overlapping and complementary activities between M-CSF and IL-34 through M-CSFR activation, the "M-CSF twin" may also exert specific functions independently of this receptor. The present study thus investigates a new binding mode for IL-34 that may modulate the bioavailability and/or activities of this cytokine. This paper provides evidence of syndecan-1 as a new molecular actor in the M-CSF/IL-34/M-CSFR triad and proposes one explanation for the differential activation of the M-CSFR observed after M-CSF and IL-34 stimulation.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

All experiments described in the manuscript were repeated at least three times in independent experiments and representative experiments are shown.

Reagents – Recombinant human Macrophage-Colony Stimulating Factor (M-CSF), human interleukin-34 (IL-34), human M-CSF Receptor (M-CSFR), mouse IgG1 (control isotype) and antibody anti-human M-CSFR were obtained from R&D Systems (Abingdon, UK). Diaclone (Besançon, France) kindly provided the murine B-B4 anti-syndecan 1 (CD138) IgG1 monoclonal antibody. Antibodies directed against human P-M-CSFR, P-Erk1/2, P-mTor, P-Akt and the total form of proteins were purchased from Cell Signalling (Ozyme, Saint Quentin Yvelines, France). Anti- β actin and total phosphorylated tyrosine antibodies were respectively provided by Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) and Millipore (Molsheim, France). Anti-Receptor Protein Tyrosine Phosphatase (RPTP β/ζ , C-19 clone) and HRP-conjugated secondary antibodies were ob-

tained from Santa-Cruz (CliniSciences, Nanterre, France). Chondroitin sulfate salts from shark cartilage, heparin, heparan sulfate salts and chondroitinases A, B, C were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

Cell cultures – Cell lines used in the present study were purchased from the American Tissue Cell Collection (ATCC, Molsheim, France). HEK293 (HEK), osteosarcoma MNNG/HOS (ATCC® Number: CRL-1547™) (HOS) were cultured in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Lonza, Levallois-Perret, France) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS; HyclonePerbio, Bezons, France) and 2 mmol/L of L-glutamine. HL-60, U937, THP-1 and TF-1 cell lines were maintained in RPMI (Roswell Park Memorial Institute, Lonza) supplemented with 10% FBS. In addition, TF-1 cells were cultured in the presence of 3 ng/mL of GM-CSF according to ATCC recommendations. The human U251 glioblastoma cell line was kindly provided by Dr Mylène Dorvillius (ATLAB Pharma, Nantes, France) and cultured in DMEM supplemented with 10 % FBS.

Cloning of the human M-CSFR gene and cell transfection – The human M-CSFR gene (NM_005211.3) was cloned in a pCDNA3.3 TOPO TA vector (Life Technologies, Villebon sur Yvette, France) from the cDNA from a healthy donor CD14⁺. CD14⁺ cells were initially isolated from human peripheral blood donors provided by the French blood bank institute (Etablissement Français du Sang, Nantes, France, authorization number: NTS 2000-24), by using MACS microbeads (MiltenyiBiotec, Germany) as previously described (5). The RT-PCR product was obtained using the following primer sequences: Forward 5'-CACCATGGGCC CAGGAGTTCTGCTGCT-3' and Reverse 5'-AACTCCTCAGCAGAACTGATAGTTGTTGGGCTGCA-3', and fully sequenced to check for the absence of functional mutations based on the sequences already published in the data bases.

Embryonic HEK293 cells and osteosarcoma HOS cells were transfected as described below with the pCDNA3 empty plasmid or the pCDNA3 plasmid containing the M-CSFR gene. To obtain a polyclonal population expressing the membrane M-CSFR, 5x10⁶ cells were then stained with phycoerythrin (PE) conjugated antibodies directed against the

M-CSFR and sorted out on a FACSAria III (Beckman Coulter, Villepinte, France). The cells expressing the M-CSFR were named respectively HEK M-CSFR and HOS M-CSFR. The cells transfected with the empty pCDNA3 vector were called HEK Mock and HOS Mock. Erythroblastic TF-1 cells were transfected using an Amaxa® Cell Line Nucleofector® Kit by Lonza. Cell sorting was also carried out to isolate M-CSFR expressing cells (TF-1 M-CSFR).

RNA isolation and real-time PCR – Total RNA was extracted using NucleoSpin®RNAII (Macherey Nagel, Duren, Germany) with one stage of DNase I treatment (25 units, 15 min) to prevent genomic contamination. 1 µg of total RNA was used for first strand cDNA synthesis using the ThermoScript RT-PCR System (Invitrogen). Real-time PCR was performed on 20 ng of reverse transcribed total RNA (cDNA), 300 nM of primers and 2x SYBR Green Supermix (Biorad, Marnes-la-Coquette, France). The analysis was performed according to the method described by Vandesompele *et al.* (22) using human glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as the invariant control. Standard curves were obtained using decreasing quantities of cDNA from the U251 cell line to validate the RPTPβ/ζ primers according to the MIQE guidelines (23). The sense and antisense primers used were: RPTPβ/ζ Forward: 5'-GCAGAGCTGTACTGTTGACTT-3', Reverse: 5'-TGTGCTAGCTTAACCCTGCT-3'; GAPDH Forward: 5'-TGGGTGTGAACCATGAGAAG TATG-3', Reverse: 5'-GGTGCAGGAGGCATTG CT-3'.

M-CSF and IL-34 binding assays – M-CSF and IL-34 were radio-labelled with iodine-125 (¹²⁵I) (which has specific radioactivity of around 2,000 cpm/fmol) using the chloramine T method, as described by Tejedor and Balles-ta (24) and Godard *et al.* (25). To determine the ability to bind to the cells of both cytokines, 1x10⁶ cells were incubated with increasing concentrations of iodinated M-CSF or IL-34 (up to 1nM) for 1 h at 4°C. Non-specific binding was determined in the presence of 100-fold excess of the corresponding unlabelled cytokine. Specific binding was subsequently obtained by subtraction of this non-specific binding from the total binding signal. Regression analysis of the binding data was carried out using a one-site equilibrium binding equation (Graphit; Erithacus Software, Staines, U.K.)

and data were plotted in the Scatchard coordinate system. Cross competition binding curves were obtained by adding simultaneously to the cells increasing amounts of a competitor cytokine together with a fixed, non-saturable concentration of a labelled cytokine. The inhibition curves obtained were analysed with an equation for competitive inhibition between two ligands for a common binding site. Curve fittings were performed using the Graphit data analysis programme.

Surface Plasmon Resonance (SPR) assays

– The SPR experiments were carried out on a BIAcore 2000 biosensor (BIAcore, Uppsala, Sweden). Recombinant human IL-34 (5 µg/mL, in 5 mM maleate buffer pH=6.2) was covalently linked to the dextran matrix of a CM5 sensor chip (BIAcore, Uppsala, Sweden), previously activated with an ethyl (dimethylaminopropyl) carbodiimide/ N-hydroxysuccinimide (EDC/NHS) mixture. Immobilisation levels in the 1300 RU range were then obtained. Residual active groups were inactivated by injection of ethanolamine 1M pH=8.5 for 10 min. The binding of decreasing concentrations of chondroitin sulfate salts, heparin or heparan sulfate salts was monitored, from 100 µg/mL and with a serial dilution of 1:3. Concentrations up to 500 µg/mL were assessed for the heparin and heparan sulfate. The flow rate was around 30 µL/min, and the chip was regenerated with 20 mM NaOH between each cycle. The resulting sensorgrams were fitted using BiaEval 4.1 software.

Cell binding experiments were carried out in the SPRiplex II. The SPRi biochip-CH (H0550) was activated with an EDC/NHS mixture, and 200 µg/mL IL-34 was spotted on it with a 500 µm tip for 30 min. The protein binding capacity of the IL-34 was controlled by injections of 1 and 2 µg/mL of recombinant human M-CSFR on the chip after each regeneration cycle performed with 10mM glycine pH=1.5. HEK Mock cells (2x10⁵ cells/mL) were then injected on to the chip at 20 µL/min for 10 min.

Flow-cytometry experiments – Membrane expression of the M-CSFR and syndecan-1 were assessed with flow cytometry (Cytomics FC500; Beckman Coulter). Cells were incubated with PE-conjugated anti-human M-CSFR antibody or mouse IgG1 as the control for 30 min. For syndecan-1 expression, the cells were first incubated for 90 min at 4°C with the anti-

syndecan-1 B-B4, before incubation with the PE-conjugated secondary antibody for 60 min. M-CSFR and syndecan-1 expressions were analysed using the CXP Analysis software 2.2 (Beckman Coulter).

Western Blot Analysis – The cells were collected in a RIPA buffer (10 mM Tris pH8, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.1% SDS containing a cocktail of protease and phosphatase inhibitors: 1 mM sodium orthovanadate (Na₂VO₄), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 10 mM sodium fluoride (NaF), 10 mM N-ethylmaleimide (NEM), 2 µg/ml leupeptin and 1 µg/ml pepstatin). The protein concentration was determined using a BCA (bicinchoninic acid) protein assay (Sigma Aldrich). 40 µg of total protein extracts were prepared in a Laemmli buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 5% 2-mercaptoethanol, 0.001% bromophenol blue) and then separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. After electrophoretic transfer, the immobilized-P membranes (Millipore, Molsheim, France) were blotted with the antibodies referenced in the reagents section. The membranes were then probed with secondary antibodies coupled with horseradish peroxidase. Antibody binding was visualised with a Pierce enhanced chemiluminescence (ECL) kit (ThermoScientific, Illkirch, France). The luminescence detected with a Charge Couple Device (CCD) camera was quantified using the GeneTools programme (Syngene, Cambridge, United Kingdom).

RESULTS

IL-34 and M-CSF induce differential activation of the M-CSFR – We first analysed the membrane expression of M-CSFR in various human cells with flow cytometry. As expected, the HL-60, U937 and THP-1 myeloid cell lines intrinsically expressed this cytokine receptor, in contrast to the erythroblastic TF-1, epithelial HEK293 and HOS osteosarcoma cells which did not express the M-CSFR (Fig. 1A). The lack of M-CSFR expression by the TF-1, HEK and HOS cells was confirmed by quantitative PCR (data not shown). Marked expression of the M-CSFR at the cell membrane was observed in M-CSFR transfected TF-1, HEK and HOS cells (Fig. 1A).

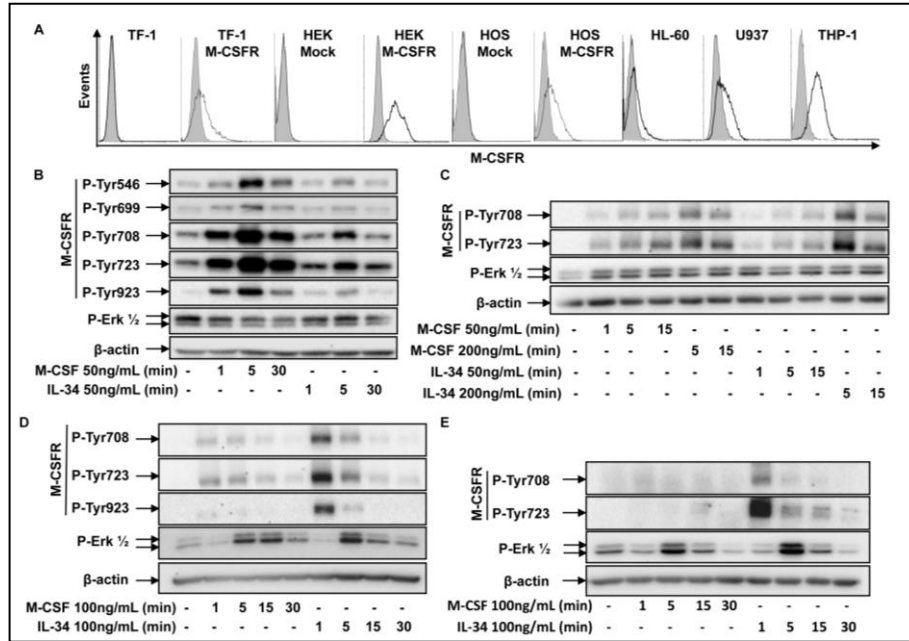


FIGURE 1. IL-34 and M-CSF differentially activate the M-CSFR. (A) M-CSFR expression on the cell membrane of human cells analysed by flow cytometry. TF-1: erythroblastic leukaemia cell line, HEK293: embryonal cell line; HOS: osteosarcoma cell line; HL-60, U-937 and THP-1: myeloid leukaemic cell lines; HOS M-CSFR and HEK M-CSFR: HOS and HEK stably overexpressing M-CSFR; HOS Mock and HEK Mock: HOS and HEK cell lines transfected with the empty control vector. The isotype IgG1 was used as the control (in grey on the graphs). (B-E) Western blot investigations of tyrosine phosphorylation patterns of M-CSFR and Erk1/2 phosphorylation after addition of 50, 100 or 200 ng/mL of IL-34 or M-CSF for 1 to 30 minutes, in HEK M-CSFR (B), HOS M-CSFR (C), TF-1 M-CSFR (D) and THP-1 cells (E).

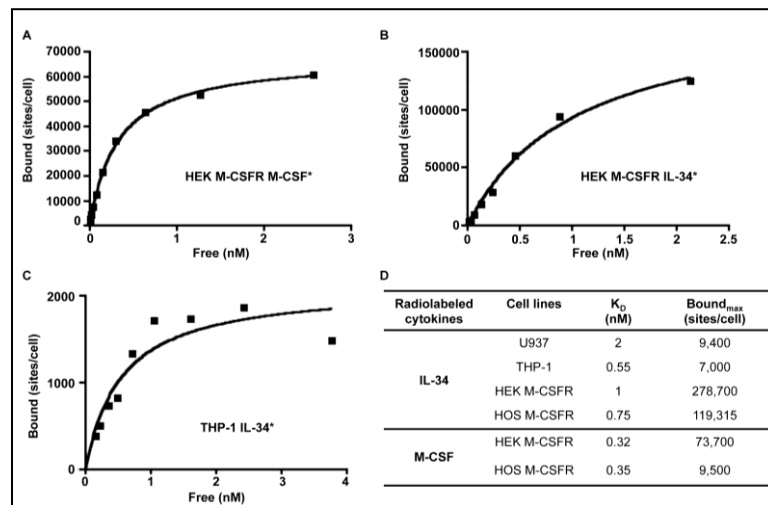


FIGURE 2. IL-34 binds to M-CSFR with a high affinity. Increasing concentrations of ¹²⁵I-labelled IL-34 (IL-34*) or ¹²⁵I-labelled M-CSF (M-CSF*) were incubated for 60 min at 4°C with 10⁶ cells and bound and unbound fractions were determined as described in "Experimental Procedures". Curve fitting was performed as described in the "Materials and Methods" section. Typical curves revealing a specific binding fraction of iodinated M-CSF on HEK M-CSFR cells (A) and of iodinated IL-34 on HEK M-CSFR (B) and THP-1 cells (C). Table summarizing the binding mode of M-CSF and IL-34 on the cells of interest (D).

Based on these observations, we investigated the functionality of the receptor by studying the cell signalling induced by M-CSF and IL-34, the two identified ligands of the M-CSFR (Fig. 1B-E). In HEK M-CSFR cells, both cytokines induced in a dose- (data not shown)

and time-dependent manner the tyrosine 546, 699, 708, 723 and 923 phosphorylation of the receptor's intracellular chains with a peak at 5 min (Fig. 1B). Similarly, M-CSF and IL-34 induced the phosphorylation of Erk1/2. Compared to M-CSF, IL-34 induced a weaker acti-

vation of the signalling pathway mediated by M-CSFR activation, at the same dose and time (Fig. 1B). In the HOS M-CSFR cells, high doses of IL-34 (200 ng/mL) appeared more efficient at inducing the phosphorylation of the M-CSFR compared to M-CSF, unlike low doses of the cytokine (50 ng/mL) (Fig. 1C). This higher activation of the M-CSFR by IL-34 was also observed with 100 ng/mL of cytokine in the TF-1 M-CSFR cells, as demonstrated by fast and huge phosphorylation levels of the M-CSFR, data in agreement with Chihara *et al.* (13) (Fig. 1D). We then investigated M-CSFR activation in the THP-1 cells, which intrinsically expressed the receptor chains (Fig. 1E). Consistent with the findings obtained with the TF-1 M-CSFR cells, the M-CSFR and MAPK downstream signalling pathways were more activated by IL-34 than by M-CSF (Fig. 1E). Overall, these data revealed that IL-34 and M-CSF differentially activated the M-CSFR signalling pathway according to the cell type studied.

IL-34 binds to HEK and HOS cells lacking the M-CSFR – In light of the differential signalling pathway induced by IL-34 and M-CSF, binding assays using ¹²⁵I-ligands were carried out on the different cell lines of interest. A saturation binding curve was obtained, which after Scatchard transformation, made it possible to estimate the affinity of IL-34 for the membrane M-CSFR. ¹²⁵I-IL34 bound all cell lines studied with an equilibrium dissociation constant around 2 nM, 0.55 nM, 1 nM and 0.75 nM for U937, THP-1, HEK M-CSFR and HOS M-CSFR cells respectively (Fig. 2A-D). As expected, ¹²⁵I-M-CSF bound to the HEK M-CSFR and HOS M-CSFR with a similarly high affinity ($K_d = 0.35$ nM). These data demonstrated the capacity of IL-34 to bind with a high affinity to cell lines expressing the M-CSFR (Fig. 2D).

We next assessed the potency of recombinant IL-34 and/or M-CSF to compete with ¹²⁵I-IL34 binding to cell surface receptors (Figs 3A, B). The results demonstrated that cold IL-34 and M-CSF differentially competed with the ¹²⁵I-IL34 binding sites expressed in the HEK M-CSFR, as revealed by the slope factor of the inhibition curves (0.8 and 2 for M-CSF and IL-34 respectively) (Fig. 3A,B). Similar results were obtained with the HOS M-CSFR cells (data not shown). ¹²⁵I-IL34 binding assays were then performed in HEK Mock cells transfected with the empty control vector that did not express the M-CSFR (Fig. 1A, Fig. 3C). Surprisingly, specific

¹²⁵I-IL34 specific binding sites were detected at the surface of the HEK Mock cells (Fig. 3C,D). This binding was characterised by a lower affinity ($K_d = 14.6$ nM) than those observed in the HEK M-CSFR (Fig. 2B).

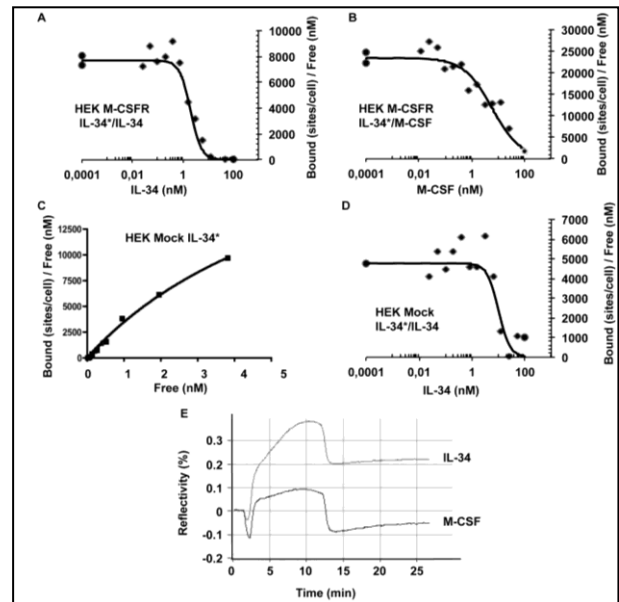


FIGURE 3. A new IL-34 binding independent of the M-CSFR. (A-B) Inhibition binding assays were carried out on HEK M-CSFR cells. After incubation of HEK M-CSFR cells with a saturating concentration of ¹²⁵I-labelled IL-34 (IL-34*), increasing doses of unlabelled IL-34 (A) or unlabelled M-CSF (B) were added to the cells. (C) Binding of ¹²⁵I-labelled IL-34 was assessed by Scatchard assay on HEK Mock cells which did not express the M-CSFR. (D) Competition assay of ¹²⁵I-labelled IL-34 with unlabelled IL-34 was performed on HEK Mock cells. (E) Binding of HEK Mock cells on IL-34 or M-CSF spotted on a chip analysed by Surface Plasmon Resonance. Curves a and b respectively represent binding on IL-34 chip and M-CSF chip.

In contrast to ¹²⁵I-IL34, ¹²⁵I-M-CSF did not bind to cells lacking the M-CSFR (Supplementary data 1). Complementary SPR experiments reinforced these results and confirmed the ability of the HEK Mock cells to bind to recombinant IL-34 spotted on a sensorchip, in contrast to recombinant M-CSF, as measured by the increasing percentage of reflectivity (Fig. 3E). The results clearly demonstrated an additional binding mode for IL-34 independent of the M-CSFR.

IL-34 binding to chondroitin sulfate chains modulates M-CSFR activation – As IL-34 bound with a relatively low affinity to cells that did not express the M-CSFR (HEK Mock and HOS Mock), cell signalling was further investigated in these cells after stimulation with a high dose of IL-34 (200ng/mL). As shown in Supplemen-

tary data 2, the profile of the phosphorylated tyrosines was not modified after IL-34 stimulation (Supplementary data 2A) and no modulation of the different signalling pathways such as mTor, Akt, (Supplementary data 2B), β -catenin, p38 and Erk1/2 (data not shown) was observed in the presence of IL-34. Consistent with the ability of IL-34 to bind to glycosaminoglycans (26), we assessed the IL-34 binding to chondroitin sulfate and heparin/heparan sulfate chains by SPR. The SPR sensorgrams revealed a low affinity binding of the various types of chondroitin sulfate to IL-34, with a K_d of 132 nM, 775 nM and 16.1 nM for chondroitin sulfates A (Fig. 4A), B (Fig. 4B) and C (Fig. 4C) respectively. On the contrary, heparin (Fig. 4D) and heparan sulfate (data not shown) were not able to bind IL-34, even with high doses of up to 500 μ g/mL.

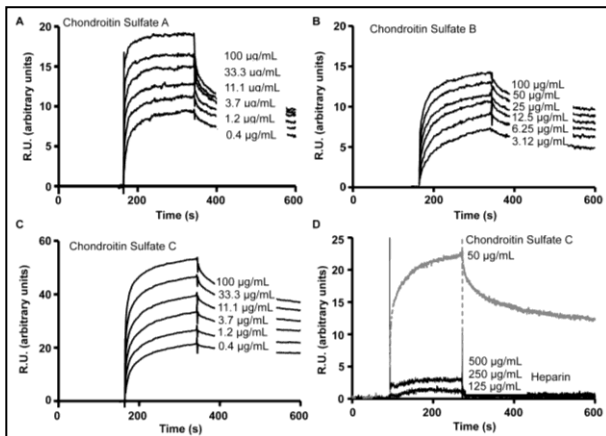


FIGURE 4. IL-34 binds to chondroitin sulfates but not to heparin/heparan sulfate chains. Interactions between IL-34 and glycosaminoglycans were studied by surface plasmon resonance technology. Chondroitin sulfate A (A), chondroitin sulfate B (B), chondroitin sulfate C (C), or heparin (D) were injected on the immobilised IL-34 using the parameters described in the "Materials and Methods" section.

In light of these data, the chondroitin sulfate chains may be behind the IL-34 binding to the HEK Mock and HOS Mock cells, as well as the differential signalling pathways induced by M-CSF or IL-34 in the HEK M-CSFR. To explore this hypothesis, HEK M-CSFR cells were then treated with chondroitinases A, B, C solution (chABC) to abrogate the chondroitin sulfates (CS) present at the cell surface prior to study of the M-CSF- or IL-34-induced signalling pathways. Consistent with the results presented in Fig. 1B, the M-CSFR was less activated after addition of 50 ng/mL of IL-34 compared to stimulation with the same dose of M-CSF, as

illustrated by the phosphorylation levels of tyrosines 546, 708 and 723 (Fig. 5A). Interestingly, the chABC treatment markedly increased the levels of M-CSFR phosphorylations induced by IL-34 as demonstrated by the phosphorylation levels of M-CSFR, whereas the response induced by M-CSF remained unchanged (Fig. 5A). Both cytokines were also pre-incubated with 1, 3 or 10 μ g/mL CS salts for 1h at 37°C prior to their addition to the HEK M-CSFR cells. The addition of CS did not modulate the M-CSF-induced signalling pathway (Fig. 5B). On the contrary, pre-incubation of CS with IL-34 led to increased phosphorylation of the receptor tyrosines 708 and 723 (Fig. 5B). Overall, these data clearly demonstrated that CS strongly regulates the biological activities of IL-34.

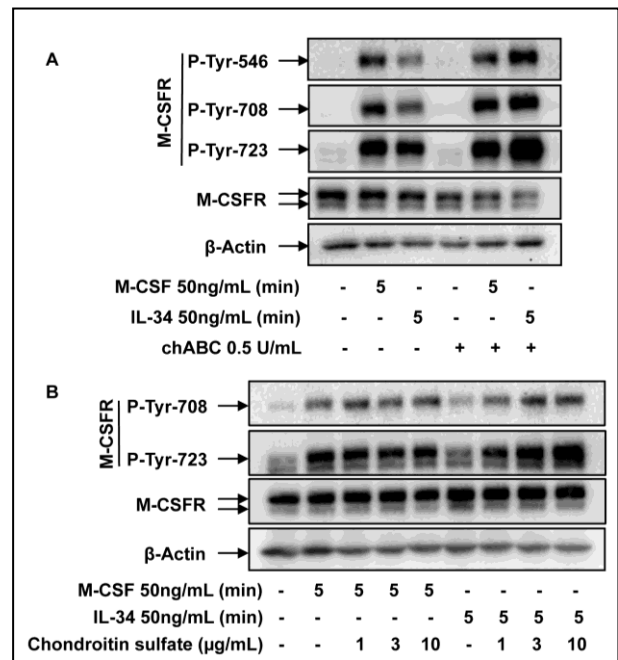


FIGURE 5. Chondroitin sulfate chains regulate the M-CSFR phosphorylations induced by IL-34. (A) HEK M-CSFR cells were treated with a mixture of chondroitinases A, B and C for 90 min at 37°C, before addition of 50 ng/mL of M-CSF or IL-34 for 5 min. (B) HEK M-CSFR cells were pre-incubated with 1, 3 or 10 μ g/mL of chondroitin sulfate salts for 90 min at 37°C before addition of 50 ng/mL of M-CSF or IL-34 for 5 min. The phosphorylation patterns of the M-CSFR were assessed by Western blot. β -actin was used as a loading control.

IL-34 binding to chondroitin sulfate is independent of the receptor protein tyrosine phosphatase β/ζ (RPTP β/ζ) – RPTP β/ζ , a proteoglycan mainly expressed in the central nervous system, was recently identified on the glioblastoma cell line U251 as another receptor for IL-34 through its CS chains, explaining the

role of the cytokine in brain development (26). We then analysed RPTPβ/ζ expression in THP-1, TF-1, HOS Mock and HEK Mock cells. The RPTPβ/ζ was not expressed at either the transcriptional or the protein levels in any of these cells in contrast to the U251 cells used as a positive control (Fig. 6). IL-34 binding to the HEK Mock and HOS Mock cells was consequently independent of RPTPβ/ζ.

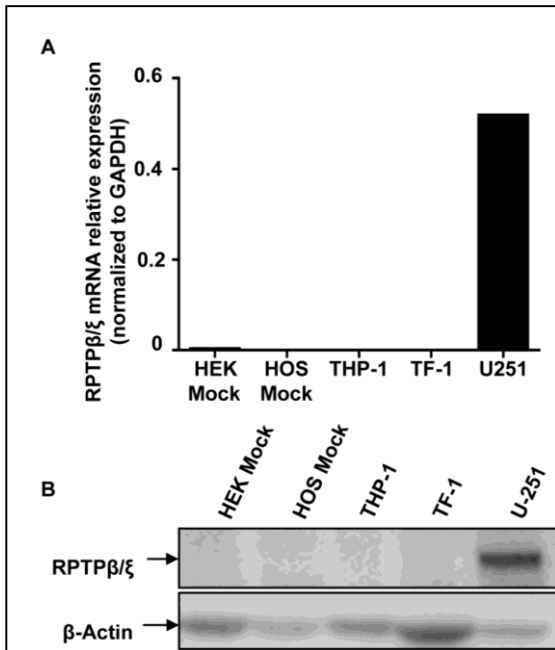


FIGURE 6. HEK, HOS, THP-1 and TF-1 do not express the receptor protein tyrosine phosphatase RPTPβ/ζ. The expression of the receptor protein tyrosine phosphatase RPTPβ/ζ was assessed in the different cells used in the study both at the transcriptional level by quantitative RT-PCR (A), where expression was normalised against GAPDH mRNA levels, and at the protein level by Western Blot, where β-actin was used as a loading control (B).

Syndecan-1 is a new receptor for IL-34 – Within the proteoglycan families, the syndecans control a lot of biological functions, such as angiogenesis, cytokine bioavailability, cell adhesion/interactions, etc. To investigate the functional involvement of syndecans in IL-34 biology, syndecans 1, 2 and 4 were individually overexpressed in the HEK M-CSFR cells and the phosphorylation levels of the M-CSFR were then analysed in the presence of IL-34. The overexpression of syndecan-1 in the HEK M-CSFR cells exacerbated the cell response to IL-34 (Fig. 7A,B).

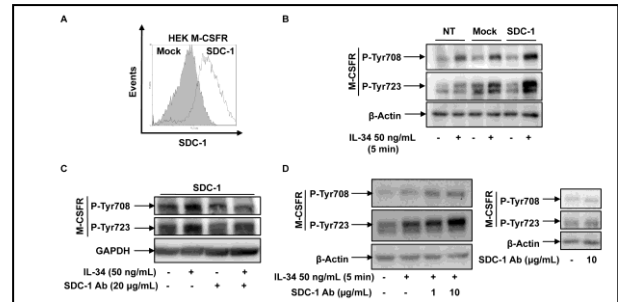


FIGURE 7. Syndecan-1 modulates the M-CSFR phosphorylations induced by IL-34. HEK M-CSFR were transiently transfected with a plasmid-encoding human syndecan-1. (A) Syndecan-1 expression analysed by flow cytometry, 48 h after transient transfection. Syndecan-1 expression in Mock M-CSFR transfected with an empty vector of syndecan-1 (empty histogram). Syndecan-1 overexpressing cells were stimulated with or without 50 ng/mL of IL-34 for 5 min (B) in the presence or absence of 20 μg/mL of syndecan-1 blocking antibody pre-incubated for 90 min (C). Similar experiments were performed on HEK M-CSFR (non transfected for syndecan-1) with or without IL-34 and/or syndecan-1 (D). M-CSFR-R phosphorylations were assessed by Western Blot, with β-actin or GAPDH as a loading control.

Indeed, this overexpression induced stronger activation of the M-CSFR when IL-34 was added compared to the effects in non-transfected cells (NT) or cells transfected with an empty plasmid (Mock), as shown by the increased phosphorylations of 708, 723 tyrosines (Fig. 7B). In contrast, the overexpression of syndecan-2 or -4 did not have any impact on M-CSFR activation by IL-34 (Supplementary data 3). The addition of a blocking syndecan-1 antibody reduced the IL-34-induced M-CSFR activation as measured by the levels of 708, 723 tyrosine phosphorylations in cells overexpressing syndecan-1 (Fig. 7C). Surprisingly, anti-syndecan-1 antibody upmodulated IL-34 effects on M-CSFR activation in non transfected cells (Fig. 7C) while it did not modulate by itself the M-CSFR phosphorylation (Fig. 7D). To confirm the involvement of syndecan-1 in the IL-34 induced signalization, the syndecan-1 gene expression was knocked down using specific human syndecan-1 siRNA. As expected, syndecan-1 siRNA significantly down regulated the expression of the membrane protein as observed by flow cytometry (Figure 8A). Similarly to the addition of a blocking syndecan-1 antibody, the knocking down of syndecan-1 upregulated the M-CSFR phosphorylations (Figure 8B). Overall, these data demonstrated that syndecan-1 was able to modulate the biological activities of IL-34 through the M-CSFR.

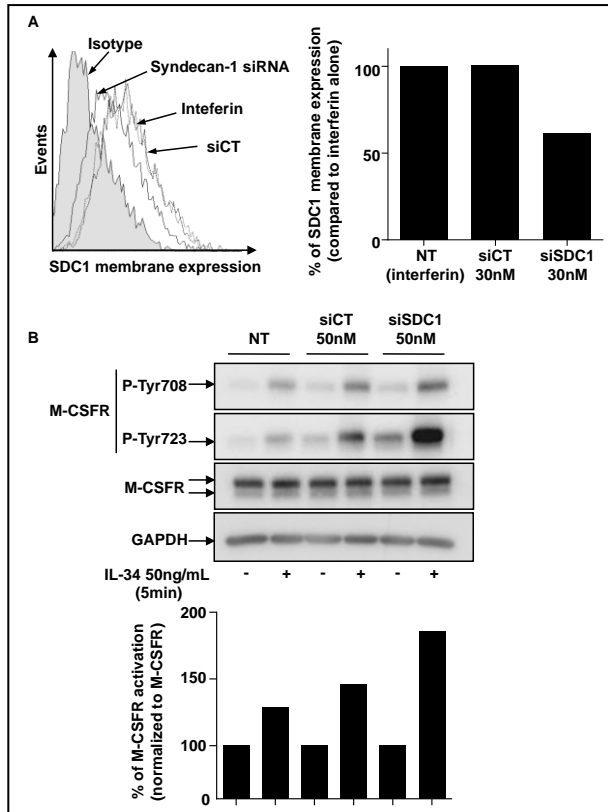


FIGURE 8: Syndecan-1 siRNA increases the phosphorylation M-CSFR induced by IL-34. The syndecan-1 gene expression was knocked down using specific human syndecan-1 siRNA. **(A)** Syndecan-1 expression analysed by flow cytometry, 48 h after siRNA transfection. **(B)** Syndecan-1 knocked down cells were stimulated with or without 50 ng/mL of IL-34 for 5 min and M-CSFR-R phosphorylations were assessed by Western Blot, with β -actin or GAPDH as a loading control. Bar graphs show relative densitometric values of pTyr-723 normalized to the M-CSFR. Similar densitometric measurements were obtained for pTyr-708, normalized to the M-CSFR or to β -actin. A representative experiment is shown.

DISCUSSION

IL-34 and M-CSF are considered as “twin” cytokines sharing common M-CSFR chains. However, while both cytokines have some functional overlaps, they also have specific activities, especially in the differentiation and activation of the monocyte/macrophage lineage, effects in favour of the existence of an additional, unknown receptor for IL-34 (13, 18-20). Recently, Nandi *et al.* (26) highlighted an alternative receptor for IL-34, the receptor protein tyrosine phosphatase β/ζ (RPTP β/ζ), known to increase tyrosine phosphorylations of downstream proteins such as β -catenin, Src family kinases, focal adhesion kinase or Erk1/2. The present manuscript characterized a new binding mode for IL-34 to cells that express neither the M-CSFR, nor the chondroitin sulfate proteoglycan RPTP β/ζ . This new IL-34 binding is

dependent on chondroitin sulfate chains, and syndecan-1 was identified as regulating the IL-34 activation levels of the M-CSFR.

RPTP β/ζ interacts with IL-34 through its chondroitin sulfate chains (26). These authors demonstrated with enzymatic treatment and CS addition that chondroitin sulfate competed with IL-34 for binding to the extracellular domain of RPTP β/ζ , revealing binding dependence on RPTP β/ζ chondroitin sulfate chains. Like RPTP β/ζ , chondroitin sulfate moieties seem to be a prerequisite for IL-34 binding to syndecan-1. RPTP β/ζ and syndecan-1 are transmembrane proteoglycans with common features. Both proteins have glycosaminoglycans on their ectodomain, and their intracellular C-terminal moiety interacts with proteins containing the PDZ domain (27, 28). The polymorphism of glycosaminoglycans attached to the protein core of syndecan-1 is due to different post-translational modifications and is directly linked to tissue-specific functions (29). Thus, the degree of glycosylation of the extracellular domain explains the versatility of the syndecan family. Syndecan-1 belongs to a proteoglycan family including four members: syndecan-1 mainly expressed in epithelial cells (30), syndecan-2 mainly present in mesenchymal cells (31), syndecan-3 mostly found in neuronal and cartilage tissues (32) and syndecan-4 which is ubiquitously expressed (33). All members of this family have heparan sulphate chains but only syndecan-1 and syndecan-3 display chondroitin sulfate chains on their protein core. Syndecan-4 has been also described, to a lesser extent, in a chondroitin sulphate-associated form (34). Based on these data, IL-34 binding to the various syndecans must be considered according to tissue context and, for instance, IL-34 binding to syndecan-3 must not be excluded in the brain, especially regarding the importance of both IL-34 and syndecan-3 in the neuronal environment.

Proteoglycans are commonly devoted to numerous biological functions (35) and it is accepted that they control the activities of a lot of cytokines/growth factors with or without glycosaminoglycan binding domains such as the heparin binding domain. Thus, the various proteoglycans serve as a reservoir for cytokines/growth factors and also modulate their induced signalling pathways by acting directly on the cytokine/growth factors-receptor interaction or by the regulation of cytokine acti-

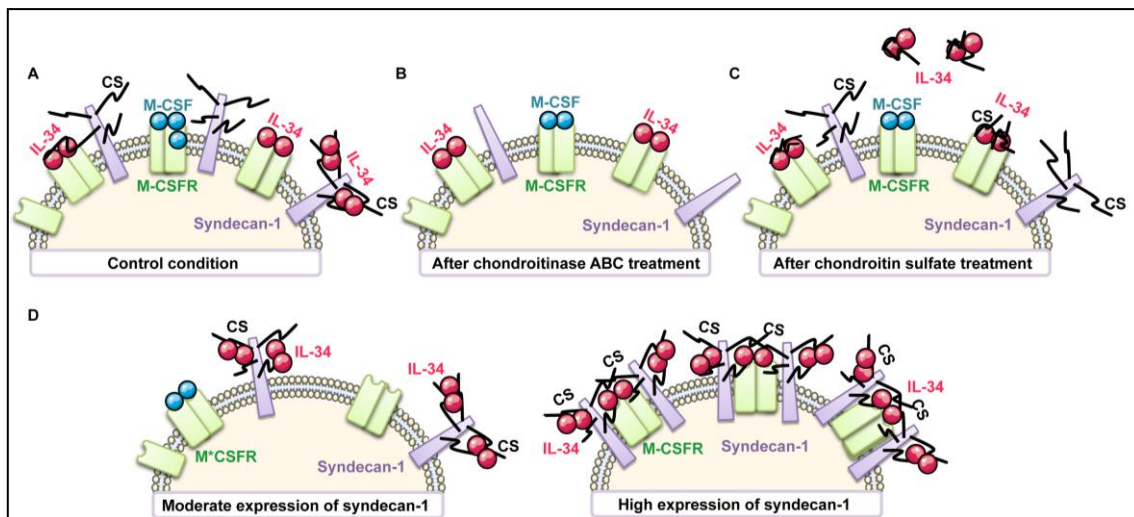


FIGURE 9. Schematic diagram summarising the functional involvement of syndecan-1 in the bioavailability and activities of IL-34. Potential interactions of IL-34 with M-CSFR, Syndecan-1 and chondroitin sulfates in control conditions (A), after chondroitinase ABC treatment (B), in the presence of exogenous chondroitin sulfate chains (C), and according to the levels of syndecan-1 expression (D).

vation and/or turnover (36). In light of these pleiotropic activities, glycosaminoglycans may be involved in the sequestration of IL-34 at the cell membrane as revealed by the chondroitinase treatment that increased the phosphorylation levels of the M-CSFR induced by IL-34 (Fig. 5A). Abrogation of membrane chondroitin sulphate chains may then reduce the trapping of IL-34 in these chains and may facilitate IL-34 binding to the M-CSFR (Fig. 9A, B). Similarly, the pre-incubation of chondroitin sulphate chains with IL-34 upmodulated the signal transduction through the M-CSFR (Fig. 5B). In this context, soluble chondroitin sulphate chains may act as competitors to their homologous membrane forms and may limit IL-34 sequestration at the cell surface, facilitating its interaction with the M-CSFR (Fig. 9C). Interestingly, soluble chondroitin sulfates compete with IL-34 for binding to the extracellular domain of RPTPβ/ζ (26), in contrast to the extracellular domain of M-CSFR (present data).

The co-receptor functions of proteoglycans are well illustrated by their interaction with the fibroblast growth factor and its receptor (FGF/FGFR). The FGF was the first growth factor identified as being dependent on heparin/heparan sulphate chains for its binding to the FGFR. The ternary complex FGF/FGFR/proteoglycans formed directly modulates the signalling pathways induced by the growth factor (37). The co-receptor role of glycosaminoglycans has then also been demonstrated for epidermal growth factor (EGF) (38),

hepatocyte growth factor (HGF) (39), vascular endothelial growth factor (VEGF) (40), Wnt factors (41) or members of the transforming growth factors (TGFs) (42). In these cases, syndecan-1, via its heparan sulphate chains, acts as a co-receptor for these growth factors. Our present results suggest that syndecan-1 may also act as a co-receptor for the tyrosine kinase M-CSFR, but through its chondroitin sulfate chains. Syndecan-1 exhibits a stimulatory or inhibitory role, probably depending on its expression level. Thus, a low/moderate level of syndecan-1 may sequester IL-34 at the cell surface through its chondroitin sulfate chains, limiting the interaction between IL-34 and the M-CSFR (Fig. 9D). The overexpression of syndecan-1 induced significant phosphorylation of the M-CSFR, reinforced by the presence of IL-34. In contrast, a blocking anti-syndecan-1 antibody significantly reduced the effects of IL-34. The enhanced activation by syndecan-1 may be explained by the membrane proximity between the M-CSFR and syndecan-1, the biodistribution of syndecan-1 at the cell membrane being directly related to its expression level. IL-34 stimulation did not induce detectable signalling pathways (Supplementary data 1) in MOCK cells expressing syndecan-1 but not the M-CSFR and the RPTPβ/ζ. These findings strengthen the hypothesis of a co-receptor for syndecan-1 on IL-34 signalling through the M-CSFR. Previous works have already identified specialised docking sites for other receptors in the

syndecan extracellular domains, such as integrins and tyrosine kinase receptors. Thus, $\alpha\beta3$ integrin and insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R) are captured by syndecan-1 to form a ternary receptor mainly expressed on tumour cells and endothelial cells and involved in the angiogenesis process (43).

Syndecan-1 can now be added to the list of key regulators of IL-34 activities in addition to M-CSFR and RPTP β/ζ , but not of M-CSF, its "twin" cytokine. By controlling IL-34 bioavailability and/or by acting as a co-receptor signalling through the M-CSFR, syndecan-1 may play a part in the role of IL-34 in development (21), bone (5) and inflammatory diseases (6). Consequently, new therapies targeting the IL-34/M-CSFR axis must now take into account the existence of other receptors for the cytokine.

Acknowledgements – The authors would like to thank the Plateforme IMPACT (SFR Bonamy, FED 4203/INSERM UMS 016/CNRS 3556, Nantes, France) where the surface plasmon resonance experiments were carried out, and Juliette Desfrancois-Noel from the cell sorting facility (Plateau de cytométrie SFR Bonamy/INSERM U892, Nantes, France) for her help in cell sorting of cells highly expressing the M-CSFR. We would also like to thank Valérie Trichet (INSERM U957, Nantes, France) for her technical and rewarding advice regarding molecular cloning of the human M-CSFR gene, and Dr Mylène Dorvillius (ATLAB Pharma, Nantes, France) for providing U251 cells.

FOOTNOTES

This work was supported by the Region des Pays de la Loire (CIMATH research project) and by the Ligue Nationale Contre le Cancer (Equipe LIGUE 2012). Aude Ségaliny received a PhD fellowship from the Region des Pays de la Loire. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

The abbreviations used are: chABC, chondroitinases A,B,C ; CS, chondroitin sulfate; IL-34, interleukin-34; M-CSF, Macrophage Colony-Stimulating Factor; M-CSFR, Macrophage Colony-Stimulating Factor Receptor; RANKL, Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand; RPTP β/ζ , Receptor Protein Tyrosine

Phosphatase beta/zeta; SPR, Surface Plasmon Resonance ;

REFERENCES

1. Bourette, R. P., and Rohrschneider, L. R. (2000) Early events in M-CSF receptor signaling. *Growth Factors* Chur Switz. 17, 155–166
2. Pixley, F. J., and Stanley, E. R. (2004) CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action. *Trends Cell Biol.* 14, 628–638
3. Lin, H., Lee, E., Hestir, K., Leo, C., Huang, M., Bosch, E., Halenbeck, R., Wu, G., Zhou, A., Behrens, D., Hollenbaugh, D. Linnemann, T., Qin, M., Wong, J., Chu, K., Doberstein, S. K., and Williams, L. T. (2008) Discovery of a Cytokine and Its Receptor by Functional Screening of the Extracellular Proteome. *Science* 320, 807–811
4. Foucher, E. D., Blanchard, S., Preisser, L., Garo, E., Ifrac, N., Guardiola, P., Delneste, Y., and Jeannin, P. (2013) IL-34 Induces the Differentiation of Human Monocytes into Immunosuppressive Macrophages. Antagonistic Effects of GM-CSF and IFN γ . *PLoS One* 8, e56045
5. Baud'Huin, M., Renault, R., Charrier, C., Riet, A., Moreau, A., Brion, R., Gouin, F., Duplomb, L., and Heymann, D. (2010) Interleukin-34 is expressed by giant cell tumours of bone and plays a key role in RANKL-induced osteoclastogenesis. *J. Pathol.* 221, 77–86
6. Chemel, M., Le Goff, B., Brion, R., Cozic, C., Berreur, M., Amiaud, J., Bougras, G., Touchais, S., Blanchard, F., Heymann, M. F., Berthelot, J. M., Verrecchia, F., and Heymann, D. (2012) Interleukin 34 expression is associated with synovitis severity in rheumatoid arthritis patients. *Ann. Rheum. Dis.* 71, 150–154
7. Boström, E. A., and Lundberg, P. (2013) The Newly Discovered Cytokine IL-34 Is Expressed in Gingival Fibroblasts, Shows Enhanced Expression by Pro-Inflammatory Cytokines, and Stimulates Osteoclast Differentiation. *PLoS ONE* 8, e81665
8. Roth, P., and Stanley, E. R. (1992) The biology of CSF-1 and its receptor. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 181, 141–167
9. Felix, J., Elegheert, J., Gutsche, I., Shkumatov, A. V., Wen, Y., Bracke, N., Pannecoucke, E., Vandenberghe, I., Devreese, B., Svergun, D. I., Pauwels, E., Vergauwen, B., and Savvides, S. N. (2013) Human IL-34 and CSF-1 establish structurally similar extracellular assemblies with their common hematopoietic receptor. *Struct. Lond. Engl.* 1993 21, 528–539
10. Ma, X., Lin, W. Y., Chen, Y., Stawicki, S., Mukhyala, K., Wu, Y., Martin, F., Bazan, J. F., and Starovasnik, M. A. (2012) Structural Basis for the Dual Recognition of Helical Cytokines IL-34 and CSF-1 by CSF-1R. *Structure* 20, 676–687
11. Sherr, C. J. (1990) Colony-stimulating factor-1 receptor. *Blood* 75, 1–12
12. Liu, H., Leo, C., Chen, X., Wong, B. R., Williams, L. T., Lin, H., and He, X. (2012) The mechanism of shared but distinct CSF-1R signaling by the non-homologous cytokines IL-34 and CSF-1. *Biochim. Biophys. Acta* 1824, 938–945
13. Chihara, T., Suzu, S., Hassan, R., Chutiwitoonchai, N., Hiyoshi, M., Motoyoshi, K., Kimura, F., and Okada, S. (2010) IL-34 and M-CSF share the receptor Fms but are not identical in biological activity and signal activation. *Cell Death Differ* 17, 1917–1927
14. Yoshida, H., Hayashi, S., Kunisada, T., Ogawa, M., Nishikawa, S., Okamura, H., Sudo, T., Shultz, L. D., and Nishikawa, S. (1990) The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature* 345, 442–444

15. Wiktor-Jedrzejczak, W., Bartocci, A., Ferrante, A. W., Jr, Ahmed-Ansari, A., Sell, K. W., Pollard, J. W., and Stanley, E. R. (1990) Total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (op/op) mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 4828–4832
16. Wei, S., Nandi, S., Chitu, V., Yeung, Y.-G., Yu, W., Huang, M., Williams, L. T., Lin, H., and Stanley, E. R. (2010) Functional overlap but differential expression of CSF-1 and IL-34 in their CSF-1 receptor-mediated regulation of myeloid cells. *J. Leukoc. Biol.* 88, 495–505
17. Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M. F., Conway, S. J., Ng, L. G., Stanley, E. R., Samokhvalov, I. M., and Merad, M. (2010) Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 330, 841–845
18. Greter, M., Lelios, I., Pelczar, P., Hoeffel, G., Price, J., Leboeuf, M., Kündig, T. M., Frei, K., Ginhoux, F., Merad, M., and Becher, B. (2012) Stroma-derived interleukin-34 controls the development and maintenance of langerhans cells and the maintenance of microglia. *Immunity* 37, 1050–1060
19. Wang, Y., Sztretter, K. J., Vermi, W., Gilfillan, S., Rossini, C., Cella, M., Barrow, A. D., Diamond, M. S., and Colonna, M. (2012) IL-34 is a tissue-restricted ligand of CSF1R required for the development of Langerhans cells and microglia. *Nat. Immunol.* 13, 753–760
20. Heymann, D. (2010) Interleukin-34: An Enigmatic Cytokine. *IBMS BoneKEy* 7, 406–413
21. Nandi, S., Gokhan, S., Dai, X.-M., Wei, S., Enikolopov, G., Lin, H., Mehler, M. F., and Richard Stanley, E. (2012) The CSF-1 receptor ligands IL-34 and CSF-1 exhibit distinct developmental brain expression patterns and regulate neural progenitor cell maintenance and maturation. *Dev. Biol.* 367, 100–113
22. Vandesompele, J., Preter, K. D., Pattyn, F., Poppe, B., Roy, N. V., Paepe, A. D., and Speleman, F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3, research0034
23. Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., and Wittwer, C. T. (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55, 611–622
24. Tejedor, F., and Ballesta, J. P. (1982) Iodination of biological samples without loss of functional activity. *Anal. Biochem.* 127, 143–149
25. Godard, A., Heymann, D., Raher, S., Anegon, I., Peyrat, M. A., Le Mauff, B., Mouray, E., Gregoire, M., Virdee, K., and Souillou, J. P. (1992) High and low affinity receptors for human interleukin for DA cells/leukemia inhibitory factor on human cells. Molecular characterization and cellular distribution. *J. Biol. Chem.* 267, 3214–3222
26. Nandi, S., Cioce, M., Yeung, Y.-G., Nieves, E., Tesfa, L., Lin, H., Hsu, A. W., Halenbeck, R., Cheng, H.-Y., Gokhan, S., Mehler, M. F., and Stanley, E. R. (2013) Receptor-type protein tyrosine phosphatase zeta is a functional receptor for interleukin-34. *J. Biol. Chem.* 288, 21972–21986
27. Fujikawa, A., Fukada, M., Makioka, Y., Suzuki, R., Chow, J. P. H., Matsumoto, M., and Noda, M. (2011) Consensus substrate sequence for protein-tyrosine phosphatase receptor type Z. *J. Biol. Chem.* 286, 37137–37146
28. Couchman, J. R. (2010) Transmembrane Signaling Proteoglycans. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 26, 89–114
29. Sanderson, R. D., and Bernfield, M. (1988) Molecular polymorphism of a cell surface proteoglycan: distinct structures on simple and stratified epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 9562–9566
30. Saunders, S., Jalkanen, M., O'Farrell, S., and Bernfield, M. (1989) Molecular cloning of syndecan, an integral membrane proteoglycan. *J. Cell Biol.* 108, 1547–1556
31. Marynen, P., Zhang, J., Cassiman, J. J., Van den Berghe, H., and David, G. (1989) Partial primary structure of the 48- and 90-kilodalton core proteins of cell surface-associated heparan sulfate proteoglycans of lung fibroblasts. Prediction of an integral membrane domain and evidence for multiple distinct core proteins at the cell surface of human lung fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 264, 7017–7024
32. Carey, D. J., Evans, D. M., Stahl, R. C., Asundi, V. K., Conner, K. J., Garbes, P., and Cizmeci-Smith, G. (1992) Molecular cloning and characterization of N-syndecan, a novel transmembrane heparan sulfate proteoglycan. *J. Cell Biol.* 117, 191–201
33. David, G., van der Schueren, B., Marynen, P., Cassiman, J. J., and van den Berghe, H. (1992) Molecular cloning of amphiglycan, a novel integral membrane heparan sulfate proteoglycan expressed by epithelial and fibroblastic cells. *J. Cell Biol.* 118, 961–969
34. Yeaman, C., and Rapraeger, A. C. (1993) Membrane-anchored proteoglycans of mouse macrophages: P388D1 cells express a syndecan-4-like heparan sulfate proteoglycan and a distinct chondroitin sulfate form. *J. Cell. Physiol.* 157, 413–425
35. Karasneh, G. A., Ali, M., and Shukla, D. (2011) An Important Role for Syndecan-1 in Herpes Simplex Virus Type-1 Induced Cell-to-Cell Fusion and Virus Spread. *PLoS ONE* 6, e25252
36. Kresse, H., and Schönherr, E. (2001) Proteoglycans of the extracellular matrix and growth control. *J. Cell. Physiol.* 189, 266–274
37. Jastrebova, N., Vanwildemeersch, M., Lindahl, U., and Spillmann, D. (2010) Heparan sulfate domain organization and sulfation modulate FGF-induced cell signaling. *J. Biol. Chem.* 285, 26842–26851
38. Takazaki, R., Shishido, Y., Iwamoto, R., and Mekada, E. (2004) Suppression of the biological activities of the epidermal growth factor (EGF)-like domain by the heparin-binding domain of heparin-binding EGF-like Growth Factor. *J. Biol. Chem.* 279, 47335–47343
39. Kemp, L. E., Mulloy, B., and Gherardi, E. (2006) Signaling by HGF/SF and Met: the role of heparan sulphate co-receptors. *Biochem. Soc. Trans.* 34, 414–417
40. Dai, J., and Rabie, A. B. M. (2007) VEGF: an essential mediator of both angiogenesis and endochondral ossification. *J. Dent. Res.* 86, 937–950
41. Niehrs, C. (2012) The complex world of WNT receptor signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 767–779
42. Rider, C. C. (2006) Heparin/heparan sulphate binding in the TGF- β cytokine superfamily. *Biochem. Soc. Trans.* 34, 458
43. Rapraeger, A. C. (2013) Synstatin: a selective inhibitor of the syndecan-1-coupled IGF1R- α v β 3 integrin complex in tumorigenesis and angiogenesis. *FEBS J.* 280, 2207–2215

2. Résultats complémentaires

Nos résultats montrent une signalisation plus faible en présence d'IL-34 dans la lignée modifiée HEK M-CSFR, tandis que les autres types cellulaires, en particulier les lignées myéloïdes et la lignée érythroblastique TF-1 modifiée pour exprimer le M-CSFR (TF-1 M-CSFR), semblent plus sensibles à l'IL-34 (**Figure 1 article 2**), avec un profil de phosphorylation similaire à celui observé par Chihara *et al.* (Chihara *et al.* 2010). Les différentes expériences de liaison (Scatchard, inhibition et résonance plasmonique de surface) démontrent en effet sur les lignées HEK et HOS non modifiées une liaison de faible affinité de l'IL-34, et non du M-CSF (**Figure 2-3, Figure 63**).

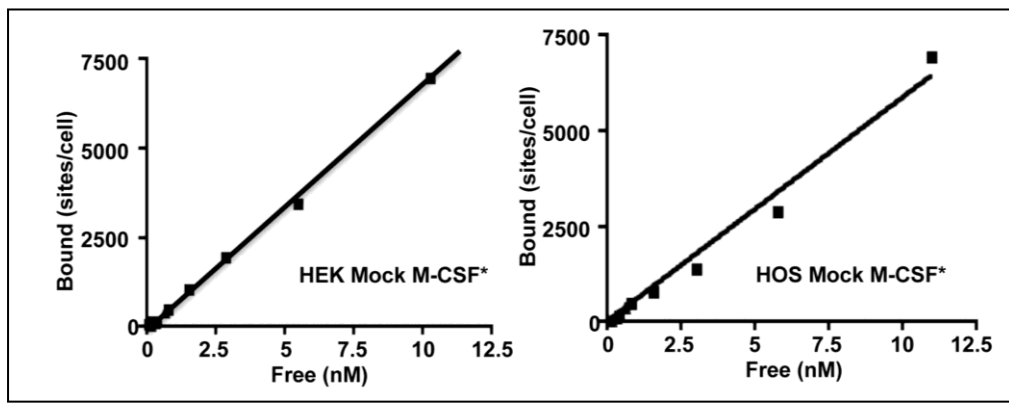


Figure 63 : Supplementary data 1 article 2.

M-CSF did not bind HEK- and HOS-Mock cells lacking the M-CSFR. Increasing concentrations of ^{125}I -labelled M-CSF (M-CSF*) were incubated for 60 min at 4°C with 10^6 cells and bound and unbound fractions were determined as described in "Experimental Procedures". Specific binding fraction of iodinated cytokines. Curve fitting was performed as described in the "Materials and Methods" section.

Cette liaison est dépendante des chaînes de chondroïtine sulfate (**Figures 4-5 article 2**) mais indépendante de l'héparine ou de l'héparane sulfate (**Figure 4 article 2**) et du RPTP β/ζ qui n'est pas exprimé par les lignées utilisées (**Figure 6 article 2**). Contrairement à l'activation importante de certaines protéines intracellulaires après fixation de l'IL-34 sur le RPTP β/ζ comme les FAKs ou la paxilline (Nandi *et al.* 2013), l'ajout de 200 ng/mL d'IL-34 sur les cellules HEK ou HOS MOCK n'induit pas la phosphorylation de FAK sur sa sérine 397 (**données personnelles**). De plus, aucune signalisation intracellulaire nette n'est mise en évidence, bien qu'il semble y avoir une légère phosphorylation des résidus tyrosines en présence de 200 ng/mL d'IL-34 entre 5 et 30 min des protéines autour de 80 et 230 kDa. L'ajout d'IL-34 semble entraîner la phosphorylation des sérines 2448 de mTOR et 473 d'Akt après 30 min dans les cellules HEK Mock (**Figure 64**).

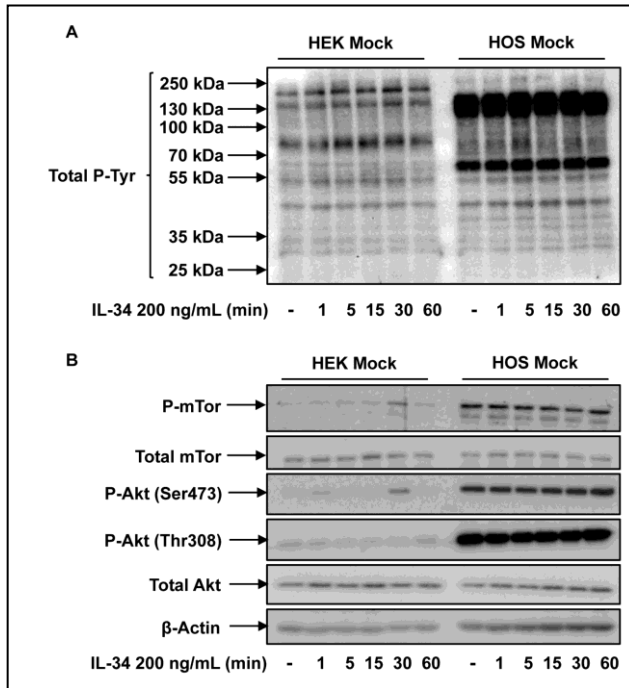


Figure 64 : Supplementary data 3 de l'article 2. IL-34 does not induce detectable signaling pathways in absence of M-CSFR and RPTPβ/ξ. (A-B) HEK Mock and HOS Mock, which did not express neither the M-CSFR nor the RPTPβ/ξ, were stimulated with 200 ng/mL of IL-34 for 1, 5, 15, 30 or 60 min. (A) The total tyrosine phosphorylation pattern or (B) the phosphorylations of mTor, and Akt were analyzed by Western blot. β-actin, total mTor and total Akt were used as loading controls.

Une approche protéomique non biaisée avait été utilisée au départ de ce travail afin de déterminer le protéoglycane fixant l'IL-34 avec une basse affinité. Pour cela, des lysats membranaires ont été préparés par ultracentrifugation selon deux techniques de lyse (tampon à base de CHAPS ou de Tris NaCl contenant du glycérol) à partir des cellules HEK MOCK et HEK M-CSFR. Les lysats ont ensuite été passés sur une puce IL-34 de résonance plasmonique de surface validée par la fixation de M-CSFR recombinant, et la fraction liée sur la puce a été récupérée et analysée par spectrométrie de masse (nano-LC-MS/MS) sur la plateforme protéomique de Rennes après digestion enzymatique liquide. Cependant, les résultats ne présentent pas un degré de confiance suffisant en accord avec les « guideline » de publications, car les quantités collectées sur la puce sont très faibles (6 ng de protéines environ), et un minimum de 5 µg de protéines est nécessaire pour effectuer la digestion dans les conditions optimales. À cela, la détection du M-CSFR a été très difficile dans les contrôles positifs, y compris en utilisant la protéine recombinante puisqu'il n'est identifié que par un seul peptide de rang 1 (une protéine est identifiée si elle possède deux peptides avec un FDR de 1%). Néanmoins, malgré la présence de nombreuses protéines contaminantes (trypsine, kératines et protéines ribosomales), certaines protéines intéressantes ressortent avec un haut niveau de confiance et au moins deux peptides identifiés de rang 1, comme l'IGF2BP1 (coverage 5,2%), les ILF-2 et 3 (coverage 6,15 et 3,58%), la chaîne 1 de la clathrine (coverage 2,03%), etc.

La famille du syndécan joue un rôle clé dans de nombreux processus biologiques et deux de ses membres, le syndécan-1 et le syndécan-3 sont couramment décrits pour porter des

chaînes de chondroïtine sulfate. Comme le syndécan-3 est principalement exprimé dans le système nerveux central, seule l'expression du syndécan-1 a été analysée sur les différents types cellulaires utilisés dans l'étude (**Tableau 11**).

Cellules	CD14 ⁺	U-937	THP-1	TF-1	HOS	HEK
Expression du syndécan-1	-+	-+	+	+	++	+++

Tableau 11 : Expression du syndécan-1 membranaire déterminée par cytométrie en flux.

-+ : expression très faible, + : expression faible, ++ : expression moyenne, +++ : forte expression.

Les HEK M-CSFR, dont les récepteurs sont peu phosphorylés en présence d'IL-34 comparé aux autres lignées sont les cellules qui expriment le plus de syndécan-1 membranaire. L'inhibition du syndécan-1 avec un anticorps bloquant ou des petits ARN interférents induit une meilleure phosphorylation du récepteur en présence d'IL-34 comparé aux contrôles (**Figures 7C-D article 2**). Cependant, la surexpression de syndécan-1 dans les cellules HEK M-CSFR conduit à la même réponse, et potentialise l'activation du M-CSFR induite par l'IL-34 (**Figures 7A-B article 2**). La surexpression des syndécans 2 et 4 dans ces mêmes cellules ne modifie pas l'activation du M-CSFR induite par l'IL-34 (**Figure 65**).

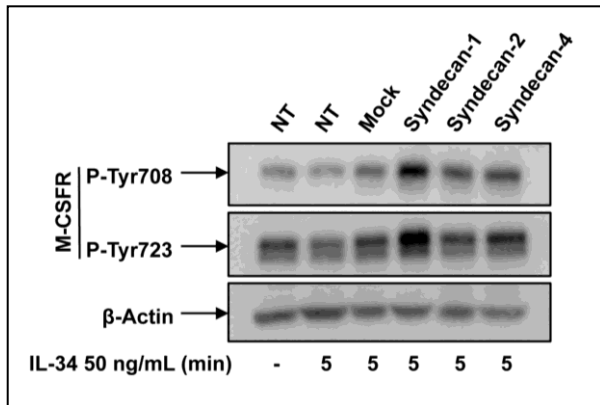


Figure 65 : Supplementary data 3 de l'article 2.

Syndecan-2 and -4 have no effect on IL-34 induced signaling pathways in contrast to Syndecan-1. HEK M-CSFR were transfected with the different forms of syndecan (1, 2 and 4). Forty eight hours after transfection, cells were stimulated with 50 ng/mL of IL-34 for 5 min, and M-CSFR tyrosine phosphorylations were assessed by Western blot. β-actin was used as a loading control. NT: Non-transfected cells; Mock: cells transfected with an empty plasmid; Syndecan-1, -2, -4: cells transfected with a plasmid coding for syndecan-1, -2 or -4.

III. Conclusions et discussion

Le syndécan-2 est capable de lier le GM-CSF, autre facteur de croissance hématopoïétique, par ses chaînes d'héparane sulfate à la surface des ostéoblastes, modulant ainsi son action mitogène et la signalisation intracellulaire (Modrowski *et al.* 2000). Néanmoins, aucun co-récepteur n'a été décrit pour le M-CSF, et le M-CSFR n'est pas connu pour former des complexes membranaires avec d'autres protéoglycanes. L'arrivée de l'IL-34 prouve que l'activation du M-CSFR peut-être modulée par d'autres récepteurs, comme le RPTP β/ζ (Nandi *et al.* 2013) et ces résultats ont permis d'identifier le syndécan-1 comme récepteur de l'IL-34, montrant que ce dernier régule l'activation du M-CSFR induite par l'IL-34. Le syndécan-1 est fortement exprimé par les cellules épithéliales, et à la différence des cellules HEK293 certains types épithéliaux expriment naturellement le M-CSFR, comme les cellules épithéliales de la glande mammaire ou de l'appareil génital féminin (Pollard *et al.* 1987; Mettler *et al.* 2004; Sapi 2004). Le syndécan-1 pourrait donc de la même façon que dans notre modèle de cellules HEK M-CSFR réguler l'activation du M-CSFR induite par l'IL-34, ou agir comme un piège de la cytokine pour favoriser l'action du M-CSF. Il n'est toutefois pas exclu que d'autres protéoglycanes possédant des chaînes de chondroïtines sulfates puissent aussi être des récepteurs à la cytokine. Ainsi, d'autres protéoglycanes pourraient moduler de façon tissu-spécifique l'activation du M-CSFR, comme le syndécan-3, ou le bétaglycan. Comme pour le RPTP β/ζ , la fixation de l'IL-34 est dépendante des chaînes de chondroïtines sulfates (Nandi *et al.* 2013) mais également de la partie protéique du syndécan-1 (**Figures 7C-D**), à la différence de la majorité des cytokines qui se fixent plutôt au niveau des chaînes d'héparane sulfate. Néanmoins, nos résultats n'ont pas permis de mettre en évidence un rôle de l'IL-34 via le syndécan-1 indépendant du M-CSFR. Une légère induction de la phosphorylation de résidus tyrosines est visible en présence de 200 ng/mL d'IL-34 entre 5 et 30 min autour de 80 kDa. Parmi les protéines ayant un poids moléculaire de 80 kDa, la PKC pourrait être une bonne candidate. En effet, la PKCa est impliquée dans la régulation et l'activation de la signalisation du syndécan-1 (**Figure 66**) (Pap et Bertrand 2013; Ruiz *et al.* 2012). De plus, les isoformes de la PKC sont bien activées par phosphorylation de résidus tyrosines au sein de leur domaine catalytique (Freeley, Kelleher, et Long 2011). L'IL-34 semble également activer mTOR et Akt (**Figure 64**), et le complexe mTORC2, composé entre autres de la protéine mTOR, induit la survie cellulaire en activant Akt, et régule le remodelage du cytosquelette en activant la PKCa. L'existence d'une signalisation par le syndécan-1 indépendante du M-CSFR n'est donc pas exclue, toutes les voies de signalisation n'ayant pas pu être analysées au cours de cette étude.

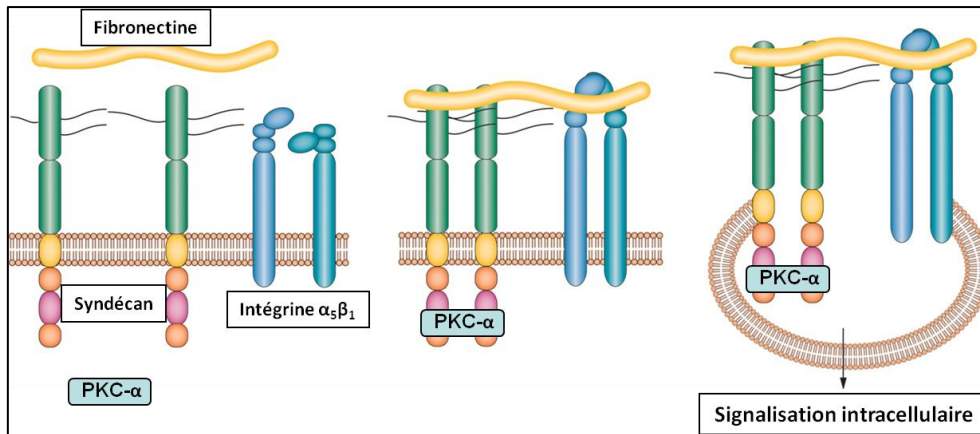


Figure 66 : La fibronectine permet la formation d'un complexe syndécans/intégrines.

La signalisation intracellulaire est induite par la dimérisation du syndécan et le recrutement de la PKC, et l'activation des intégrines. D'après (Pap et Bertrand 2013).

De la même façon que la fibronectine (**Figure 66**), la fixation de l'IL-34 sur le syndécan-1 pourrait activer les voies de signalisation sous-jacentes. L'IL-34 pourrait également faciliter la formation de complexes supramoléculaires avec le M-CSFR et d'autres partenaires membranaires qui interagissent avec le syndécan, comme les intégrines. En effet, le syndécan-1 forme déjà un complexe avec l'IGF-1R et les intégrines $\alpha_5\beta_3$ (Beauvais *et al.* 2009). La formation de complexes M-CSFR/syndécan-1 pourrait expliquer le rôle ambivalent du syndécan-1 dans l'activation du M-CSFR par l'IL-34, puisqu'exprimé normalement il jouerait le rôle de piège ou de réserve à cytokine vis-à-vis du M-CSFR, favorisant éventuellement une action directe de l'IL-34 par le syndécan-1 et/ou l'activation du M-CSFR par le M-CSF lorsque les deux cytokines sont présentes. Au contraire, lorsque le syndécan-1 est présent fortement à la membrane, il est possible d'imaginer une forte concentration des molécules de syndécan-1 autour du M-CSFR, favorisant la liaison de la cytokine présente dans le milieu extracellulaire, sa présentation au récepteur et la formation de complexes de haute affinité (**Figure 9 article 2**).

Le syndécan-1 est également exprimé de façon transitoire dans les tissus minéralisés et mésenchymateux afin de réguler leur développement et la différenciation cellulaire (Bernfield, Hinkes, et Gallo 1993). Les variations d'expression du syndécan-1 rendent donc les cellules plus ou moins sensibles à leur microenvironnement et aux changements qui s'y opèrent. Ainsi, les cellules de la moelle osseuse expriment très faiblement le syndécan-1 (K, J, et G 1999), mais cette expression peut-être régulée par des facteurs inflammatoires comme la prostaglandine PGE2 ou la vitamine D3 (Uhlin-Hansen *et al.* 1993). Ainsi, les macrophages péritonéaux recrutés au cours de l'inflammation expriment plus fortement le syndécan-1 comparé aux macrophages résidents (Yeaman et Rapraeger 1993). Par ailleurs, les cellules dendritiques immatures expriment plus de syndécan-1 que les monocytes et les macrophages (Wegrowski *et al.* 2006). L'IL-34 influençant elle-même la différenciation et la polarisation des macrophages, il est possible d'envisager que le niveau d'expression du syndécan-1 à la membrane de ces cellules myéloïdes module l'action

de l'IL-34. En fonction des facteurs présents dans le microenvironnement de la cellule, le syndécan-1 sera plus ou moins exprimé à la membrane, et la sensibilité de la cellule à l'IL-34 dépendra de cette expression. Les changements d'expression du syndécan-1 et du syndécan-4 contrôlent la maturation et la motilité des cellules dendritiques. En effet, ceux-ci sont cruciaux pour permettre leur mobilisation à travers la matrice extracellulaire, des sites périphériques vers les organes lymphoïdes. Les cellules de Langerhans qui quittent la peau et les cellules dendritiques dérivées des monocytes en cours de maturation (ajout de LPS à des monocytes différenciés 5 jours en présence d'IL-4 et de GM-CSF) voient leur expression de syndécan-1 diminuer, grâce à la surexpression de syndécan-4 qui favorise le remodelage du cytosquelette d'actine et la formation de lamellipodes (Averbeck *et al.* 2007). Ces variations du syndécan-1 à la surface des cellules de Langerhans suivant leur localisation et le contexte (inflammatoire ou non par exemple) pourraient expliquer que le M-CSF et l'IL-34 agissent différemment sur le développement de ces cellules, suivant les circonstances (Wang *et al.* 2012). Il faut également prendre en compte le clivage du syndécan-1 membranaire dans la réponse des cellules à l'IL-34, qui dépend aussi des facteurs présents dans le microenvironnement. En effet, celui-ci est accéléré par le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) via l'activation de la PKC, mais aussi par l'EGF et la thrombine (Fitzgerald *et al.* 2000). De plus, d'autres facteurs comme le SDF-1 et son récepteur CXCR-4 ou la MMP-9 sont responsables du clivage du syndécan-1 membranaire de cellules cancéreuses HeLa ou de macrophages humains (Brule *et al.* 2006).

Les protéoglycanes membranaires, notamment la famille des syndécans, favorisent la formation de gradients morphogènes en piégeant les cytokines à la surface cellulaire, induisant le recrutement de divers types cellulaires (Massena *et al.* 2010). Les cellules endothéliales expriment le syndécan-1 à leur membrane, et favorisent le recrutement des leucocytes par la création d'un gradient chimiotactique d'OPG et leur adhérence à l'endothélium (Benslimane-Ahmim *et al.* 2013). De manière similaire, l'IL-34 pourrait se fixer au niveau de l'endothélium, créant ainsi un gradient chimiotactique favorisant le recrutement des monocytes/macrophages et leur activation via le M-CSFR lors des étapes d'adhérence et d'extravasation. Des expériences de migration en chambres de Boyden sont en cours afin d'analyser si, de la même façon que l'OPG, l'IL-34 est capable d'induire la migration des cellules mononucléées du sang par l'intermédiaire du syndécan-1 (Mosheimer *et al.* 2005).

Chapitre 3 : l'IL-34 forme une cytokine hétéromérique avec le M-CSF

I. Introduction et rationnel de l'étude

1. Le M-CSF et l'IL-34 : des cytokines homodimériques

Malgré une séquence primaire ne présentant que 11% d'homologie (Garceau *et al.* 2010), l'IL-34 et le M-CSF partagent une structure tridimensionnelle très proche et commune aux cytokines à hélices. Les deux cytokines sont en effet constituées d'un ensemble de quatre hélices α principales, bien que chez l'IL-34 les deux feuillets β soient partiellement substitués par deux petites hélices α supplémentaires à l'intérieur de chaque monomère (**Figure 67**). De plus, les deux monomères d'IL-34 ne sont pas reliés par un pont disulfure, à la différence du M-CSF (Ma *et al.* 2012; Liu *et al.* 2012).

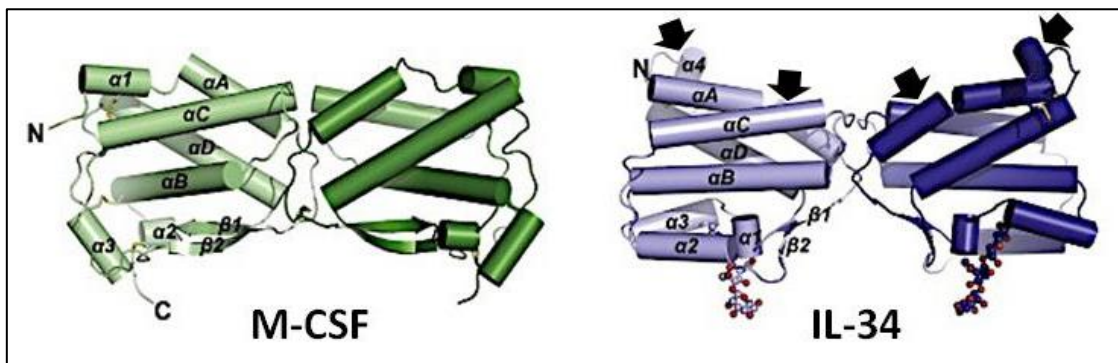


Figure 67 : Structure tridimensionnelle des cytokines jumelles homodimériques.

Les hélices α sont représentées par des cylindres, et les feuillets β par des flèches. Le M-CSF et l'IL-34 sont des cytokines hélicales existant toutes deux sous formes homodimériques, avec les monomères orientés en « tête à tête ». Les boules et bâtons représentent les N-glycosylations de l'IL-34. Les deux structures sont superposables même si l'IL-34 possède deux petites hélices α supplémentaires indiquées par les flèches noires. D'après (Ma *et al.* 2012).

2. Compétition pour le M-CSFR : caractérisation de la liaison

Le M-CSF et l'IL-34 ont été décrites comme étant en compétition sur le M-CSFR, avec néanmoins une meilleure affinité pour l'IL-34 (Lin *et al.* 2008). En effet, quelles que soient les conditions expérimentales l'affinité déterminée pour l'IL-34, ainsi que les constantes d'association et de dissociation, sont supérieures à celles déterminées pour le M-CSF (**Tableau 12**). Ces deux cytokines se fixent au niveau des mêmes domaines du M-CSFR avec une stoechiométrie 2 :2, mais au niveau d'épitopes distincts, et les interactions mises en jeu sont de nature différente, plutôt hydrophobes pour l'IL-34 et ioniques pour le M-CSF, et dans le complexe IL-34/M-CSFR certains ponts ioniques disparaissent pour être remplacés par un pont hydrogène (Liu *et al.* 2012; Ma *et al.* 2012; Felix *et al.* 2013).

Affinité pour le M-CSFR (K_D)		Constantes d'association et de dissociation		Technique utilisée	Références
M-CSF	IL-34	M-CSF	IL-34		
0.4 nM	/	/	/	125 I-M-CSF murin sur macrophages murins	Guilbert et Stanley 1986
0.048 nM	/	/	/	125 I-M-CSF humain sur NIH-3T3 fibroblastes	Rousselle et al. 1988
13.6 nM (humain) et 21.7 nM (murin)	/	/	/	ITC sur M-CSFR _{D1-D5}	Elegheert et al. 2011
34 pM	1 pM	$k_{on} = 1.7 \times 10^7 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ $k_{off} = 6.03 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	$k_{on} = 6.29 \times 10^7 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ $k_{off} = 6.55 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$	SPR avec M-CSFR/Fc dimérisé immobilisé	Lin et al. 2008
890 nM	94 nM	/	/	ITC sur M-CSFR _{D1-D3}	Ma et al. 2012
20 nM	1.6 nM	/	/	ITC sur M-CSFR _{D1-D5}	
720 nM	120 nM	$k_{on} = 7.7 \times 10^4 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ $k_{off} = 5.4 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$	$k_{on} = 2.9 \times 10^5 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ $k_{off} = 3.5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$	Bio-Layer Interferometry après immobilisation de M-CSF et d'IL-34 biotinylés sur biosenseurs coâtés avec de la streptavidine	
/	500 nM	/	/	ITC sur M-CSFR _{D1-D3}	Liu et al. 2012
/	1.3 nM	/	/	ITC sur M-CSFR _{D1-D5}	

Tableau 12 : Affinités du M-CSF et de l'IL-34 pour le M-CSFR mesurées par différentes techniques.

L'IL-34 possède une meilleure affinité que le M-CSF pour le récepteur, quelle que soit la technique utilisée. SPR : Résonance plasmonique de surface, ITC : titration calorimétrique isotherme.

Les structures cristallographiques des cytokines complexées au récepteur (IL-34/M-CSFR et M-CSF/M-CSFR) sont relativement proches. Tout d'abord, les dimères de M-CSF et d'IL-34 se fixent au M-CSFR dans une région commune, une surface concave formée par les domaines immunoglobulines D2 et D3 (**Figure 68**) (Felix *et al.* 2013).

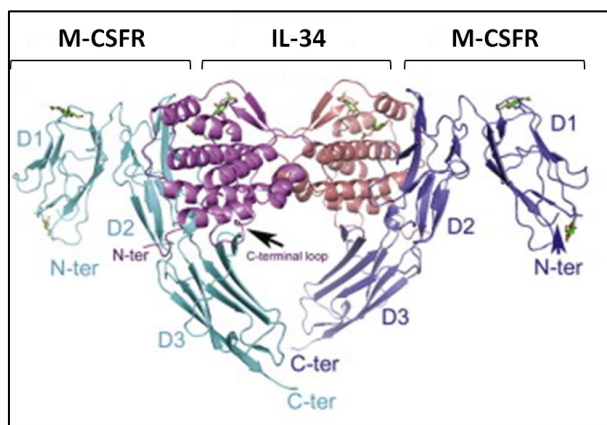


Figure 68 : Structure de l'IL-34 fixée au niveau des domaines D2-D3 du M-CSFR.
D'après (Liu *et al.* 2012).

L'IL-34 interagit avec D2 grâce à ses hélices αB , αC et une des petites hélices supplémentaires, et avec D3 par ses hélices αA , αC et l'autre petite hélice additionnelle (Ma *et al.* 2012). Cependant, lorsque les domaines D2 du M-CSFR sont superposés dans les deux cristaux, une différence de 20° est visible au niveau de la rotation du domaine D3. Le M-CSF est serré plus fortement par D2-D3, qui forme une poche plus profonde, tandis que l'interface de liaison de l'IL-34 avec D2-D3 est plus plane. C'est pourquoi l'IL-34 se lie en plus au domaine D3 par ses extrémités N- et C-terminales afin de compenser les interactions perdues avec le domaine D2 qui sont présentes dans le complexe M-CSF/M-CSFR. Les 40 acides aminés de l'extrémité C-terminale de l'IL-34 sont donc essentiels pour sa fixation au M-CSFR (Felix *et al.* 2013). Les liaisons de l'IL-34 avec D2 d'une part et D3 d'autre part jouent un rôle différent. En effet, la mutation des résidus hydrophiles impliqués dans la liaison de l'IL-34 avec D2 n'affecte pas l'activité biologique de la cytokine, contrairement à une mutation qui touche les résidus interagissant avec D3. Ces résultats suggèrent que D2 permet l'interaction de l'IL-34 avec D3, elle-même responsable de l'activation du M-CSFR (Liu *et al.* 2012). Par ailleurs, la distance de liaison entre les domaines D3-D4 de chaque monomère du M-CSFR, qui est une étape critique pour l'activation homotypique du M-CSFR, est équivalente dans les deux complexes, et fait 62 \AA pour le M-CSF/M-CSFR et 60 \AA pour l'IL-34/M-CSFR (Ma *et al.* 2012). De même que dans le complexe M-CSF/M-CSFR, la présence des domaines D4 et D5 participent aux interactions homotypiques du récepteur dans le complexe IL-34/M-CSFR, augmentant l'affinité de l'IL-34 pour le M-CSFR (Ma *et al.* 2012). Ainsi, les expériences de micro-calorimétrie montrent que la présence de D4 et D5 est à l'origine d'une liaison 7 fois plus forte de l'IL-34 sur le M-CSFR, et contribue à améliorer son affinité. En l'absence

de D4 et D5, l'IL-34 est capable de fixer les deux monomères de récepteur, alors que le M-CSF ne peut en recruter qu'un seul. Ces résultats sont cohérents avec les résultats de Chen *et al.* puis ceux d'Elegheert *et al.*, qui démontrent l'importance de la présence des domaines D4 et D5 dans l'adaptation conformationnelle du récepteur pour lier le dimère de M-CSF (Chen *et al.* 2008; Elegheert *et al.* 2011). La présence du pont disulfure entre les monomères de M-CSF lui confère une certaine rigidité, et la liaison du premier monomère entraîne une rotation du deuxième monomère dont l'orientation ne permet plus la liaison à la deuxième unité réceptrice. Au contraire, l'absence de ponts disulfures dans la liaison des monomères d'IL-34 rend la cytokine plus plastique, permettant aux monomères de se comporter de façon indépendante. Les formes d'IL-34 liées ou libres sont donc très similaires (Liu *et al.* 2012).

3. Interrelations fonctionnelles entre les deux cytokines ?

Le M-CSF et l'IL-34 peuvent être présents simultanément dans un même microenvironnement, notamment dans un contexte physiopathologique inflammatoire. L'IL-34 ayant une meilleure affinité pour le M-CSFR, sa liaison pourra être favorisée aux dépens du M-CSF. Cependant, le M-CSF semble être plus efficace dans la médiation de ses effets biologiques via le M-CSFR, puisqu'à concentrations égales il induit une meilleure survie des monocytes et forme plus d'ostéoclastes en présence du RANKL que l'IL-34 (Lin *et al.* 2008; Baud'Huin *et al.* 2010). Comme aucune étude ne reporte les conséquences de la présence des deux cytokines sur des cellules exprimant le M-CSFR comme la lignée myéloïde, nos travaux se sont attachés à étudier les interrelations fonctionnelles entre les deux cytokines, et les effets de la présence concomitante de ces deux cytokines.

II. Article n°3, résultats principaux et résultats complémentaires

1. Article n°3: soumis pour publication

IL-34 and M-CSF form a novel heteromeric cytokine and regulate the M-CSF receptor activation and localization

Aude SEGALINY^{1,2}, Régis BRION^{1,2,3}, BRULIN Bénédicte^{1,2}, MAILLASSON Mike⁴,
CHARRIER Céline^{1,2}, TELETCHEA Stéphane^{1,2}, Dominique HEYMANN^{1,2,3}

¹INSERM, UMR 957, Equipe Ligue 2012, Nantes F-44035, France

²Université de Nantes, Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, Nantes, France

³Centre hospitalier universitaire de Nantes, France

⁴INSERM, U892, CNRS, U6299, Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers, équipe Cytokines et Récepteurs en Immuno-Hémato-Cancérologie, Université de Nantes, Nantes, France

Running title: IL-34/M-CSF: a new heteromeric cytokine

Corresponding author: Prof. Dominique Heymann, INSERM UMR 957, Faculty of Medicine, 1 rue Gaston Veil, 44035 Nantes cedex, France, Tel.: 33 (0) 272 641 132; Fax: 33 (0) 240 412 860 ; E-mail : dominique.heyman@univ-nantes.fr

One-Sentence summaries: The present manuscript demonstrates the ability of IL-34 and M-CSF to form a heteromeric M-CSF/IL-34 and to differentially regulate the glycosylation state and localization receptor of the M-CSFR in the cell.

ABSTRACT: Interleukin-34 (IL-34) is a newly-discovered homodimeric cytokine that regulates, like Macrophage Colony-Stimulating Factor (M-CSF), the differentiation of the myeloid lineage through M-CSF receptor (M-CSFR) signaling pathways. To date, M-CSF and IL-34 have been considered as competitive cytokines with regard to the M-CSFR. The aim of the present work was to study the functional relationships of these cytokines on cells expressing the M-CSFR. We demonstrate that simultaneous addition of M-CSF and IL-34 led to a specific activation pattern on the M-CSFR, with higher phosphorylation of the tyrosine residues at low concentrations. Similarly, both cytokines showed an additive effect on cellular proliferation or viability. In addition, BIAcore experiments demonstrated that M-CSF binds to IL-34, and molecular docking studies predicted the formation of a heteromeric M-CSF/IL-34 cytokine. A proximity ligation assay confirmed this interaction between the cytokines. Finally, co-expression of the M-CSFR and its ligands differentially regulated M-CSFR trafficking into the cell. This study establishes a new foundation for the understanding of the functional relationship between IL-34 and M-CSF, and gives a new vision for the development of future therapeutic approaches targeting the IL-34/M-CSF/M-CSFR axis.

INTRODUCTION

Interleukin-34 (IL-34), discovered six years ago, acts as a "twin" cytokine for Macrophage Colony-Stimulating Factor (M-CSF), exerting its roles through a common receptor, the M-CSF receptor (M-CSFR) (1). M-CSF and IL-34 redundancy is illustrated by studies of M-CSFR knockout mice that exhibit a more severe phenotype (2) than op/op mice which only have an inactivation of the M-CSF gene (3,4). In addition, expression of the IL-34 gene under the M-CSF promoter rescues the phenotype of the op/op mice (5). IL-34 supports the proliferation and survival of the myeloid lineage, but also drives monocyte differentiation into macrophages (6). More specifically, macrophage polarization induced by M-CSF and IL-34 is similar, as both cytokines lead to immunosuppressive macrophages M2 (7). In addition, IL-34 promotes osteoclastic differentiation with almost the same efficiency as M-CSF (8). However, IL-34 may also display singular functions, as supported by a different expression pattern of M-CSF and IL-34 during brain development, thus suggesting complementary activities for these "twins" (9). The differential expression of M-CSF and IL-34, with respect to M-CSFR expression, may be related to their own specific activities. The recent establishment of IL-34 knockout mice showed a specific role of the cytokine in the development of Langerhans cells and microglia and is consequently in favor of specific activities for both cytokines (10). Consistent with these findings, Chihara *et al.* observed notable differences in human immunodeficiency virus (HIV) replication and activation of the MAPK pathway in macrophages differentiated with M-CSF or IL-34 (11).

Compared to M-CSF, IL-34 is reported to have better affinity for the M-CSFR, which displays intrinsic tyrosine kinase activity and activates intracellular signaling cascades after ligand binding (12). Recently, structural studies of M-CSFR activation following M-CSF or IL-34 binding have shed light on their overlapping and independent roles. IL-34 and M-CSF remain surprising glycoproteins as they do not share any homology in their primary protein sequences, despite similar folding as seen by the tridimensional structure of their homodimers. Both cytokines are effectively produced as homodimeric glycoproteins, with

a helical structure. M-CSF's tertiary structure is composed of two small β -sheets and four α -helix paired with intra-chain disulfide bonds (13). IL-34 shares M-CSF's four-helical bundle core fold, but the β -strands are shorter and partially substituted by three other short helix. Hence, IL-34 belongs to the short-chain helical cytokine family, despite the singular localization of its intra-molecular disulfide bonds (14,15). After translation and N-glycosylation in the endoplasmic reticulum, M-CSF proteins are rapidly dimerized thanks to inter-chain disulfide bonds (16). However, the main and original characteristic of IL-34 remains its structural plasticity, associated with its small and hydrophobic dimerization interface in its non-covalent dimeric form (15). These two related "twin" cytokines use a similar bivalent mode for binding to the M-CSFR, leading to homotypic M-CSFR/M-CSFR interactions through their D4 domain (17). The M-CSFR belongs to the class III receptor-type tyrosine kinases, exhibiting five Ig-like extracellular domains (18). Like M-CSF, IL-34 binds to the first three D1-D3 extracellular domains of the receptor with similar structural and mechanistic features (15). Thus, IL-34/M-CSFR and M-CSF/M-CSFR complexes are highly similar in geometry and molecular assembly (19). Although murine IL-34 and M-CSFR target and cover the same areas on the M-CSFR, distinct interactions are implemented for each ligand (12). Hydrogen-bonding interactions between M-CSF and M-CSFR are replaced by hydrophobic interactions in the IL-34/M-CSFR complex. Consequently, these differences in the interface composition result in a rearrangement of the receptor domains in the IL-34/M-CSFR complex, explaining the higher affinity of IL-34 for the M-CSFR compared to M-CSF (15).

The present study focuses on the interactions between these non-homologous ligands, and on their functional consequences on M-CSFR-expressing cells. Here, we demonstrate that simultaneous addition of M-CSF and IL-34 led to a specific activation pattern on the M-CSFR, with higher phosphorylation of the tyrosine residues at low concentrations. Similarly, both cytokines showed an additive effect on cellular proliferation or viability. The absence of the previously reported competitive effects between the "twins" can be explained by the formation of a heteromeric M-CSF/IL-34

cytokine predicted by molecular docking studies. This interaction between M-CSF and IL-34 was confirmed by surface plasmon resonance and proximity ligation assays. In addition, co-expression of the M-CSFR and its ligands differentially regulates the receptor's glycosylation state and localization in the cell. This is the first report demonstrating the direct interaction between IL-34 and M-CSF and their ability to form a new heteromeric cytokine that may play a part in the tissue homeostasis and development.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Reagents - Recombinant human glycosylated interleukin-34 (IL-34), Macrophage Colony-Stimulating Factor (M-CSF), Macrophage Colony-Stimulating Factor Receptor (M-CSFR) and Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) were obtained from R&D Systems (Abingdon, UK). Anti-human M-CSFR for immunofluorescence, flow cytometry and Western blot were respectively from eBiosciences (Paris, France), R&D and Cell Signaling (Ozyme, Saint Quentin Yvelines, France). Antibodies for Western blot directed against the phospho-tyrosines 708, 723 and 923 of M-CSFR, phospho-Erk1/2, and total Erk1/2 were purchased from Cell Signaling, and β -actin from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies were obtained from Santa-Cruz (CliniSciences, Nanterre, France). Polyclonal anti-human M-CSF antibodies were purchased from R&D Systems for blocking activities and from Life Span Biosciences (CliniSciences) for immunofluorescence. Monoclonal anti-human antibodies against IL-34 used for immunofluorescence and flow cytometry were respectively obtained from Diaclone (Besançon, France) and R&D Systems. The Alamar-Blue® cell viability assay was purchased from Life Technologies (Villebon sur Yvette, France) and the Duolink® in situ PLA Technology from Olink Bioscience. The Tartrate Resistance Phosphatase Acid assay (TRAP), cycloheximide, tunicamycin, Brefeldin A, Dimethyl sulfoxide (DMSO), saponin and other biochemical reagents were purchased from Sigma-Aldrich. Cell culture products were obtained from Lonza (Levallois-Perret, France). Prolong Gold antifade reagent (Molecular Probes) was ordered from Life Technologies. Alexa fluor 488 anti-rat, alexa fluor 568

Phalloidin and DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride) were obtained from Invitrogen (Life Technologies) and Draq 5 from Eurobio/Biostatus (Courtaboeuf, France).

Cloning of the human M-CSFR gene - The human M-CSFR gene (c-fms, Accession number NM_005211.3) was cloned in a pCDNA3.3 TOPO TA vector (Life Technologies) from the cDNA of CD14+ cells from a healthy donor (Etablissement Français du Sang, Nantes, France). RT-PCR was carried out using the following primers: Forward CAC-CATGGGCCCCAGGAGTTCTGCTG CT and Reverse AACTCCTCAGCAGA ACTGATAGTTGTTGGGCTGCA. Denaturation, hybridation and elongation cycles were done with the MiniBio-rad (Biorad, Marnes-la-Coquette, France). The M-CSFR gene was ligated in the pCDNA3.3 TOPO TA vector, then competent DH5- α Max efficiency cells (Life Technologies) were transformed. Minipreps were prepared from the colonies obtained using the Nucleospin Plasmid kit (Macherey Nagel, Duren, Germany). Plasmids containing the gene of interest were then fully sequenced to check for the presence of mutations compared to the initial sequence (SFR Bonamy, Genomic facility, University of Nantes).

Cell cultures - HEK293 (ATCC® Number: CRL-1573™), osteosarcoma MG-63 (ATCC® Number: CRL-1427™) and MNNG/HOS (ATCC® Number: CRL-1547™) cells were cultured in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Lonza) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Hyclone Perbio, Bezons, France) and 2 mmol/L L-glutamine. THP-1 (ATCC® Number: TIB-202™) were maintained in RPMI (Roswell Park Memorial Institute, Lonza) medium supplemented with 10% FBS. The TF-1 cell line (ATCC® Number: CRL-2003™) was also cultured in RPMI medium with 10% FBS, and 3 ng/mL of GM-CSF following ATCC recommendations. The modified HEK, HOS and TF-1 cell lines (Mock or M-CSFR), as well as MG-63 (clone 2A8), were respectively cultured in a selective medium with 0.5 mg/mL of G418 or 4 μ g/mL of puromycin.

CD14+ were obtained from peripheral blood mononuclear cells isolated by centrifugation over Ficoll gradient (Sigma) from the blood of five healthy donors (Etablissement Français du Sang, Nantes). CD14+ cells were magnetically

labeled with CD14 microbeads and positively selected by MACS technology (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). The purity of the cells was assessed by flow cytometry (Cytomics FC500; Beckman Coulter, Villepinte, France) and was > 95%. The CD14+ were cultured in α -MEM medium (Minimum Essential Medium, Lonza) supplemented with 10% FBS.

Stable and transient modified cell lines

Embryonic HEK293 cells and osteosarcoma MNNG/HOS cells were transfected as described below with the pCDNA3 empty plasmid or the pCDNA3 plasmid containing the M-CSFR gene. To obtain a polyclonal population expressing the M-CSFR, 5x10⁶ cells were then stained with phycoerythrin (PE) conjugated antibodies directed against the M-CSFR and sorted out on a FACSAria III (BD Biosciences, Le Pont de Claix Cedex, France). The cells expressing the M-CSFR were named respectively HEK M-CSFR and HOS M-CSFR. Cells that only transfected the empty pCDNA3 vector were called HEK Mock and HOS Mock. Erythroblastic TF-1 cells were transfected using an Amaxa® Cell Line Nucleofector® Kit from Lonza and the M-CSFR-expressing cells were isolated by flow cytometry. Cells transfected with the empty pCDNA3 vector or the vector containing the M-CSFR gene were respectively named TF-1 Mock and TF-1 M-CSFR. Osteosarcoma MG-63 cells expressing human IL-34 were obtained after cationic liposome-mediated transfection with a vector pEZ-Lv105 (GeneCopoeia, Rockville, USA) containing the human IL-34 gene (Accession Number BC029804). Clones were then obtained after serial dilutions in a selective medium containing puromycin (Sigma-Aldrich).

The pEZ-Lv105 vector (GeneCopoeia, Rockville, USA) containing either the human IL-34 gene (Accession Number BC029804) or the human M-CSF gene (Accession number NM_000757) were used for transient transfections. Transfections were performed with either jetPEI® (Polyplus-transfection, Illkirch, France) or Lipofectamine 2000™ (Life Technologies) according to the manufacturers' instructions.

Several siRNA directed against the M-CSF gene were designed using Reynolds' criteria (41) and Naito's recommendations (42). The efficiency of the siRNA designed (Eurogentec,

Angers, France) was assessed after transfection at 2.5, 5, 10 and 20 nM with interferin® (PolyPlus transfection, Saint Quentin Yvelines, France) into the M-CSF-expressing HOS cells. Down-regulation of the M-CSF gene expression was measured at 24, 48 and 72 hours by RT-qPCR and various other genes were also tested to check for off-target effects. Three validated siRNAs, siM-CSF621 (sense strand: GTA GAC CAG GAA CAG TTG A), siM-CSF758 (sense strand: GCT TCA CCA AGG ATT ATG A) and siM-CSF952 (sense strand: GCC AAG ATG TGG TGA CCA A) were then transfected into HOS M-CSFR cells. An siRNA targeting the luciferase gene (named siLucF, sense strand: CUU ACG CUG AGU ACU UCG A) was used as the negative control.

Proliferation assays - The effects of IL-34 and M-CSF on CD14+ survival/proliferation were determined by measuring metabolic activity using an Alamar Blue® assay. Forty thousand cells per well were put into 96-well plates with α -MEM and 5 or 10 ng/mL of M-CSF or IL-34 (10 wells per condition for each donor). After 3 days, Alamar blue® reagent was added and the fluorescence produced was read in the linear range (excitation 530 nm/emission 600 nm). For the TF-1 M-CSFR cell line, 104 cells per well were put (in quadruplicate) into 48-well plates with RPMI medium, 1% FBS and 5 or 10 ng/mL of cytokines. Fresh medium was added every two days, cells were harvested after 7 days of culture and counted manually. Experiments were performed three times. A similar assay was also performed on TF-1 M-CSFR cells with 25 ng/mL of cytokines in the presence of 2 μ g/mL of a M-CSF blocking antibody, where viability was measured after 7 days with an Alamar blue® assay.

Osteoclastogenesis assay - Forty-five thousand CD14+ cells per well were seeded into 96-well plates in α -MEM medium containing 10% FBS, 100 ng/mL of human RANKL and 10 or 25 ng/mL of human M-CSF or/and 12 or 25 ng/mL of human IL-34. The cell culture medium was changed every 3 days. After 10 days of culture, TRAP+ multinucleated cells containing more than 3 nuclei were considered to be osteoclasts and counted manually.

Western blot analysis - The cells were collected in a RIPA buffer (10 mM Tris pH8, 1

mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.1% SDS) containing a cocktail of protease and phosphatase inhibitors: 1 mM of sodium orthovanadate, 1 mM of phenylmethylsulfonyl fluoride and 1X of Protease Inhibitor Cocktail (Roche). The protein concentration was determined using a BCA (bicinchoninic acid) protein assay (Sigma Aldrich). 40 µg of total protein extracts were prepared in a Laemmli buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 5% 2-mercaptoethanol, 0.001% bromophenol blue) and then separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. After electrophoretic transfer, the immobilon-P membranes (Millipore, Molsheim, France) were blotted with the antibodies referenced in the reagents section. The membranes were then probed with secondary antibodies coupled with horseradish peroxidase. Antibody binding was visualized with a Pierce enhanced chemiluminescence (ECL) kit (Thermo Scientific, Illkirch, France). The luminescence detected with a Charge Couple Device (CCD) camera was quantified using the Gene Tools image analysis software (Syngene, Cambridge, United Kingdom).

Flow cytometry experiments - Human IL-34 expression was assessed by flow cytometry (Cytomics FC500; Beckman Coulter, Villepinte, France) after fixation with 4% paraformaldehyde, permeabilization with 0.5% saponin and incubation with PE conjugated anti-human IL-34 antibody for 30 min on ice. IL-34 expression was analyzed using the CXP Analysis software 2.2 (Beckman Coulter).

ELISA assay - M-CSF released into the culture medium was quantified using a Duoset ELISA assay (R&D Systems, Abingdon, UK) according to the manufacturer's instructions. All measurements were performed in triplicate and the mean values were used in this study.

RNA isolation and real-time PCR - Total RNA was extracted using NucleoSpin® RNAII (Macherey Nagel, Duren, Germany) or TRIzol reagent (Life Technologies) with a step of DNase I treatment (25 units, 15 min) to prevent genomic contamination. One microgram of total RNA was used for first strand cDNA synthesis using the ThermoScript RT-PCR System (Invitrogen). Real-time PCR was performed from 20 ng of reverse transcribed total RNA (cDNA), 300 nM of primers and 2x SYBR Green Supermix (Biorad, Marnes-la-Coquette, France). Quanti-

tative PCRs (qPCR) were carried out on a Bio-Rad CFXM System (Biorad, Marnes-la-Coquette, France). Analyses were performed according to the method described by Hellemans and Vandesompele (43) and Bustin *et al.* (44) using both human and mouse hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1 (HPRT1) as invariant controls. Standard / calibration curves were produced using decreasing quantities of cDNA to validate the primers and determine their efficiency, according to the MIQE guidelines (45). The sense and antisense primers used are as follows (human HPRT forward: TGACCTG ATTTATTTATTTGCATACC, reverse: CGAGCA AGACGTTTCAGTCTCT; mouse HPRT forward TCCTCCTCAGACCGCTTTT, reverse CCTGGTTCATCATCGCTAATC; human IL-34 forward: AATCCGTGTTGTCCCTCTTG, reverse: CAGCAGGAGCAGTACAGCAG; human M-CSF forward: GTTTGTAGACCAGGAACAGTTGAA, reverse CGCATGGTGTCTCCATTAT; mouse IL-34 forward GGACACACTTCTGGGGACA, reverse: CCAAAGCCACGTCAAGTAGG; mouse M-CSF forward ACACCCCAA TGCTAACG, reverse TGGAAAGTTCGGACA CAGG; mouse M-CSFR forward ATGCTAGGACCCAGCCTGA, reverse CCTG ACTGGAGAAGCCACTG).

Surface plasmon resonance assay - Experiments were carried out on a BIAcore 3000 instrument (Biacore, Uppsala, Sweden). Recombinant human M-CSF (5 µg/mL, in sodium acetate buffer pH=4.0) was covalently immobilized at a flow rate of 5 µl/min in the dextran matrix of a CM5 sensor chip (BIAcore) previously activated with an ethyl(dimethylaminopropyl) carbodiimide/ N-hydroxysuccinimide mixture. M-CSF was immobilized in a range of 200 RU (Resonance Units) and residual reactive sites were inactivated with ethanolamine pH=8.5 for 7 min. Binding assays were performed at 25°C in 10 mM Hepes buffer, pH 7.4, containing 0.15M NaCl and 0.005% P20 surfactant (HBS-P buffer, BIAcore) at a flow rate of 30 µl/min for all steps. A 1:2 serial dilution of recombinant human M-CSFR was done (from 50 nM to 0.78 nM) to validate the chip. Then, an increasing dose of recombinant human IL-34 (15.6; 31.25; 62.5; 125; 250; 500 nM) was tested for M-CSF/IL-34 binding. A regeneration step was made with a glycine buffer (10 mM pH=1.5) for 1min between each step, and 50 nM recombinant

human M-CSFR was assessed at the end to test whether the chip was still functional.

The resulting sensorgrams were fitted using BiaEval 4.1 software.

Molecular docking studies of IL-34 binding to M-CSF

The three-dimensional coordinates for IL-34 were extracted from the structure published by Ma *et al.* (PDB ID: 4DKD) (15). The coordinates for M-CSF and its receptor were extracted from the crystal structure proposed by Chen *et al.* (PDB ID: 3EJJ) (46). The charges and atom types were assigned using the CHARMM force field (47). IL-34 and M-CSF binding were assessed using the ZDOCK (48, 49) protein-protein docking software. The best 2000 poses were re-scored using ZRANK, a scoring function with detailed and weighted electrostatics, van der Waals and desolvation terms (50), and then clustered with an RMSD cutoff of 1 nm. As recommended, starting structures for the ligand protein were displaced from the near-native structure (48). A representative member of the most populated cluster with the highest ZSCORES was selected to illustrate the most favorable binding mode predicted. All calculations were executed on Pipeline Pilot 8.5 and analyses were performed using Accelrys Discovery Studio 3.5 (San Diego, CA, USA).

Confocal microscopy experiments

Cells were cultured in a plastic chamber on microscope glass slides (Millicell EZ Slide, Millipore, Billerica, MA, USA) as described above. Slides were coated using type I collagen for better spreading of the HEK cells. The cells were washed in PBS, fixed in 4% paraformaldehyde for 10 min at room temperature, permeabilized with triton X-100 0.1% for 20 min and incubated with a blocking solution [BSA 1% with 1% of non-immune goat serum (Dako, Les Ulis, France) and 0.05% triton] for 30 min at room temperature. The cells were incubated with either the primary antibody against M-CSFR (1/200) or the blocking solution as the negative control for 90 min at 37°C. After washings, Alexa Fluor 488 secondary antibody (1/200) was added for 60 min at room temperature. Actin filaments were stained using 546-conjugated phalloidin and nuclei stained with DAPI or Draq5.

For the PLA assay, the blocking solutions used were BSA 1% with 5% of non-immune goat or donkey serum, or a mixture of both

(Dako) and 0.1% triton. The cells were incubated with a rabbit anti-hM-CSF antibody (1/30) and a mouse anti-hIL-34 antibody (1/50) for 90 min at 37°C. The experiment was performed following Olink's instructions. Several negative controls were carried out: (i) PLA probes alone (no primary antibodies, addition of the blocking solution); (ii) a mixture of the two PLA probes (rabbit plus and mouse minus or rabbit minus and mouse plus) after incubation with only one of the primary antibodies to check for any cross-reactivity and non-specific signals; (iii) incubation of all antibodies on the MG-63 parental cells. All the controls were perfectly negative. Two positive controls were used: MG-63 cells (parental or 2A8 clone) incubated with the rabbit anti-hM-CSF or mouse anti-hIL-34 antibody before the two rabbit/mouse PLA probes (plus and minus). These two controls gave a signal in agreement with the results obtained with conventional immunocytochemistry. Slides were mounted with liquid Prolong Gold antifade reagent (Life technologies). The slides were then observed under a confocal Nikon A1 R Si microscope using a 60X NA 1.4 oil objective and the acquisitions were obtained with NIS Element (Nikon, Champigny Sur Marne, France) at room temperature. Data were then processed with FIJI software and converted to 8bit images (ImageJ, from NIH Institute, Bethesda, Maryland, USA). A Z-project was made with a maximal intensity projection. Smooth and sharpened functions were used, and brightness and contrast were adjusted in a same way for all conditions. The channels were then merged using the FIJI function.

Statistical analysis - Results were analyzed using GraphPad Prism 4.0 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Non-parametric one-way analysis of variance (Kruskal-Wallis) was done, followed by a Dunn's post hoc test. Results are given as mean \pm SEM, and results with $p < 0.05$ were considered significant.

RESULTS

M-CSF and IL-34 induced dual additive and competitive biological effects

As M-CSF and IL-34 were considered as competitive cytokines in the literature (6), we first investigated the effects of M-CSF and IL-34 alone or in combination on the M-CSFR signaling pathways. As expected, M-CSF and IL-34 induced phosphorylation of the M-CSFR

in a dose-dependent manner in HEK M-CSFR as well as the downstream signaling protein ERK1/2 (Figure 1A, B).

The combination of both cytokines differentially regulated the M-CSFR signaling compared to a single dose of M-CSF or IL-34. Interestingly, when 10 ng/mL of IL-34 or M-CSF were mutually added to low doses of both cytokines, we observed an additive effect as revealed by an increased level of M-CSFR and ERK1/2 phosphorylations compared to the cytokines alone (Figure 1A, B). The competitive effects previously described between M-CSF and IL-34 were observed at the higher concentrations, as shown for instance by decreased phosphorylation on M-CSFR

induced RANKL-associated osteoclastogenesis in a dose-dependent manner and the combination of M-CSF and IL-34 did not reveal any competitive activity between these cytokines (Supplementary Figure 2).

Both cytokines significantly up-modulated the proliferation of M-CSFR overexpressing TF-1 cells (TF-1 M-CSFR) (Figure 2A). As with the experiment conducted with CD14+ cells, a combination of 5 ng/mL of each cytokine induced significantly higher proliferation compared to 10 ng/mL of M-CSF alone, whereas this difference was not significant compared to 10 ng/mL of IL-34 (Figure 2B, $p < 0.05$). Addition of a blocking anti-M-CSF

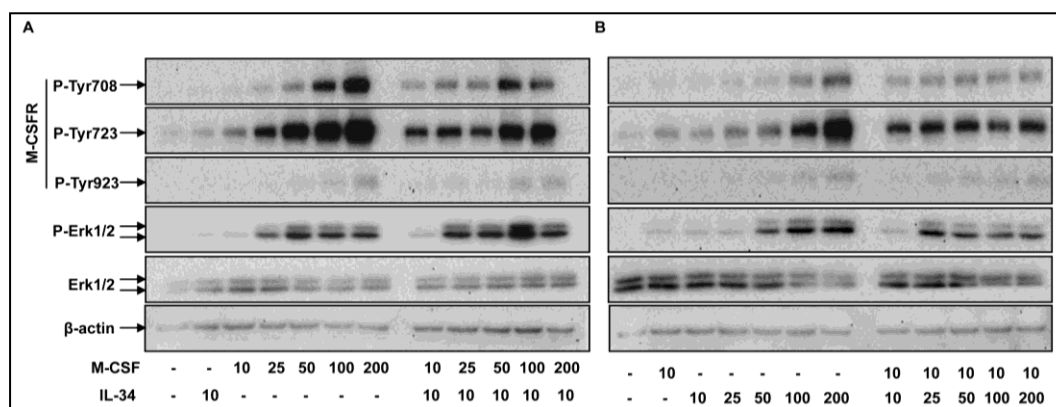


Figure 1: M-CSF and IL-34 alone or in combination differentially activate the M-CSFR. Tyrosine phosphorylation patterns (P-Tyr708, P-Tyr723, and P-Tyr923) for M-CSFR and Erk1/2 phosphorylation were investigated by Western blot after 5 min of cytokine addition to the cells. (A) HEK M-CSFR cells were cultured in serum-free conditions for 12h before stimulation for 5 min at 37°C with increasing doses of M-CSF (10, 25, 50, 100 and 200 ng/mL) combined or not with 10 ng/mL of IL-34. (B) Similarly, HEK M-CSFR cells were incubated with increasing concentrations of IL-34 (10, 25, 50, 100 and 200 ng/mL) with or without 10 ng/mL of M-CSF. β -actin was used as the loading control.

tyrosine residues and on ERK1/2 when 10 ng/mL of M-CSF were added to 200 ng/mL IL-34 on HEK M-CSFR cells (Figure 1B).

In the light of these observations, we analyzed the biological impact of the addition of both cytokines on human CD14+ monocytes (Supplementary Figure 1) and TF-1 M-CSFR cell viability (Figure 2). Consistent with previous findings (6), IL-34 and M-CSF similarly increased CD14+ cell viability in a dose-dependent manner (Supplementary Figure 1A). Taken individually, the combination of 5 ng/mL M-CSF and 5 ng/mL IL-34 led to higher viability than an equivalent cumulated dose (10 ng/mL) of IL-34 but not of M-CSF (Supplementary Figure 1B-F). In addition, as shown previously (8), M-CSF and IL-34 similarly

antibody reduced the proliferation of TF-1 M-CSFR cells, thus revealing autocrine M-CSF production by the cells (Figure 2C). This autocrine expression of M-CSF was confirmed by RT-qPCR and ELISA (Data not shown). Interestingly, this blocking anti-M-CSF antibody also decreased IL-34-induced cell proliferation with 25 ng/mL of the cytokine (Figure 2C), and strongly reduced the modulation of ERK1/2 phosphorylation induced by IL-34 (Figure 2D). As with the TF-1 cells, HOS M-CSFR produced M-CSF in an endogenous manner (Data not shown). We then studied the contribution of autocrine M-CSF on IL-34-induced M-CSFR activation by a silencing RNA approach targeting M-CSF (Figure 3, Supplementary Figure 3).

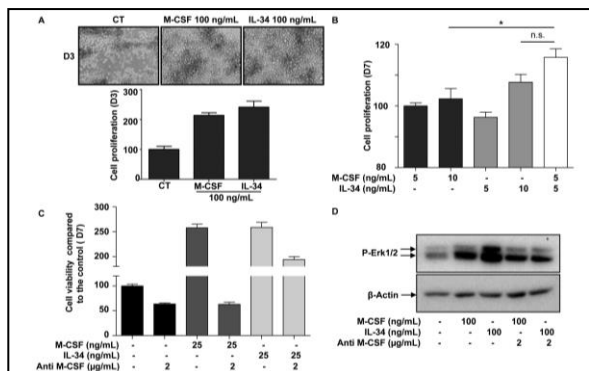


Figure 2: Autocrine production of M-CSF modulates the biological effects of IL-34. (A) TF-1 M-CSFR cells were cultured in the presence or absence of M-CSF or IL-34 for 3 days. Cell number was counted manually and histograms represent the percentage of proliferation compared to the control group. original magnification: X100. (B) TF-1 M-CSFR cells were cultured in the presence or absence of M-CSF or IL-34 or both cytokines at 5 ng/mL for 7 days. Cell proliferation was quantified by manual counting and histograms illustrate the percentage of proliferation compared to D0 and normalized to the 5 ng/mL M-CSF condition. (C) 104 cells/well were seeded in 96-well plates and cultured with or without M-CSF or IL-34 in the presence or absence of a blocking anti-M-CSF antibody. After 3 days of culture, cell viability was determined by an Alamar blue assay. (D) TF-1 M-CSFR cells were cultured in serum free conditions for 12 hours before incubation with a blocking anti-M-CSF antibody. The cells were then stimulated with M-CSF or IL-34 for 5 min and the level of P-ERK1/2 was studied by Western blot. β -actin was used as the loading control. Error bars show the SEM for three different experiments. * $p < 0.05$.

M-CSF expression was down-regulated by around 50% 48 hours after transfections of siRNA targeting the M-CSF gene (Supplementary Figure 3), and the silencing of M-CSF expression decreased M-CSFR phosphorylations induced by both IL-34 and M-CSF (Figure 3). Overall, these data demonstrated that combinations of both cytokines are not restricted to competitive activities, and that IL-34 and M-CSF can exhibit additive effects on various cells at certain concentrations. In addition, M-CSF is able to modulate intracellular signaling induced by IL-34 through the M-CSFR.

IL-34 can interact with the M-CSF to form a heteromeric cytokine

Because the modulation of autocrine production of M-CSF affects the M-CSFR activation induced by IL-34, we analyzed the potential molecular interaction between both cytokines by surface plasmon resonance. The sensorgrams shown in Figure 4A demonstrate the specific binding of IL-34 to immobilized M-CSF, characterized by rapid dissociation. Thus, IL-34 bound M-CSF with a low affinity ($KD=114nM$) (Figure 4B).

Molecular modeling based on the crystal structures published for the M-CSF, M-CSFR (27) and IL-34 (15) illustrated the conventional binding of the homodimeric cytokines on the M-CSFR (Figure 4C). A docking binding analysis was performed using the human dimer of IL-34 against the humanized structure of M-CSF derived from the mouse crystal structure. The docking strategy consisted in defining M-CSF as the rigid molecule, thus keeping its position fixed, and applying rotations and translations in the three-dimensional space for a total of 54000 docking energy evaluations, called poses. The best 2000 poses according to ZSCORE (determined using ZDOCK) were clustered to regroup similar orientations. In these clusters, the most common dimer-dimer interface was found to be a parallel orientation of IL-34 along M-CSF, with beta-strands on both cytokines arranged on the same side. The first and most populated cluster was made of 82 structures and contained the best pose (Figure 4D, left panel).

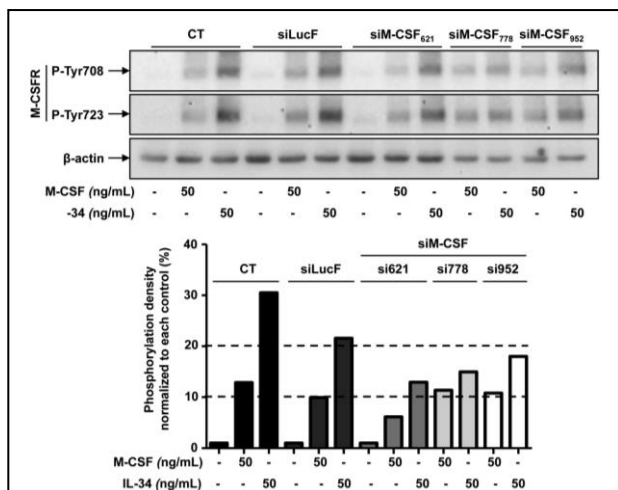


Figure 3: Blockade of M-CSF cell expression decreases IL-34-induced M-CSFR activation. HOS M-CSFR cells were transfected with siRNAs directed against the human M-CSF gene (siM-CSF621, siM-CSF778, siM-CSF952). An siRNA directed against the luciferase gene (siLucF) was used as a control. Forty-eight hours after transfection, the cells were cultured in serum-free conditions for 12 hours and then stimulated with 50 ng/mL of M-CSF or IL-34 for 5 min. Tyrosine708 and tyrosine723 phosphorylations of the M-CSFR were studied by Western blot. β -actin was used as the loading control. The phosphorylation density of the tyrosine723 was quantified using GeneTools (Syngene) and normalized to the β -actin density.

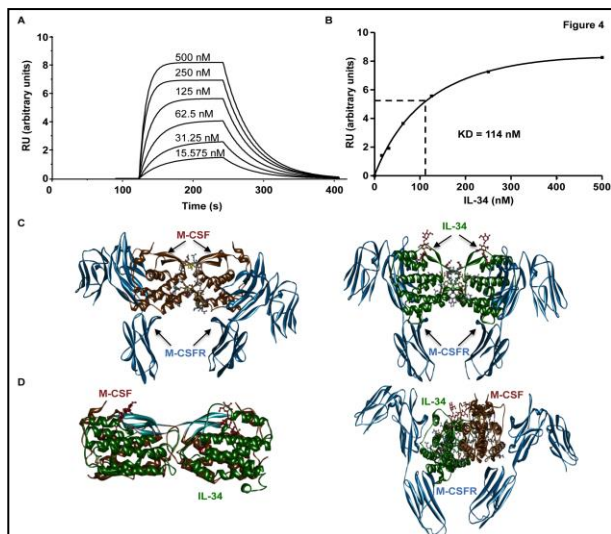


Figure 4: IL-34 binds M-CSF to form a heterodimeric protein able to interact with the M-CSFR. (A) M-CSF was immobilized on the dextran matrix of a sensor chip (BlAcore) and increasing doses of IL-34 (from 15.575 to 500 nM) were loaded on to the chip to analyze the interactions between the 2 cytokines. (B) Figure representing dose-dependent binding in RU and shows dissociation constant (KD) determination. (C) Molecular modeling was performed on the homodimeric cytokines in complex with the M-CSFR using the three-dimensional coordinates extracted from the crystal structure previously published. (D) The interactions between M-CSF and IL-34 were assessed by molecular modeling using three-dimensional cytokine structures. The left panel shows the most favorable binding mode between the two homodimeric cytokines, and the right panel illustrates the interaction between the heterodimeric cytokine and the M-CSFR. M-CSF in brown, IL-34 in green and M-CSFR in blue.

The binding interface was made of 56 amino acids on M-CSF and 47 on IL-34, for a total interface surface of 1764 Å². For each dimer, the loss in accessible solvent was of 1680 Å² and 1845 Å² for M-CSF and IL-34 respectively, indicating the stronger binding role of IL-34 in the resulting binding interface. The binding interface consisted of 14 hydrogen bonds between dimers and 9 salt bridges, and a detailed energy analysis of their binding mode revealed a balanced contribution of electrostatic interactions and hydrophobic contacts (data not shown). To see whether the heterodimeric cytokine identified in this study can engage M-CSFR pathway activation, we explored whether the already-described binding sites for IL-34 and M-CSF could still be accessible for binding to the M-CSFR. As presented in Figure 4D (right panel), despite a steric hindrance due to its large size, the heterodimeric cytokine was able to bind to the M-CSFR, leading to a different conformation of the intracellular M-CSFR

chains. In this conformation, one of the two cytokine binding sites remained accessible to the M-CSFR and the two free sites were opposite each other on the tetrameric cytokine. If we superimposed two M-CSFR monomers on the predicted dimer of dimers, the resulting orientation for each M-CSFR monomer was compatible with the estimated distance between the missing D4 and D5 domains of the two M-CSFR monomers. This distance was a critical step for receptor activation as it allowed contact between the two D4 monomers via homotypic contacts (18). M-CSF and IL-34 can thus form a heterodimeric cytokine able to bind to the M-CSFR.

Endogenous M-CSF and IL-34 can interact together within the cell cytoplasm

As M-CSF and IL-34 were predicted to form a heterodimeric cytokine, we further investigated by means of a PLA assay whether such interaction could be relevant in cells producing both cytokines (Figure 5). We developed from the parental MG63 cell line (MG63 NT) that intrinsically expressed M-CSF but not IL-34, a transfected MG63 IL-34 cell line that expressed both M-CSF and IL-34 at the protein level, as demonstrated by the pink staining around the nuclei compared to the negative controls (Figure 5A,B). The PLA assay demonstrated molecular interaction between the two cytokines as shown by pink fluorescent points within the cytoplasm in Figure 5C, characterized by a close proximity of the protein epitopes (30-40nm).

Endogenous M-CSF and IL-34 expression differentially control intracellular trafficking and maturation of the M-CSFR

M-CSFR half-life was analyzed in the presence of M-CSF or IL-34 in HEK cells expressing the M-CSFR. As expected, HEK M-CSFR cell lysates revealed two forms of M-CSFR, the higher molecular form corresponding to the membrane form of the receptor (Figure 6). Adding M-CSF or IL-34 decreased the membrane expression of M-CSFR, thus reflecting the receptor's internalization and degradation as protein synthesis was blocked by cycloheximide. At the same dose, M-CSF was more efficient in reducing the half-life of the M-CSFR compared to IL-34 (Figure 6A).

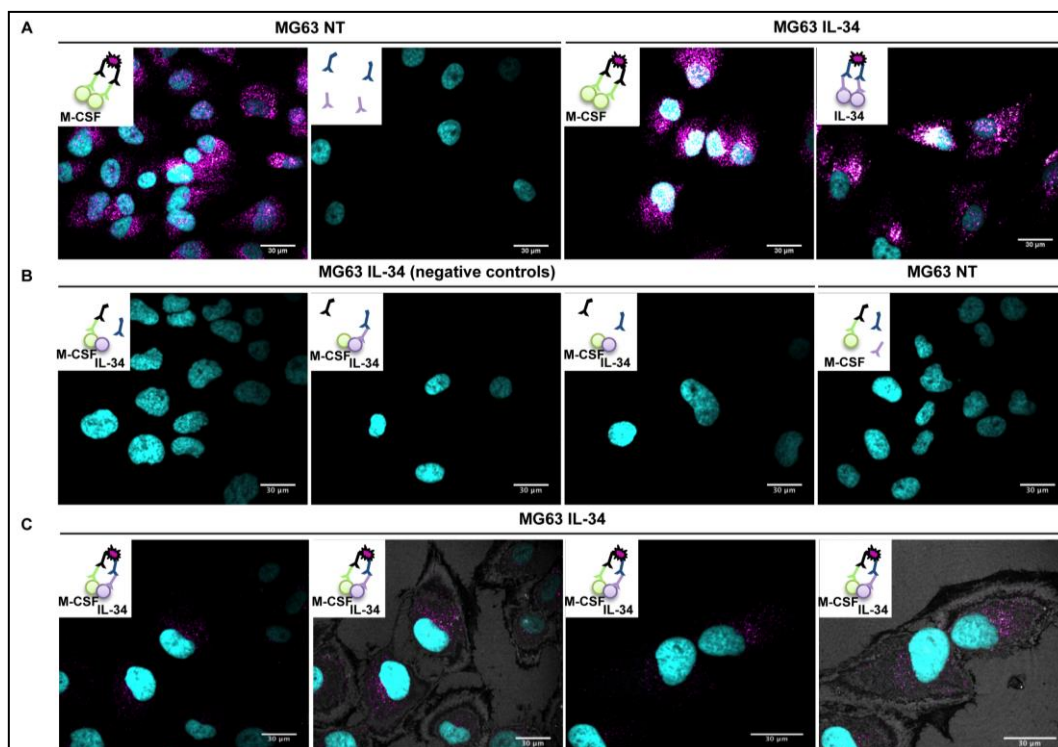


Figure 5: M-CSF and IL-34 interact within the cytoplasm of cells expressing both cytokines. (A) First, the proximity ligation assay (PLA) from Olink was used to detect M-CSF and IL-34 expression (far red, represented in pink) in MG63 cell lines (MG63 NT only express M-CSF, and MG63 IL-34 cells express both cytokines). Nuclei were stained with DAPI (cyan). (B) Several negative controls were performed on MG63 IL-34 cells to validate the PLA assays: cells incubated with only one primary antibody (either against M-CSF or IL-34) and both secondary antibodies, or with only secondary antibodies; MG63 NT cells incubated with all the antibodies. (C) In situ PLA showed the co-localization of M-CSF and IL-34 in the cytoplasm of MG63 IL-34 cells (pink staining). Cell morphology was analyzed using digital interference reflection images captured using the reflection mode (gray).

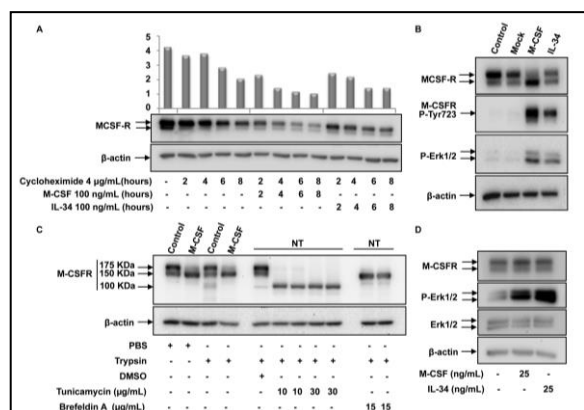


Figure 6: M-CSF and IL-34 differentially control the intracellular trafficking of the M-CSFR. (A) HEK M-CSFR cells were treated with 4 $\mu\text{g/mL}$ of cycloheximide to block protein synthesis in the presence or absence of 100 ng/mL of M-CSF or IL-34. M-CSFR expression was followed by Western blot after 2, 4, 6 or 8 hours of treatment and quantified compared to β -actin expression. (B) HEK M-CSFR were transfected with a vector encoding M-CSF or IL-34 or with an empty vector as control and 48 hours later, M-CSFR and ERK1/2 phosphorylations were assessed by Western blot. (C) M-CSFR expression analyzed by Western blot. HEK M-CSFR cells transfected for expressing M-CSF ("M-CSF") or transfected with an empty vector ("Control") were treated 48 hours after transfection with PBS or trypsin

(0.05%) for 10 min at 37°C. Non-transfected HEK M-CSFR cells ("NT") were treated for 24 or 48 hours with tunicamycin and brefeldin which block the glycosylation process and the protein export between the reticulum and the Golgi networks respectively. (D) HEK M-CSFR cells were cultured with 25 ng/mL of M-CSF or IL-34 for 48 hours prior to analyze the M-CSFR, and P- Erk1/2 by Western blot. β -actin was used as the loading control.

When M-CSF was overexpressed concomitantly to the M-CSFR, the cytokine markedly down-regulated the expression of the membrane form of its receptor in favor of the intracellular form (Figure 6B). On the contrary, the M-CSFR was maintained at the cell membrane when IL-34 was co-transfected (Figure 6B). As with HEK M-CSFR cells, overexpression of M-CSF in HOS M-CSFR cells quantitatively increased the intracellular form and decreased the membrane form of the receptor in contrast to IL-34 overexpression, which maintained receptor expression at the cell membrane (Supplementary Figure 4, Supplementary Figure 5). Non-transfected HOS M-CSFR and HEK M-CSFR cells or cells

transfected with an empty vector (Mock) mainly expressed the receptor at the membrane (Figure 6B, Supplementary Figure 5).

The functionality of the receptor forms was controlled by the phosphorylation of the receptor chains and MAPK activation (Figure 6B). A trypsin treatment of HEK M-CSFR cells was associated with the formation of degradation products of the M-CSFR in contrast with the M-CSF co-expressing cells (Figure 6C). These results demonstrated that the upper band (175 kDa) corresponded well to the membrane form of the M-CSFR and the lower band (150 kDa) to an intracellular form. Adding tunicamycin to HEK M-CSFR cells for 24 hours or 48 hours resulted in a lower molecular weight form of the receptor, around 100 kDa, whereas brefeldin A treatment induced a total shift toward the 150 kDa M-CSFR form, similar to M-CSF co-expression (Figure 6C). As tunicamycin is known to prevent proteins' N-glycosylation, and brefeldin A to both interfere with transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus and block protein secretion, the present data suggest that M-CSF treatment blocked M-CSFR trafficking in the endosomal network, leading to the accumulation of a less N-glycosylated form of 150 kDa (Figure 6C). However, treatment of HEK M-CSFR cells with M-CSFR ligands for 48 hours did not induce any shift between the two forms of M-CSFR, demonstrating that only intrinsic expression of M-CSF and IL-34 can impact receptor maturation (Figure 6D).

Confocal microscopy confirmed these data in HEK M-CSFR (Figure 7) and HOS M-CSFR cells (Supplementary Figure 5). M-CSF overexpression induced marked intracellular sequestration of the M-CSFR that appeared located in the perinuclear region (Figure 7, Supplementary Figure 5). Overexpression of IL-34 led to minor intracellular sequestration of the receptors as they were still localized at the cell membrane. Moreover, co-expression of M-CSF and IL-34 mainly led to intracellular expression of the M-CSFR clustered in the endosomal network around the nuclei (Figure 7, Supplementary Figure 5), confirming the Western blot observations (Data not shown). Similar investigations were performed in the murine osteosarcoma cells K7M2 that spontaneously expressed M-CSF and IL-34 (Supplementary Figure 6).

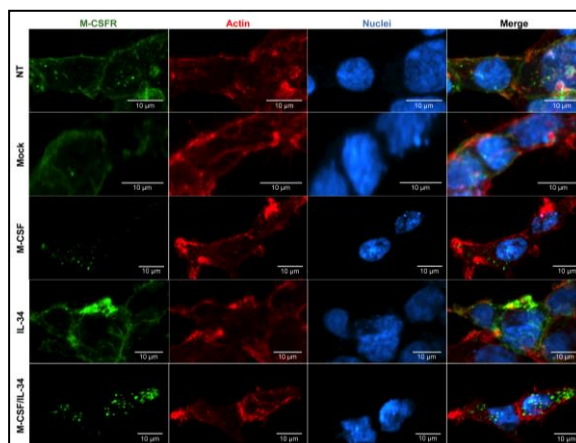


Figure 7: M-CSF and IL-34 co-expression induces intracellular sequestration of the M-CSFR in HEK M-CSFR cells. HEK M-CSFR cells were transfected with an empty vector (Mock), a vector coding for M-CSF (M-CSF) or IL-34 (IL-34) or co-transfected with both vectors encoding M-CSF and IL-34 (M-CSF/IL-34). Forty-eight hours after transfection, the cells were fixed and the expression of M-CSFR was assessed by confocal microscopy (green staining). Actin is stained in red, and nuclei are shown in blue.

Supplementary Figure 6 shows a main intracellular localization of the M-CSFR with slight expression of its membrane form. Western blot analysis confirmed the expression of both M-CSFR forms with a relatively high expression of the intracellular form compared to HEK M-CSFR (Figure 6) or HOS M-CSFR (Supplementary Figure 4). Overall, these data demonstrate that intrinsic IL-34 and M-CSF expression controls cellular trafficking of the M-CSFR.

DISCUSSION

Despite common features, previous studies described specific activities for M-CSF and IL-34, especially in their ability to modulate the expression of various chemokines/ chemokine receptor expression (monocyte chemoattractant protein-1 MCP-1, eotaxin-2, C-C chemokine receptor type 2 CCR2), and the migration of myeloid cells through their shared M-CSFR chains (11, 20). In the present work, we report for the first time the molecular interaction between M-CSF and IL-34, forming a new heteromeric cytokine, and the differential role of M-CSFR ligands in controlling M-CSFR trafficking. Furthermore, the M-CSF/IL-34 heteromer may play a specific biological role by differentially phosphorylating the M-CSFR due to the tridimensional conformation of the receptor

chains adopted when the cytokines bind. ZDOCK docking software was used to look for an interaction between M-CSF and IL-34, as it is particularly efficient on dimeric proteins, while finding the correct interface from two monomers to form a dimer. We first explored whether the docking followed by clustering strategy could be useful for studying existing binding interfaces of the M-CSFR ligands by isolating each cytokine from its receptor or by splitting dimers into monomers. Each docking assessment found the correct position and orientation in the first populated and most energy favorable cluster, even in the case of the M-CSF molecule where the disulfide bridge could not be created during the docking process. Without the N-glycosylations present in the IL-34 structures, we also observed aggregation-like motifs, a phenomenon already identified experimentally (12). There was no defined orientation or specific binding interfaces that could be deduced from the aggregated dimers. However, the same studies on M-CSF dimers did not reproduce any aggregation pattern, which was also a good indicator of the sensitivity of the methods used. These validations reinforced our confidence in the docking protocol used for studying the putative binding mode of the cytokines. The *in silico* experiments revealed a potential binding mode for M-CSF and IL-34 dimers (Figure 4D), arranged parallel to each other with their beta-strands pointing in the same direction. This striking binding mode was unexpected so we first decided to rule out the possibility that the results obtained were only due to the docking strategy or algorithm employed. We therefore used another popular rigid protein docking algorithm called PIPER via its web-based interface ClusPro, which best performed recently in the latest CAPRI contest (21, 22). By using dimers of dimers as starting structures we also found a parallel orientation for both cytokines. Consistent with this docking study, surface plasmon resonance assays experimentally validated the binding ability of IL-34 to the M-CSF characterized by low affinity and rapid dissociation (Figure 4A). The proximity ligation assay confirmed their interaction. Indeed, this technique made it possible to detect closed epitopes separated by a maximum distance of around 30-40 nm (23), and finally strengthened the binding between both in their physiological context (Figure 5). This

heteromeric cytokine may be stabilized by its binding to the M-CSFR, as the molecular docking study proposed a new binding mode for this heteromeric cytokine to two isolated M-CSFR chains (Figure 4D). This recruitment could bring each M-CSFR domain D3 to a distance of about 60Å, close enough to bring domains D4 and D5 into contact, a step known to be critical for receptor activation (18).

The oligomerization process is widespread in biology and it is estimated that homo-oligomerization occurs with 70% of eukaryotic proteins (24). Increased efficiency made possible by better stability, amplification of their affinity or the protective mechanisms of the proteins are amongst the main benefits of this oligomerization process. By forming homodimers, M-CSFR, M-CSF and IL-34, like numerous other cytokines/receptors, do not break this oligomerization rule (25). To increase the complexity, diversity and regulation of cell signaling events, several cytokines are able to form heteromeric structures. This is the case of interleukin-12 (IL-12) related cytokines which differentially regulate the maintenance or activation of the Th1 immune response (26). IL-12 is a heterodimeric cytokine composed of the p35 and p40 subunits signaling through two β 1- and β 2-specific receptor units conferring high affinity binding of IL-12 when they are co-expressed (27). In contrast to the heterodimeric IL-12, the p40 dimer appears to be an IL-12 antagonist blocking the cytokine from binding to its receptor chains (28). The biological diversity of the IL-12 cytokine family is strongly increased by the ability of the p40 subunit to bind in a covalent manner to p35-related protein p19 to form IL-23 (29) or to the p40-related protein EBI3 (Epstein-Barr virus-induced gene 3) to form another cytokine named IL-27 with its own biological specificity (30). Similarly to IL-12, IL-17A and IL-17F, two members of the IL-17 family, interact to form a heterodimer able to bind to the IL-17RA/IL-17RC receptor complex (31). Such heterodimers also contribute to the biological diversity, as shown by their impact on cytokine/chemokine production. Heterodimeric IL-17F/IL-17A showed intermediate potency in inducing IL-6 and CXCL1 compared to homodimeric IL-17A or IL-17F (32). This differential efficiency was explained by their distinct affinity for the IL-17RA, whereas the three cytokines exhibit

similar affinity for the IL-17RC moiety. Consequently, the biological activities of IL17A are inhibited by IL-17RA, IL-17F is blocked by IL-17RC, and a combination of soluble IL-17RA/IL-17RC receptors is needed to abolish IL-17F/IL-17A activity (33).

Based on our data, M-CSF and IL-34 now belong to the cytokine families forming heteromeric entities and the M-CSF/IL-34 cytokine plays a part in increasing the functional diversity of these molecules. By interfering with M-CSFR trafficking, more specifically in the balance between the intracellular and membrane forms of the receptor, IL-34, M-CSF and M-CSF/IL-34 may tightly and specifically control the biological activities associated with the M-CSFR-dependent signaling pathways. In M-CSFR expressing cells, overexpression of M-CSF led preferentially to maintaining the M-CSFR in an N-glycosylated form clustered into the endosomal network. Western blot carried out in these experimental conditions showed a shift in M-CSFR expression from the high molecular weight of 175 kDa, corresponding to the membrane mature form of the receptor, to the 150 kDa intracytoplasmic form. These results were consistent with previous studies which demonstrated that the 175 kDa membrane form was highly processed and modified with mannose and sialic acid, whereas the 150 kDa form was less mature with only mannose modifications, and accumulated in the Golgi apparatus, a process called receptor maturation arrest (34-36). The tunicamycin treatment, which is known to prevent the glycosylation process (37), and brefeldin A treatment, which blocks anterograde transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus and protein secretion (38, 39), confirm that the M-CSFR form processed when M-CSF is highly expressed by the cells is less glycosylated compared to the mature form, and that the receptor is retained between the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. In contrast, co-expression of IL-34 did not induce massive intracellular clustering of M-CSFR and maintained the receptor at the cell surface, suggesting a different regulatory role for the twin cytokines in M-CSFR trafficking. Similar functional differences can be observed on the receptor half-life after adding exogenous cytokines (Figure 6), but also at the transcriptional level as an increase

in IL-34 expression has a moderate impact on M-CSF or M-CSFR expression levels (unpublished data). In contrast, overexpression of M-CSF induces significant changes in the M-CSFR or IL-34 levels. Indeed, overexpression of M-CSF induces a significant increase in IL-34 expression, whereas overexpression of IL-34 does not modify M-CSF expression (unpublished data). In addition, knock-down of M-CSF expression using siRNA enhances IL-34 expression, suggesting a compensatory mechanism between these two cytokines. Nandi *et al.* recently published that M-CSFR and its two ligands IL-34 and M-CSF exhibit distinct expression patterns during brain development and that IL-34 exhibits a broader regional expression than M-CSF, mostly without overlap (40). Their observations suggest a key regulatory role for IL-34 in the M-CSF/M-CSFR activation pathway, which consequently may participate to the tissue homeostasis and development. Thus, our results show that IL-34 may modulate M-CSF effects through the M-CSFR, explained in part by the formation of a heteromeric cytokine M-CSF/IL-34.

In contrast to IL-17A or IL-17F that form either disulfide-linked homodimers or heterodimers through their cysteine knot motif, M-CSF and IL-34 probably interact in their homodimeric form to constitute a heterotetrameric cytokine. Our molecular docking studies predicted a 2:2 interaction without any disulfide bond, which is able to bind to the M-CSFR, unlike a single M-CSF/IL-34 heterodimer. The exact functional implication of these new oligomeric cytokines still needs to be explored and must now be analyzed in the light of the receptor protein tyrosine phosphatase β/ζ (RPTP β/ζ) identified as a new receptor for IL-34 (40). As with the IL17A/IL17F and IL-17RA/IL-17RC systems, the heteromeric M-CSF/IL-34 may regulate IL-34 and M-CSF functions through one receptor or another and the heteromer may also interact with both M-CSFR and RPTP β/ζ receptors. This new M-CSFR cooperative binding mode needs further exploration, and the crystal structure of M-CSF/IL-34 should be determined as well as co-crystal studies with the receptors to better characterize this new complex. It remains to be understood why and in which context this heteromerization mechanism is more beneficial than the already described one-to-one competition.

Acknowledgements – The authors would like to thank Juliette Desfrancois-Noel from the cell sorting facility (Plateau de cytométrie SFR Bonamy/INSERM U892, Nantes, France) for her help in cell sorting the cells expressing the M-CSFR, and Mike Maillason from the Plateforme IMPACT (SFR Bonamy, FED 4203/INSERM UMS 016/CNRS 3556, Nantes, France) where the surface plasmon resonance experiments were carried out. We are especially grateful to Julien Jardin and Valérie Briard from the analytical facility at the UMR 1253 INRA/Agrocampus-Ouest (STLO Science et Technologie du Lait et de l'œuf, Rennes, France), who helped us to perform spectrometry analysis to determine M-CSF/IL-34 stoichiometry. We would also like to thank Dr Valérie Trichet (INSERM U957, Nantes, France) for her technical and rewarding advice regarding molecular cloning of the human M-CSFR gene. This study was supported by the Region des Pays de la Loire (CIMATH research project) and by the Ligue Nationale Contre le Cancer (Equipe LIGUE 2012).

REFERENCES

1. D. Heymann, Interleukin-34: An Enigmatic Cytokine. *I.B.M.S. BoneKey* 7, 406–413 (2010).
2. X.M. Dai, G.R. Ryan, A.J. Hapel, M.G. Dominguez, R.G. Russel, S. Kapp, V. Sylvester, E.R. Stanley, Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. *Blood* 99, 111–120 (2002).
3. W. Wiktor-Jedrzejczak, A. Bartocci, A.W. Jr. Ferrante, A. Ahemd-Ansari, K.W. Sell, J.W. Pollard, E.R. Stanley, Total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (op/op) mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 4828–4832 (1990).
4. H. Yoshida, S. Hayashi, T. Kunisada, M. Ogawa, S. Nishikawa, H. Okamura, T. Sudo, L.D. Shultz, S. Nishikawa, L.D. Shultz, S. Nishikawa, The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature* 345, 442–444. (1990).
5. S. Wei, S. Nandi, V. Chitu, Y.G. Yeung, W. Yu, M. Huang, L.T. Williams, H. Lin, E.R. Stanley, Functional overlap but differential expression of CSF-1 and IL-34 in their CSF-1 receptor-mediated regulation of myeloid cells. *J. Leukoc. Biol.* 88, 495–505 (2010).
6. Lin H, Lee E, Hestir K, C. Leo, M. Huang, E. Bosch, R. Halenbeck, G. Wu, A. Zhou, D. Berhens, D. Hollebaugh, T. Linnemann, M. Qin, J. Wong, K. Chu, S.K. Doberstein, L.T. Williams, Discovery of a Cytokine and Its Receptor by Functional Screening of the Extracellular Proteome. *Science* 320, 807–811 (2008).
7. E.D. Foucher, S. Blanchard, L. Preisser, E. Garo, N. Ifrah, P. Guardiola, Y. Delneste Y, P. Jeannin, IL-34 Induces the Differentiation of Human Monocytes into Immunosuppressive Macrophages. Antagonistic Effects of GM-CSF and IFN γ . *PLoS One* 8, e56045 (2013)
8. M. Baud'Huin, R. Renault, C. Charrier, A. Riet, A. Moreau, R. Brion, F. Gouin, L. Duplomb, D. Heymann, Interleukin-34 is expressed by giant cell tumours of bone and plays a key role in RANKL-induced osteoclastogenesis. *J. Pathol.* 221, 77–86 (2010).
9. S. Nandi, S. Gokhan, X.M. Dai, S. Wei, G. Enikolopov, H. Lin, M.F. Mehler, E.R. Stanley, The CSF-1 receptor ligands IL-34 and CSF-1 exhibit distinct developmental brain expression patterns and regulate neural progenitor cell maintenance and maturation. *Dev. Biol.* 367, 100–113 (2012).
10. Y. Wang, K.J. Szretter, W. Vermi, S. Gilfillan, C. Rossini, M. Cella, A.D. Barrow, M.S. Diamond, M. Colonna, IL-34 is a tissue-restricted ligand of CSF1R required for the development of Langerhans cells and microglia. *Nat. Immunol.* 13, 753–760 (2012).
11. T. Chihara, S. Suzu, R. Hassan, N. Chutiwitoonchai, M. Hiyoshi, K. Motoyoshi, F. Kimura, S. Okada, L-34 and M-CSF share the receptor Fms but are not identical in biological activity and signal activation. *Cell Death Differ.* 17, 1917–1927 (2010).
12. H. Liu, C. Leo, X. Chen, B.R. Wong, L.T. Williams, H. Lin, X. He, The mechanism of shared but distinct CSF-1R signaling by the non-homologous cytokines IL-34 and CSF-1. *Biochim. Biophys. Acta* 1824, 938–945 (2012).
13. J. Pandit, A. Bohm, J. Jancarik, R. Halenbeck, K. Koths, S.H. Kim, Three-dimensional structure of dimeric human recombinant macrophage colony-stimulating factor. *Science* 258, 1358–1362 (1992).
14. V. Garceau, J. Smith, I.R. Paton, M. Davey, M.A. Fares, D.P. Sester, D.W. Burt, D.A. Hume, Pivotal Advance: Avian colony-stimulating factor 1 (CSF-1), interleukin-34 (IL-34), and CSF-1 receptor genes and gene products. *J. Leukoc. Biol.* 87, 753–764 (2010).
15. X. Ma, W.Y. Lin, Y. Chen, S. Stawicki, K. Mukhyala, Y. Wu, F. Martin, J.F. Bazan, M.A. Staronastnik, Structural Basis for the Dual Recognition of Helical Cytokines IL-34 and CSF-1 by CSF-1R. *Structure* 20, 676–687 (2012).
16. P. Fixe, V. Praloran, Macrophage colony-stimulating-factor (M-CSF or CSF-1) and its receptor: structure-function relationships. *Eur. Cytokine Netw.* 8, 125–36 (1997).
17. J. Felix, J. Elegheert, I. Gutsche, A.V. Shkumatov, Y. Wen, N. Bracke, E. Pannecoucke, I. Vandenberghe, B. Devreese, D.I. Svergun, E. Pauwels, B. Vergauwen, S.N. Savvides, Human IL-34 and CSF-1 establish structurally similar extracellular assemblies with their common hematopoietic receptor. *Structure* 21, 528–39 (2013).
18. Verstraete K, Savvides SN. Extracellular assembly and activation principles of oncogenic class III receptor tyrosine kinases. *Nat Rev Cancer* 2012; 12:753–766.
19. J. Elegheert, A. Desfosses, A.V. Shkumatov, Y. Wen, N. Bracke, E. Pannecoucke, I. Vandenberghe, B. Devreese, D.I. vergun, E. Pauwels, B. Vergauwen, S.N. Savvides, Extracellular complexes of the hematopoietic human and mouse CSF-1 receptor are driven by common assembly principles. *Structure* 19, 1762–1772 (2011).
20. B.A. Barve, M.D. Zack, D. Weiss, R.H. Song, D. Beidler, R.D. Head, Transcriptional profiling and pathway analysis of CSF-1 and IL-34 effects on human monocyte differentiation. *Cytokine* 63, 10–17 (2013).
21. D. Kozakov, D. Beglov, T. Bohnuud, S.E. Mottarella, B. Xia, D.R. Hall, S. Vajda, How good is automated protein docking? *Proteins* 2013; 81:2159–2166.
22. D. Kozakov, R. Brenke, S.R. Comeau, S. Vajda, IPER: an FFT-based protein docking program with pairwise potentials. *Proteins* 65, 392–406 (2006).

23. O. Söderberg, M. Gullberg, M. Jarvius, K. Ridderstråle, K.J. Leuchowius, J. Jarvius, K. Wester, P. Hydbring, F. Bahram, L.G. Larsson, U. Landegren, Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. *Nat. Methods* 3, 995–1000 (2006).
24. D.S. Goodsell, A.J. Olson, Structural symmetry and protein function. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 9, 105–153 (2000).
25. M. Atanasova, A. Whitty, Understanding cytokine and growth factor receptor activation mechanisms. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 47, 502–530 (2012).
26. M.K. Gately, L.M. Renzetti, J. Magram, A.S. Stern, L. Adorini, U. Gubler, D.H. Presky, The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 16, 495–521 (1998).
27. D.H. Presky, H. Yang, L.J. Minetti, A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta-type cytokine receptor subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 14002–14007 (1996).
28. F. Mattner, S. Fischer, D. Guckes, S. Jin, H. Kaulen, E. Schmitt E, E. Rüde, T. Germann, The interleukin-12 subunit p40 specifically inhibits effects of the interleukin-12 heterodimer. *Eur. J. Immunol.* 23, 2202–2208 (1993).
29. B. Oppmann, R. Lesley, B. Blom, J.C. Timans, Y. Xu, B. Hunte, F. Vega, N. Yu, J. Wang, K. Singh, F. Zonin, E. Vaisberg, T. Churakova, M. Liu, D. Gorman, J. Wagner, S. Zurawski, Y. Liu, J.S. Abrams, K.W. Moore, D. Rennick, R. de Waal-Malefyt, C. Hannum, J.F. Bazan, R.A. Kastelein, Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 13, 715–725 (2000).
30. S. Pflanz, J.C. Timans, J. Cheung, R. Rosales, H. Kanzler, J. Gilbert, L. Hibbert, T. Chuakova, M. Travis, E. Vaisberg, W.M. Blumenschein, J.D. Mattson, J.L. Wagner, W. To, S. Zurawski, T.K. McClanahan, D.M. Gorman, J.F. Bazan, R. de Waal Malefyt, D. Rennick, R.A. Kastelein, IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EB13 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4+ T cells. *Immunity* 16, 779–790 (2002).
31. D. Toy, D. Kugler, M. Wolfson, Vanden Bos T., J. Hurgel, J. Derry, J. Tocker, J. Peschon, Cutting Edge: Interleukin 17 Signals through a Heteromeric Receptor Complex. *J. Immunol.* 177, 36–39 (2006).
32. S.H. Chang, C. Dong, A novel heterodimeric cytokine consisting of IL-17 and IL-17F regulates inflammatory responses. *Cell Res.* 17, :435–440 (2007).
33. J.F. Wright, F. Bennett, B. Li, J. Brooks, D.P. Luxenberg, M.J. Whitters, K.N. Tomkinson, L.J. Fitz, N.M. Wolfman, M. Collins, K. Dunussi-Joannopoulos, M. Chatterjee-Kishore, B.M. Carreno, The Human IL-17F/IL-17A Heterodimeric Cytokine Signals through the IL-17RA/IL-17RC Receptor Complex. *J. Immunol.* 181, 2799–2805 (2008).
34. E.S. Kawasaki, M.B. Ladner, Molecular biology of macrophage colony-stimulating factor. *Immunol. Ser.* 49, 155–176 (1990).
35. R. Hassan, S. Suzu, M. Hiyoshi, N. Takahashi-Makise, T. Ueno, T. Agatsuma, H. Akari, J. Komano, Y. Takebe, K. Motoyoshi, S. Okada, Dys-regulated activation of a Src tyrosine kinase Hck at the Golgi disturbs N-glycosylation of a cytokine receptor Fms. *J. Cell. Physiol.* 221, 458–468 (2009).
36. M. Hiyoshi, S. Suzu, Y. Yoshidomi, R. Hassan, H. Harada, N. Sakashita, H. Akari, K. Motoyoshi, S. Okada, Interaction between Hck and HIV-1 Nef negatively regulates cell surface expression of M-CSF receptor. *Blood* 111, 243–250 (2008).
37. N.P.J. Price, B. Tsvetanova, Biosynthesis of the tunicamycins: a review. *J. Antibiot.* 60, 485–491 (2007).
38. A. Nebenführ, C. Ritzenthaler, D.G. Robinson, Brefeldin A: Deciphering an Enigmatic Inhibitor of Secretion. *Plant Physiol.* 130, 1102–1108 (2002).
39. A. Verbert, R. Cacan, Trafficking of oligomannosides released during N-glycosylation: a clearing mechanism of the rough endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta* 1473, 137–146 (1999).
40. S. Nandī, M. Cioce, Y.G. Yeung, E. Nieves, L. Tesfa, H. Lin, A.W. Hsu, R. Halenbeck, H.Y. Cheng, S. Gokhan, M.F. Mehler, E.R. Stanley, Receptor-type protein-tyrosine phosphatase ζ is a functional receptor for interleukin-34. *J. Biol. Chem.* 288, 21972–21986 (2013).
41. A. Reynolds, D. Leake, Q. Boese, S. Scaringe, W.S. Marshall, A. Khvorova, Rational siRNA design for RNA interference. *Nat. Biotechnol.* 22, 326–330 (2004).
42. Y. Naito, K. Ui-Tei, Designing functional siRNA with reduced off-target effects. *Methods Mol. Biol.* 942, 57–68 (2013).
43. J. Hellemans, J. Vandesompele, Selection of reliable reference genes for RT-qPCR analysis. *Methods Mol. Biol.* 1160, 19–26 (2014).
44. S.A. Bustin, V. Benes, J. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, T. Nolan, M.W. Pfaffl, G. Shipley, C.T. Wittwer, P. Schjerling, P.J. Day, M. Abreu, B. Aguado, J.F. Beaulieu, A. Beckers, S. Bogaert, J.A. Browne, F. Carrasco-Ramiro, L. Ceelen, K. Ciborowski, P. Cornillie, S. Coulon, A. Cuyper, S. De Brouwer, L. De Ceuninck, J. De Craene, H. De Naeyer, W. De Spiegelaere, K. Deckers, A. Dheedene, K. Durinck, M. Ferreira-Teixeira, A. Fieuw, J.M. Gallup, S. Gonzalo-Flores, K. Goossens, F. Heindryckx, E. Herring, H. Hoenicka, L. Icardi, R. Jaggi, F. Javad, M. Karampelias, F. Kibenge, M. Kibenge, C. Kumps, I. Lambert, T. Lammens, A. Markey, P. Messiaen, E. Mets, S. Morais, A. Mudarra-Rubio, J. Nakiwala, H. Nelis, P.A. Olsvik, C. Pérez-Novo, M. Plusquin, T. Remans, A. Rihani, P. Rodrigues-Santos, P. Rondou, R. Sanders, K. Schmidt-Bleek, K. Skovgaard, K. Smeets, L. Tabera, S. Toegel, T. Van Acker, W. Van den Broeck, J. Van der Meulen, M. Van Gele, G. Van Peer, M. Van Poucke, N. Van Roy, S. Vergult, J. Wauman, M. Tshuikina-Wiklander, E. Willems, S. Zaccara, F. Zeka, J. Vandesompele, The need for transparency and good practices in the qPCR literature. *Nat. Methods* 10, 1063–1067 (2013).
45. J.F. Huggett, C.A. Foy, V. Benes, K. Emslie, J.A. Garson, R. Haynes, J. Hellemans, M. Kubista, R.D. Mueller, T. Nolan, M.W. Pfaffl, G.L. Shipley, J. Vandesompele, C.T. Wittwer, S.A. Bustin, The digital MIQE guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments. *Clin. Chem.* 59, 892–902 (2013).
46. Chen R, Weng Z. Docking unbound proteins using shape complementarity, desolvation, and electrostatics. *Proteins* 2002; 47:281–294.
47. F.A. Momany, R. Rone, Validation of the general purpose QUANTA @3.2/CHARMm@ force field. *J. Comput. Chem.* 13, 888–900 (1992).
48. X. Chen, H. Liu, P.J. Focia, A.H.R. Shim, X. He, Structure of macrophage colony stimulating factor bound to FMS: diverse signaling assemblies of class III receptor tyrosine kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 18267–18272 (2008).
49. L. Li, R. Chen, Z. Weng, RDOCK: refinement of rigid-body protein docking predictions. *Proteins* 53,693–707 (2003).
50. B. Pierce, Z. Weng, ZRANK: reranking protein docking predictions with an optimized energy function. *Proteins* 67, 1078–1086 (2007).

2. Résultats principaux

L'addition de M-CSF et d'IL-34 induit un profil de phosphorylation du M-CSFR particulier à faibles doses, comparé à une concentration équivalente de cytokines seules, allant à l'encontre des effets compétitifs décrits précédemment (**Figure 1 article 3**). De plus, la présence cumulée du M-CSF et de l'IL-34 exerce un effet biologique différent des cytokines prises individuellement, induisant à certaines concentrations une meilleure viabilité des monocytes et des cellules érythroblastiques TF-1 M-CSFR (**Figure 69**).

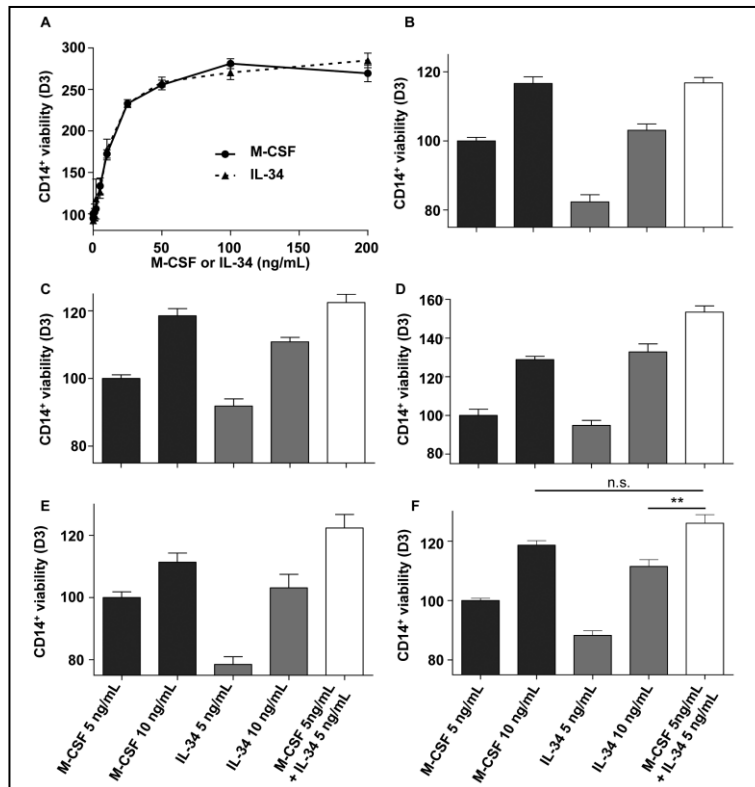


Figure 69 : Supplementary Figure 1 de l'article 3.

The combination of M-CSF and IL-34 induces an additive effect by increasing the viability of human CD14⁺. CD14⁺ cells were magnetically isolated from the peripheral blood of 4 healthy donors and cultured in the presence of M-CSF or IL-34 for three days. Cell viability was assessed by measuring metabolic cell activity (Alamar Blue assay). **(A)** Viability of CD14⁺ cultured in the presence of increasing doses of M-CSF or IL-34 (0.1 to 200 ng/mL). The dose-response shown is representative of all donors assessed. **(B-E)** Viability of CD14⁺ isolated from 4 independent donors and cultured with 5 or 10 ng/mL of M-CSF or IL-34 or with both 5 ng/mL M-CSF and 5 ng/mL IL-34 for 4 donors. Histograms represent the percentage of cell viability obtained with 5 ng/mL of M-CSF. **(F)** Mean of CD14⁺ cell viability from 4 healthy donors. Error bars represent the standard error of mean (SEM) between each measurement of the different experiments for each donor. ** p < 0.01, n.s.: not significant.

Aucun effet compétitif n'est observable sur la différenciation ostéoclastique en présence des deux cytokines (**Figure 2 article 3, Figures 70**).

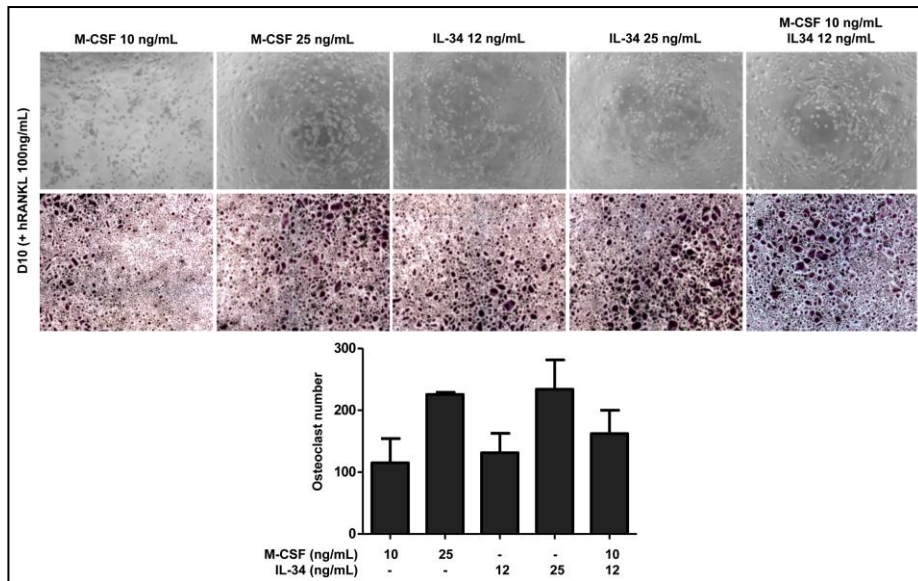


Figure 70 : Supplementary Figure 2 de l'article 3.

Effect of M-CSF and IL-34 combination on human osteoclastogenesis. CD14⁺ cells isolated from healthy donor were cultured with 10 or 25 ng/mL of M-CSF, or 12 or 25 ng/mL of IL-34, or with 10 ng/mL of M-CSF and 12 ng/mL of IL-34. Media were changed every 3 days and 100 ng/mL of RANKL was added at D3 to induce osteoclastic differentiation. After 10 days of culture, TRAP⁺ multinucleated cells were considered as osteoclasts and manually counted.

La production autocrine de M-CSF par les cellules exprimant le M-CSFR modifie l'activation du récepteur induite par l'IL-34 (Figures 2-3 et figure 71).

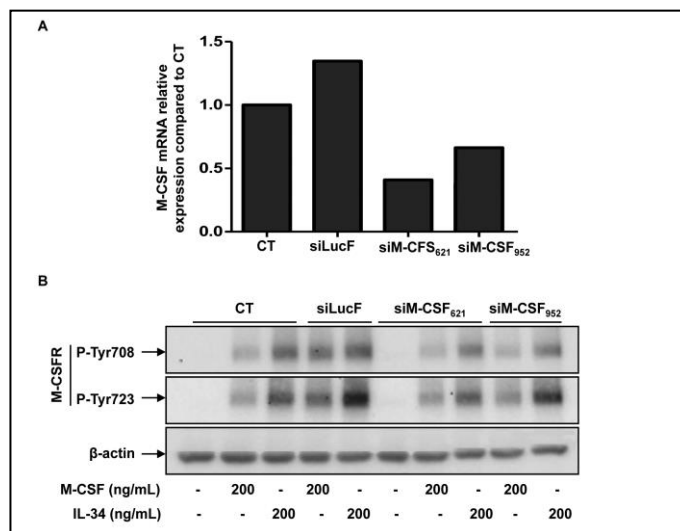


Figure 71 : Supplementary Figure 3 de l'article 3.

Validation of the siM-CSF efficiency in HOS M-CSFR cells. (A) HOS M-CSFR cells were transiently transfected with 2 siRNAs directed against the human M-CSF gene (siM-CSF₆₂₁ and siM-CSF₇₇₈). A siRNA directed against the luciferase (SiLucF) gene was used as a negative control. Forty eight hours after the transfection, relative M-CSF mRNA expression was determined by RT-qPCR, normalized to HPRT gene expression. Experiment was done with the same cells used in figure 4 to study the M-CSF knockdown efficiency. (B) Forty eight hours after transfection, cells were cultured in serum free medium for 12 hours and then stimulated with 200 ng/mL of M-CSF or IL-34 for 5 min. Phosphorylations of M-CSFR (Tyr⁷⁰⁸ and Tyr⁷²³) were analyzed by Western blot. β -actin was used as a loading control.

Ces effets pourraient s'expliquer par la formation d'une cytokine hétéromérique formée par l'association des cytokines jumelles. En effet, l'IL-34 recombinante est capable de se fixer avec une faible affinité (114 nM) sur du M-CSF recombinant fixé sur une puce, même si le complexe se dissocie rapidement (**Figures 4A-B article 3**). Cette interaction est également observée *in situ* par la technique de PLA dans des cellules produisant à la fois le M-CSF et l'IL-34 (**Figure 5 article 3**). Les expériences de modélisation bio-informatique utilisant les données de cristallographie publiées pour le M-CSF et l'IL-34 montrent en effet que la liaison entre le M-CSF et l'IL-34 est possible, avec une stoechiométrie préférentielle de 2 : 2. Les dimères de cytokines sont alors liés parallèlement par des liaisons faibles de type ionique et hydrogène. Malgré l'encombrement stérique de ce complexe, cette conformation est favorable à une liaison sur le M-CSFR, engageant les monomères de M-CSF et d'IL-34 les plus opposés. L'orientation des domaines D1-D3 suite à la fixation de ce complexe permet le rapprochement et les contacts homotypiques entre les domaines D4 et D5, non représentés ici, et donc l'activation du M-CSFR (**Figures 4C-D article 3**).

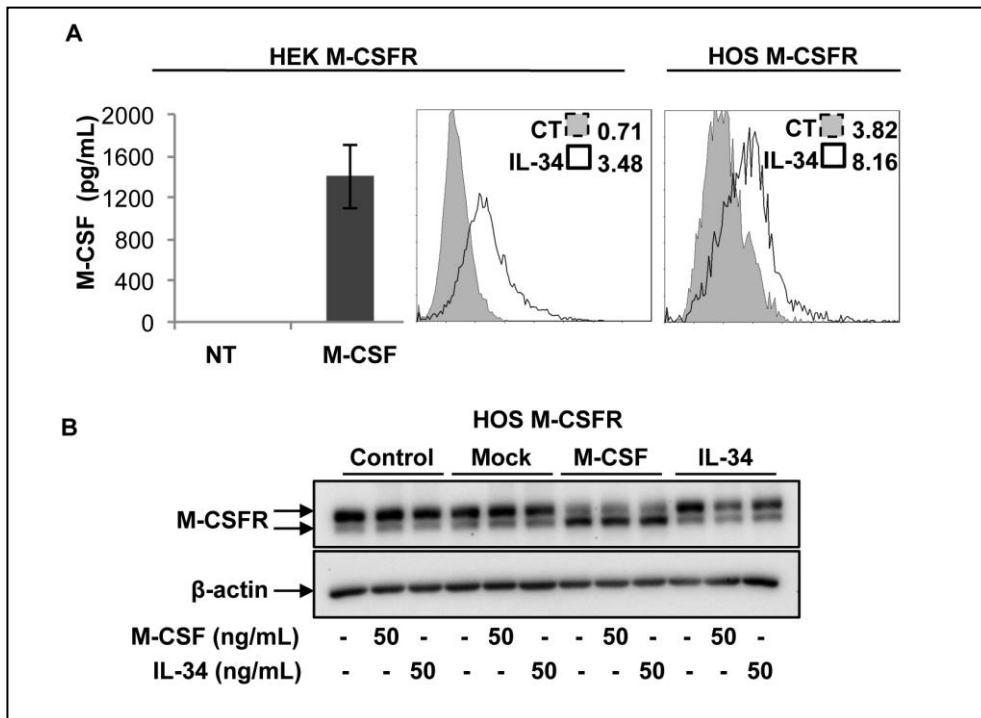


Figure 72 : Supplementary Figure 4 de l'article 3.

IL-34 and M-CSF specifically and differentially regulate the M-CSFR localization. (A) M-CSF and IL-34 protein overexpression were measured by ELISA assay or flow-cytometry in HEK M-CSFR and HOS M-CSFR cells. (B) M-CSFR expression was assessed by Western blot in HOS M-CSFR 48 hours after transfection with a vector encoding M-CSF, IL-34 or an empty vector (Mock) upon 5 min stimulation with 50 ng/mL M-CSF or IL-34.

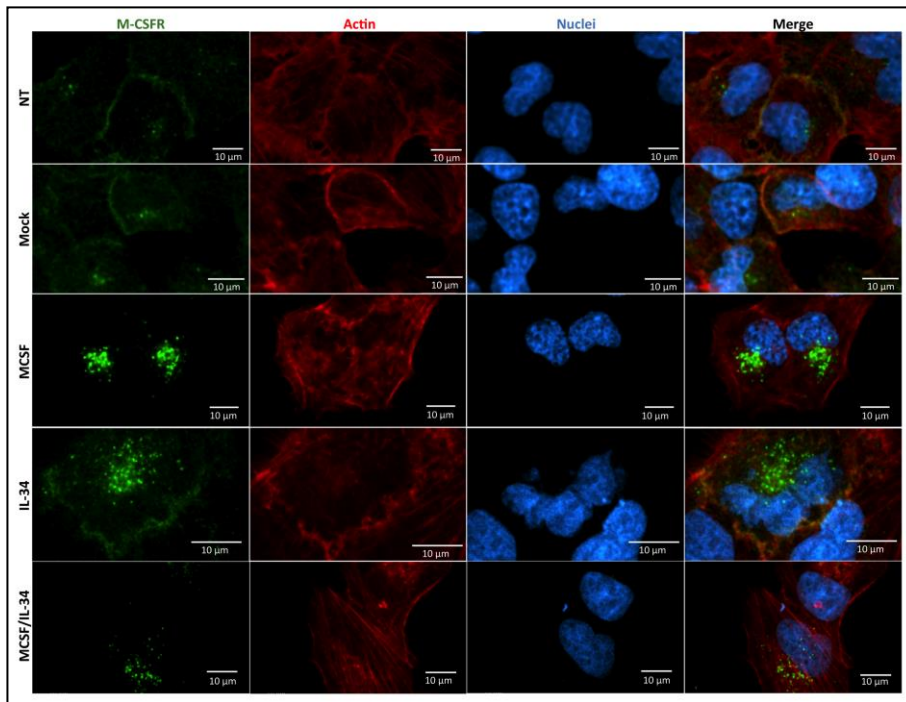


Figure 73 : Supplementary Figure 5 de l'article 3.

M-CSF and IL-34 control M-CSFR location in HOS M-CSFR cells. HOS M-CSFR were transfected with an empty vector (Mock), a vector coding for M-CSF (M-CSF) or IL-34 (IL-34) or co-transfected with both vectors encoding M-CSF and IL-34 (M-CSF/IL-34). Forty-eight hours after transfection, the cells were fixed and expression of the M-CSFR was assessed by confocal microscopy (green staining). Actin is stained in red, and nuclei are shown in blue.

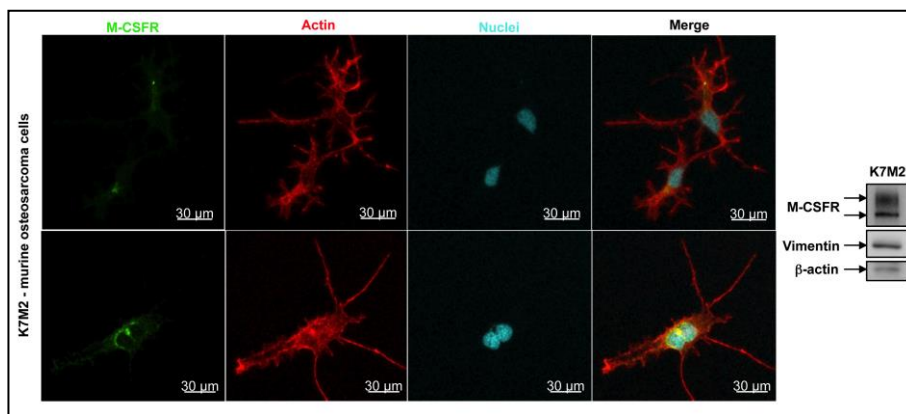


Figure 74 : Supplementary Figure 6 de l'article 3.

Membrane and intracellular localization of the M-CSFR in murine K7M2 cells spontaneously expressing M-CSF and IL-34. The localization of the M-CSFR (green) was analyzed by confocal microscopy in the murine K7M2 osteosarcoma cells that express high levels of M-CSF and IL-34. Actin is stained in red, and nuclei are in blue (right panel). M-CSFR expression was also analyzed by Western blot. Vimentin and β -actin were used as the loading controls (left panel).

Par ailleurs, le M-CSF et l'IL-34 régulent différemment le transport intracellulaire du M-CSFR. La demi-vie du M-CSFR semble plus courte en présence de M-CSF, le récepteur étant internalisé et dégradé plus rapidement qu'en présence d'IL-34 (**Figure 6A article 3**). De plus, la co-expression des ligands et du récepteur au sein de la cellule contrôle différemment la localisation du M-

Chapitre 3 :l'IL-34 forme une cytokine hétéromérique avec le M-CSF

Article n°3, résultats principaux et résultats complémentaires

CSFR, puisqu'une forte expression du M-CSF entraîne la disparition du M-CSFR à la membrane au profit de l'accumulation au sein du réseau endosomal d'une forme uniquement N-glycosylée. Malgré une diminution de l'expression du M-CSFR à la membrane, l'expression d'IL-34 semble avoir moins d'impact puisque le récepteur est toujours exporté à la membrane (**Figures 6B-C et figures 72-74**).

III. Conclusions et discussion

Nos résultats démontrent une liaison de l'IL-34 sur le M-CSF de faible affinité, n'impliquant que des liaisons faibles comme des liaisons hydrogènes et des ponts ioniques. Aucune cystéine n'est présente dans la région de dimérisation M-CSF/IL-34, et l'absence de ponts disulfures rend le complexe difficile à analyser. Le réactif de Lomant (DSP/DTSP) pourrait être utilisé pour former des ponts artificiels entre les amines réactives afin de stabiliser le complexe, mais ces ponts sont susceptibles d'affecter la biologie de la cytokine, et sont réversibles en conditions dénaturantes. Contrairement à la cytokine hétéromérique formée par l'IL-17A et l'IL-17F, il sera donc difficile d'isoler et de purifier le complexe formé par le M-CSF et l'IL-34, qui risque de se dissocier au cours de l'expérience (Wright *et al.* 2007). Cette étape serait pourtant nécessaire pour confirmer que les effets biologiques et l'activation particulière du M-CSFR obtenue en présence des deux cytokines seraient liés à la formation de cet hétéromère, capable de se lier et d'activer de façon différentielle le M-CSFR. Chihara *et al.* ont en effet montré qu'une activation différente du M-CSFR et des voies de signalisation sous-jacentes en présence de M-CSF ou d'IL-34 pourrait expliquer certains effets biologiques propres à chaque cytokine. La production plus faible de MCP-1 par des macrophages différenciés en présence d'IL-34 serait ainsi due à une phosphorylation plus faible des STATs (Chihara *et al.* 2010). La purification de l'hétéromère permettrait de conforter notre hypothèse en analysant directement son effet sur la viabilité et la différenciation des lignées myéloïdes. La formation de ce complexe serait donc un autre moyen pour l'IL-34 de réguler l'action du M-CSF, et pourrait exercer comme l'IL-17A/F un rôle intermédiaire dans les zones où les deux cytokines sont produites, notamment dans certaines pathologies comme les maladies inflammatoires chroniques (Masteller et Wong 2014). En effet, malgré des fonctions redondantes, l'absence de M-CSF induit chez des souris une ostéopétrose plus marquée que celle d'IL-34 (Wiktor-Jedrzejczak *et al.* 1990; Dai *et al.* 2002), tandis qu'une inactivation du gène de l'IL-34 perturbe plus sévèrement la biologie des cellules de Langerhans et de la microglie (Greter *et al.* 2012; Wang *et al.* 2012). L'hétéromère M-CSF/IL-34 pourrait donc aussi contrôler certaines fonctions, comme c'est le cas pour la sécrétion d'IL-17A/F par les lymphocytes T qui permet de réguler l'inflammation. En effet, cet hétérodimère contrôle différemment la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 ou le CXCL-1 comparé aux homodimères d'IL-17A ou d'IL-17F (Seon Hee Chang et Dong 2007). En dépit d'une interaction transitoire mesurée entre le M-CSF et l'IL-34 par résonance plasmonique de surface, l'hétéromère pourrait être stabilisé lors de sa fixation sur le M-CSFR. Il serait également intéressant d'étudier le rôle du M-CSF/IL-34 vis-à-vis des autres récepteurs de l'IL-34, comme le RPTP β/ζ (Nandi *et al.* 2013). L'IL-34 pourrait également s'associer à la forme membranaire du M-CSF. Cependant, il est probable que l'IL-34 ne s'associe pas avec tous les isoformes du M-CSF, qui exercent chacun une fonction biologique particulière (Dai *et al.* 2004; Nandi *et al.* 2006). L'IL-34

s'associerait plutôt au M-CSF présent sous forme d'un protéoglycane, puisque ce dernier porte une chaîne de chondroïtine sulfate, et l'interaction de l'IL-34 avec le RPTP β/ζ est médiée par ces chaînes sulfatées (Nandi *et al.* 2013). De plus, cette forme du M-CSF est connue pour interagir avec les LDLs, puisque sa chaîne de chondroïtine sulfate est capable de se lier à l'apolipoprotéine B (Suzu, Inaba, *et al.* 1994). Le protéoglycane se lie également à d'autres facteurs de croissance comme le bFGF au niveau d'une séquence de sa partie C-terminale spécifique à cet isoforme du M-CSF, et est en compétition avec l'héparane sulfate pour sa liaison au bFGF (Suzu, Kimura, *et al.* 1994). Afin de vérifier si la liaison entre le M-CSF et l'IL-34 est dépendante de la chaîne de chondroïtine sulfate, il faudrait utiliser des cellules produisant uniquement la glycoprotéine et réaliser de nouveau la technique de proximity ligation assay (PLA) M-CSF/IL-34, car l'utilisation de traitements enzymatiques comme la chondroïtinase ABC sur les protéines reste difficile à maîtriser. Par conséquent, il faudrait pouvoir produire les protéines en grandes quantités pour les purifier après le traitement enzymatique. Il serait néanmoins possible de reproduire les expériences de liaison entre le M-CSF et l'IL34 en présence d'une dose croissante de chondroïtines sulfates afin de vérifier si celles-ci inhibent l'interaction entre les deux cytokines. Les expériences pourraient être reconduites par résonance plasmonique de surface, ou après biotinylation ou radiomarquage d'une des deux cytokines à l'iode 125 et mesure de sa liaison au fond d'un puits recouvert par l'autre cytokine pour plus de sensibilité.

Par ailleurs, la co-expression du M-CSF et du M-CSFR au sein de différentes cellules bloque l'O-glycosylation du M-CSFR et sa localisation entre le réticulum endoplasmique et le golgi. Cette forme intracellulaire immature peut être phosphorylée au sein du réseau endosomal comme le montrent les résultats de western blot (**Figure 6**). Contrairement au postulat selon lequel l'internalisation du M-CSFR permet l'extinction du signal intracellulaire (Pixley et Stanley 2004), il a récemment été montré que le M-CSFR présent dans les endosomes pouvait induire une signalisation et maintenir ainsi l'activation de ERK1/2 et Akt dans les macrophages (Huynh *et al.* 2012). Cette phosphorylation du M-CSFR intracellulaire observable dans nos résultats est certainement rendue possible par l'accumulation du récepteur et de son ligand au sein du réseau endosomal, le M-CSF y subissant également une maturation avant d'être sécrété. L'expression d'IL-34 semble réguler moins sensiblement l'expression du récepteur puisqu'il n'est pas complètement internalisé au sein du réseau endosomal malgré une surexpression importante de la cytokine (**Figures 6-7, Figures 72-74**). Suite à l'activation du M-CSFR par le M-CSF ou l'IL-34, l'expression des gènes du M-CSF et du M-CSFR est augmentée. Des études transcriptomiques sur des macrophages stimulés avec du M-CSF ou de l'IL-34 montrent les variations d'expressions géniques induites par l'IL-34 sont plus faibles, y compris celle de l'expression du M-CSF (Barve *et al.* 2013). L'activation du récepteur en présence du M-CSF surexprimé induirait donc une plus forte expression de la cytokine, expliquant en partie l'internalisation et la diminution drastique du M-CSFR membranaire. De plus, la demi-vie du M-CSFR est plus courte en présence de M-CSF, renforçant l'idée d'une régulation plus sensible par

son premier ligand. L'induction de l'expression du M-CSF ou de l'IL-34 par différents facteurs, comme les cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IL-1 β pourrait donc permettre une régulation différente du M-CSFR, afin de rendre les cellules elles-mêmes plus ou moins sensibles aux deux cytokines présentes dans le microenvironnement (Eda *et al.* 2010).

En conclusion, ces données démontrent la complexité des relations entre l'IL-34 et le M-CSF, qui, malgré des fonctions communes via un même récepteur, sont capables de réguler différemment l'expression et la localisation de ce dernier. L'IL-34 n'est pas uniquement en compétition avec le M-CSF, et elle peut moduler l'action du M-CSF en induisant des effets additifs. Ces effets peuvent s'expliquer par la formation d'une cytokine hétéromérique M-CSF/IL-34 fonctionnelle sur le M-CSFR, qui pourrait aussi exercer des fonctions biologiques indépendantes, et/ou réguler l'action de ces deux molécules.

Discussion générale et perspectives

I. Rôle pro-angiogénique direct et indirect de l'IL-34 : quels acteurs moléculaires ?

Le M-CSF est connu pour induire indirectement l'angiogenèse *in vivo* en recrutant des macrophages, qui produisent des facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF (Eubank *et al.* 2003; Curry *et al.* 2008; Forget *et al.* 2014). Les résultats de ce travail de thèse montrent que l'IL-34 partage les propriétés pro-angiogéniques du M-CSF *in vivo* dans deux modèles murins. Les analyses immunohistochimiques réalisées sur les tumeurs issues du modèle d'ostéosarcome utilisé révèlent un recrutement plus important des phagocytes mononucléés sur le site tumoral lorsque l'IL-34 est surexprimée par la tumeur. De plus, l'expression de l'arginase-1, marqueur des M2, est plus forte dans les tumeurs exprimant l'IL-34 que dans les tumeurs contrôles, suggérant que l'IL-34 induit indirectement la formation de néo-vaisseaux via le recrutement de ces macrophages. Néanmoins, les résultats des expériences *in vitro* réalisées sur des cellules endothéliales démontrent également une action directe de l'IL-34 sur la prolifération et la formation de tubes en Matrigel®. Ces effets semblent indépendants du M-CSFR, et nécessitent la présence des glycosaminoglycanes. Les glycosaminoglycanes sont très fortement impliqués dans les processus angiogéniques en particulier via leurs chaînes sulfatées qui peuvent interagir avec de nombreux ligands ou récepteurs. Ainsi, l'OPG exerce un rôle pro-angiogénique via les chaînes d'héparane sulfate du syndécan-1 (Benslimane-Ahmim *et al.* 2013). Le RPTPβ/ζ, récepteur connu à l'IL-34, possède également un rôle majeur dans la vascularisation. En effet, la fixation de la pléiotrophine sur le RPTPβ/ζ induit la migration des HUVECs et la formation de tubes en Matrigel® et dépend des chaînes de chondroïtine sulfate C (Polykratis *et al.* 2005). La migration des cellules endothéliales est permise grâce à l'interaction de la pléiotrophine avec les intégrines α_vβ₃ et le RPTPβ/ζ (Mikelis *et al.* 2009). Il conviendrait donc de vérifier si l'action de l'IL-34 ne passe pas par le RPTPβ/ζ, en inhibant par exemple son expression par les cellules endothéliales avant de réaliser des tests fonctionnels (tubulogenèse, prolifération, etc.). Néanmoins, dans notre étude, le niveau d'expression du RPTPβ/ζ est extrêmement faible sur les cellules endothéliales quelles que soient les conditions analysées.

II. Rôle du syndécan-1 dans l'effet pro-angiogénique de l'IL-34 ?

Nos travaux ont mis en évidence la fixation de l'IL-34 sur les chaînes de chondroïtine sulfate d'un protéoglycane autre que le RPTPβ/ζ. En effet, le syndécan-1 peut fixer la cytokine, régulant ainsi l'activation du M-CSFR. Il est exprimé *in vitro* par les progéniteurs endothéliaux (Benslimane-Ahmim *et al.* 2013) mais également au niveau de l'endothélium au cours de la formation vasculaire. Le domaine extracellulaire du syndécan-1 s'associe aux intégrines α_vβ₃ et α_vβ₅ pour induire un changement de conformation de ces intégrines favorable à l'adhésion, à

l'étalement et à la migration des cellules endothéliales (Beauvais *et al.* 2009). Il a par ailleurs été montré que le FGF-2 induisait l'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, et que le FGFR collaborait avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ pour favoriser l'angiogenèse et induire les voies de signalisation associées (Friedlander *et al.* 1995). Lorsque cette chaîne d'intégrine est libre, elle forme un complexe intracellulaire avec la caspase 8, induisant l'apoptose des cellules endothéliales. La fixation d'un ligand sur l'intégrine favorise la dissociation du complexe, permettant la survie des cellules endothéliales (Stupack *et al.* 2001). Les intégrines sont connues pour servir de plateformes protéiques à la membrane servant au recrutement des kinases comme les FAKs, des éléments du cytosquelette ou des protéines adaptatrices. La fixation de l'IL-34 sur le syndécan-1 pourrait donc réguler l'activation des intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$, en particulier par l'activation de la PKC qui reste à vérifier, et permettre ainsi la prolifération et la survie des cellules endothéliales. En effet l'activation de l'intégrine $\alpha_v\beta_5$ est dépendante de la PKC (Friedlander *et al.* 1995). Néanmoins, l'IL-34 n'est pas capable d'induire seule la formation de tubes en Matrigel®, et semble potentialiser l'action du FGF-2. Le FGF-2 est également connu pour stimuler l'expression du syndécan-1 par les cellules endothéliales au cours de la formation de vaisseaux, et le syndécan-1 est très fortement exprimé par les cellules endothéliales au sein des tumeurs mammaires ou des anneaux aortiques en croissance (Beauvais *et al.* 2009). Dans un tel contexte, les effets potentialisateurs de l'IL-34 sur la tubulogenèse en présence de FGF-2 pourraient dépendre de cette hausse d'expression membranaire du syndécan-1. Nos résultats préliminaires ne montrent aucune variation de l'expression membranaire des intégrines $\alpha_v\beta_3$ en présence de M-CSF ou d'IL-34. Il faudrait maintenant observer la co-localisation du syndécan-1, des intégrines et des cytokines ainsi que l'organisation du cytosquelette des cellules endothéliales et leur migration après ajout de M-CSF et d'IL-34. Les expériences de tubulogenèse pourront être reconduites en présence de l'anticorps bloquant anti-syndécan-1 (clone B-B4) ou après inhibition de l'expression du syndécan-1 par siRNA afin de vérifier le rôle de ce protéoglycane dans l'angiogenèse. Si le syndécan-1 est bien impliqué, il est probable que ses chaînes de chondroïtine sulfate soient nécessaires à l'action de l'IL-34. En effet, l'abrasion des glycosaminoglycanes réduit fortement la tubulogenèse et les voies de signalisation induites par l'IL-34. Étant donné que l'anticorps anti-syndécan-1 empêche la fixation de l'IL-34, il faudrait également déterminer la partie protéique du syndécan-1 impliquée dans sa liaison à l'IL-34. Par ailleurs, l'IL-34 se fixant aux chaînes libres de chondroïtine sulfate, il serait tout à fait possible que la cytokine agisse sur d'autres protéoglycanes porteurs de ces chaînes comme le syndécan-3, le CD44, les glypicans, *etc.* La partie protéique de l'IL-34 capable de se lier aux chaînes de chondroïtine sulfate reste également à identifier.

III. Rôle de l'IL-34 et du syndécan-1 dans le recrutement et l'adhésion des leucocytes

Nous avons également pu montrer qu'un pré-traitement des leucocytes à l'IL-34 augmentait leur adhérence à l'endothélium activé. Les immunomarquages IL-34 réalisés sur les coupes d'ostéosarcome chez la souris montrent un fort marquage de la cytokine au niveau de l'endothélium et de cellules de type ostéoclastique (**Figure 75**).

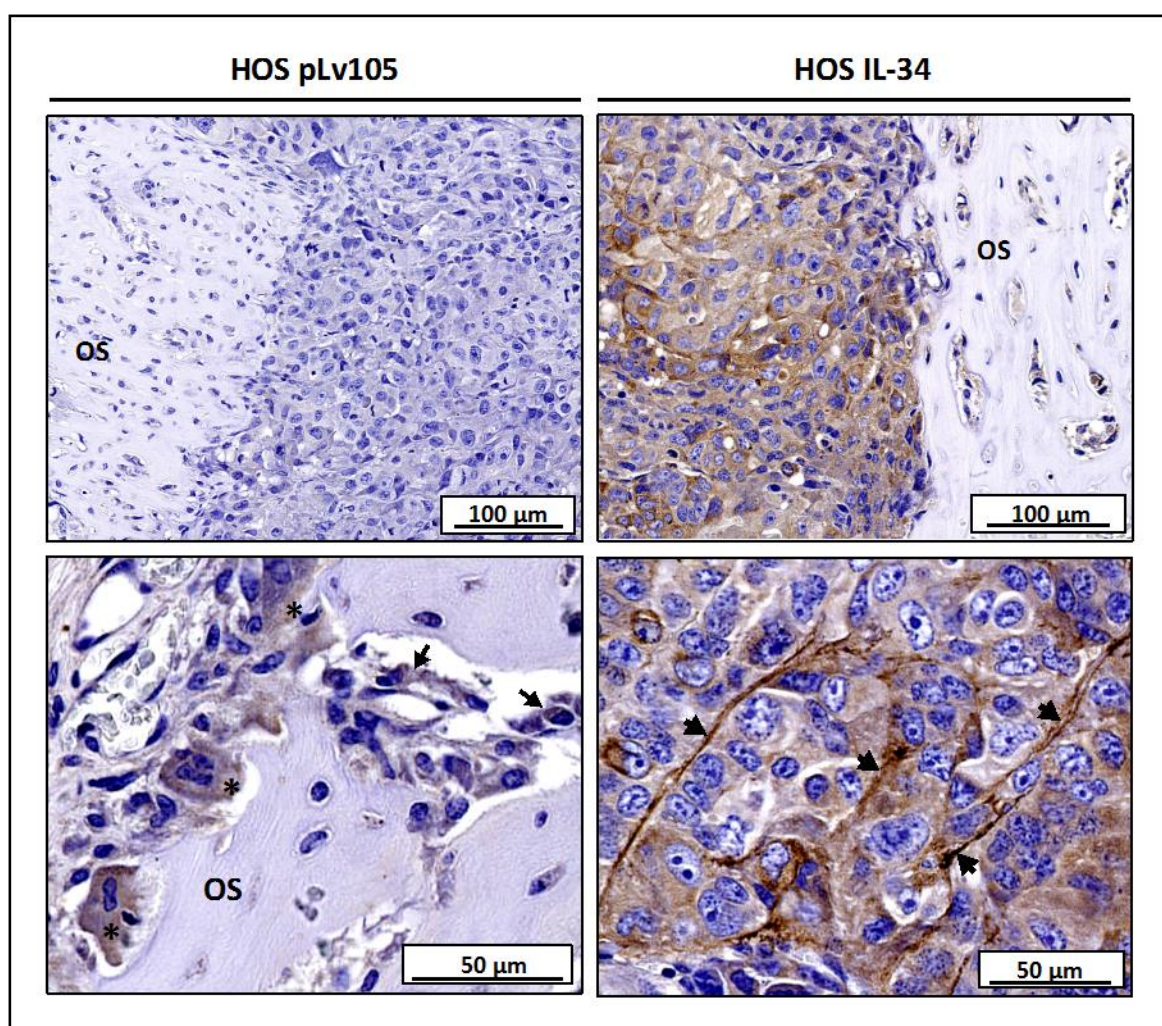


Figure 75 : Marquages immunohistochimiques de l'IL-34 sur les coupes de tibia de souris portant la tumeur. Les cellules tumorales HOS IL-34 surexpriment bien la protéine en comparaison des HOS pLv105. Néanmoins plusieurs cellules présentent un marquage de l'IL-34 dans les tumeurs contrôles, comme des cellules géantes multinucléées de type ostéoclastique (astérisques) ou des cellules tumorales au contact de la matrice osseuse (flèches). Les tumeurs IL-34 expriment nettement plus la protéine, avec un marquage cytoplasmique de l'IL-34 au sein des cellules tumorales. Des structures de type vasculaire apparaissent également fortement marquées dans les tumeurs IL-34 (flèches). Les ostéocytes ne sont pas positifs pour l'IL-34.

L'IL-34 pourrait être piégée par le syndécan-1 membranaire ou par le M-CSFR des cellules myéloïdes. L'adhérence des leucocytes stimulés à l'IL-34 sur l'endothélium pourrait donc s'expliquer par plusieurs mécanismes :

(1) les leucocytes seraient recrutés par chimiotactisme par l'IL-34 sécrétée par la tumeur et/ou par le gradient d'IL-34 formé à la surface de l'endothélium grâce au syndécan-1 ;

(2) l'IL-34 agirait via le syndécan-1 membranaire des leucocytes, et activerait des molécules d'adhésion comme les intégrines ;

(3) l'IL-34 permettrait l'interaction des deux types cellulaires directement par l'interaction via le syndécan-1 ;

(4) l'IL-34 fixée à la surface des leucocytes sur le M-CSFR se lierait au syndécan-1 présent à la surface de l'endothélium activé (**Figure 76**). Néanmoins, l'activation de l'endothélium par le TNF- α diminue l'expression du syndécan-1 à sa surface (Kainulainen *et al.* 1996), et les souris possédant une inactivation du gène du syndécan-1 présentent une plus forte adhérence leucocytaire à l'endothélium (Götte *et al.* 2002). L'hypothèse n°2 selon laquelle l'IL-34 activerait des molécules d'adhérence à la surface des leucocytes semble donc être la plus probable.

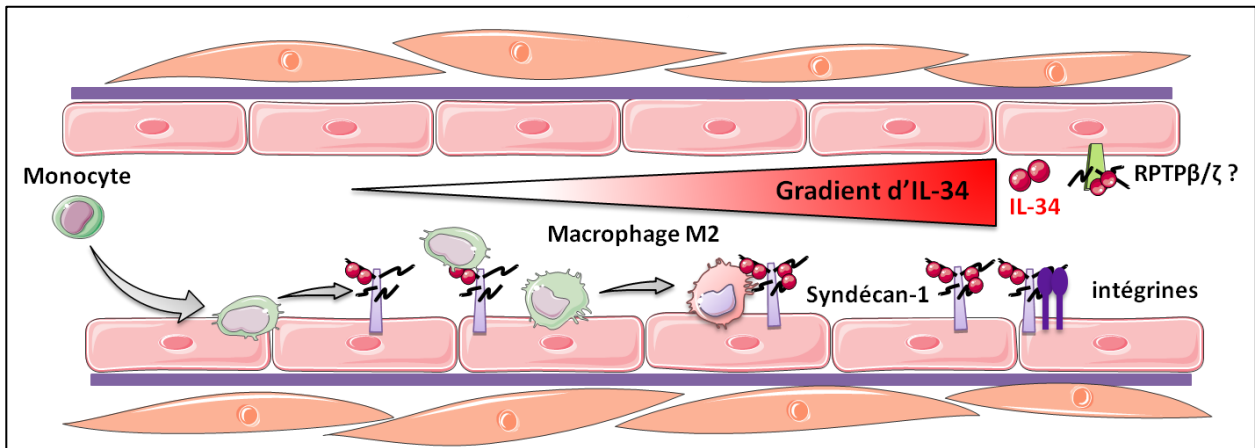


Figure 76 : Rôle potentiel du syndécan-1 dans le recrutement, l'adhérence et l'activation des cellules myéloïdes et des cellules endothéliales.

La fixation de l'IL-34 sur le syndécan-1 des cellules endothéliales crée un gradient chimiotactique qui attire les phagocytes mononucléés. L'IL-34 piégée à la surface des cellules endothéliales favorise leur activation, leur adhérence et leur différenciation via le syndécan-1 et/ou le M-CSFR. La biologie des cellules endothéliales (prolifération, migration, survie, etc.) pourrait être également régulée par la fixation de l'IL-34 sur le syndécan-1 et la formation de complexes macromoléculaires avec les intégrines.

IV. Rôle pro-tumoral de l'IL-34 dans l'ostéosarcome : quels récepteurs ?

Ces travaux de thèse démontrent une expression de l'IL-34 à la fois au niveau transcriptionnel et protéique dans des biopsies de patients atteints d'ostéosarcome. L'inoculation en site paratibial de cellules d'ostéosarcome surexprimant l'IL-34 favorise la progression tumorale et le développement métastatique. Ces résultats sont corrélés avec l'augmentation de l'angiogenèse tumorale et du recrutement de macrophages immunosuppresseurs de type M2 au niveau de la tumeur. Ces données sont en concordance avec un autre modèle pré-clinique d'ostéosarcome dans lequel l'inhibition du M-CSFR entraîne une diminution de la croissance de

la tumeur primitive, mais aussi une réduction du nombre de métastases (Kubota *et al.* 2009). L'invalidation conditionnelle de l'IL-34 par un système Cre/Loxp suite à l'induction tumorale dans nos modèles d'ostéosarcome immunocompétents permettrait de corroborer le rôle pro-tumoral de la cytokine, de confirmer son rôle dans le cercle vicieux qui s'établit entre l'os et la tumeur, mais aussi dans le déséquilibre du couplage entre ostéoblastes et ostéoclastes. L'objectif à terme serait de réaliser un croisement de ces souris transgéniques avec des souris possédant une invalidation conditionnelle du gène du M-CSF pour étudier l'impact de la double invalidation sur le phénotype osseux puis la croissance tumorale. Il serait ainsi possible de comparer le rôle du M-CSF et de l'IL-34 dans le développement de l'ostéosarcome, et de vérifier si le M-CSF est capable de relayer l'IL-34 dans la pathologie, afin de conclure sur l'importance du ciblage thérapeutique de ces deux cytokines. Il serait intéressant d'analyser par immunohistochimie l'expression de l'IL-34 et du M-CSF sur une large cohorte d'ostéosarcomes, en analysant parallèlement la densité vasculaire, le nombre de macrophages (et en particulier des M2). L'utilisation de puces tissulaires (TMAs) permettrait ce type d'étude. Des corrélations pourraient alors être testées entre l'angiogenèse tumorale, l'infiltrat macrophagique et l'expression d'IL-34, mais aussi le grade de la tumeur, la présence de métastases chez les patients ainsi que leur survie. Dans un deuxième temps, l'IL-34 pourrait être dosée dans les sérums des patients afin de vérifier si, comme dans la polyarthrite rhumatoïde les taux d'IL-34 sont augmentés comparés à ceux de donneurs sains (Sung Hae Chang *et al.* 2014; Tian *et al.* 2013). Si tel est le cas, les concentrations sériques d'IL-34 pourraient servir de marqueur tumoral, et être corrélées au pronostic des patients. Il est désormais essentiel d'analyser les effets de l'IL-34 dans le développement tumoral en regard de ses différents récepteurs, le M-CSFR, le RPTP β/ζ et le syndécan-1. En effet, le syndécan-1 pourrait participer à l'action de l'IL-34 au sein du microenvironnement tumoral. Celui-ci est surexprimé dans de nombreux cancers, et l'expression de sa forme clivée corrèle avec un mauvais pronostic puisqu'il participe activement à l'angiogenèse tumorale, à la prolifération et à la migration des cellules cancéreuses (Choi *et al.* 2010; Szatmári et Dobra 2013). Le syndécan-1 soluble concentre les facteurs pro-tumoraux dans le microenvironnement de la tumeur, mais également à des sites distants favorisant ainsi le processus métastatique, et potentialise la signalisation de divers facteurs de croissance (Ramani *et al.* 2013). Les cellules tumorales induisent le clivage du syndécan-1, et augmentent la libération de facteurs de croissance comme l'HGF (Derksen *et al.* 2002) ou de facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF ou le FGF-2 portés par les chaînes d'héparane sulfate du syndécan-1 (Purushothaman *et al.* 2010). Le complexe syndécan-1/HGF est également capable de stimuler la signalisation via le récepteur MET dans des ostéoblastes (Seidel *et al.* 2000). Dans des cellules tumorales mésenchymateuses le syndécan-1 est transloqué dans le noyau grâce à ses interactions avec la tubuline, afin d'y coordonner le transport du FGF-2 (Zong *et al.* 2009). Le syndécan-1 se lie aux microtubules au cours de la division avant d'être entièrement internalisé. L'expression du syndécan-1 co-localise parfaitement

avec le fuseau mitotique. Une expression très forte est visible au niveau des noyaux de cellules de mésothéliome malin, d'adénocarcinome et de neuroblastome, alors que ce marquage est presque inexistant dans les noyaux des cellules saines d'origine (Brockstedt *et al.* 2002). Certaines biopsies de patients atteints d'ostéosarcome montrent un fort marquage immunohistochimique nucléaire de l'IL-34 au sein des cellules tumorales (**Figure 77**). L'IL-34 pourrait donc être transloquée dans le noyau en association avec le syndécan-1, et même induire son internalisation. En effet, le syndécan-1 est connu pour réprimer l'action des histones acétyl transférases dans le noyau, inhibant ainsi la transcription de gènes connus pour favoriser l'agressivité de la tumeur comme le VEGF ou la MMP-9 (Purushothaman *et al.* 2011). Si l'expression de l'IL-34 co-localise bien avec celle du syndécan-1 dans le noyau, la localisation nucléaire d'IL-34 au sein des biopsies d'ostéosarcome pourrait être un indicateur de l'agressivité des tumeurs.

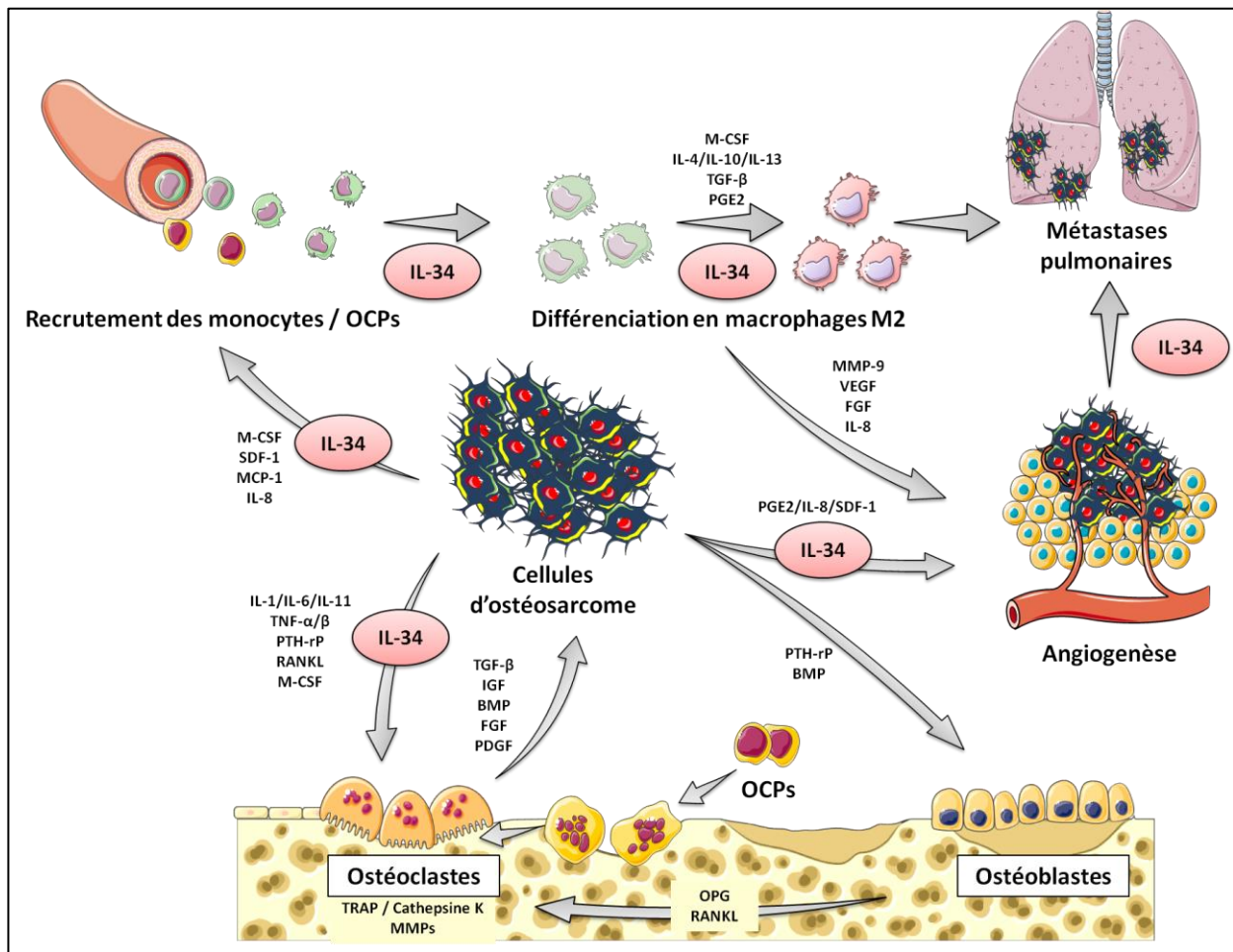


Figure 77 : Rôle de l'IL-34 dans le cercle vicieux entre l'ostéosarcome et le microenvironnement tumoral.

V. Mutations des RTKs et carcinogénèse

En tant que récepteurs mitogènes, les RTKs sont impliqués dans de nombreux processus pathologiques, avec 30% de RTKs mutés ou surexprimés comme les RTKs MET, FLT3 et KIT dans différents cancers humains (Blume-Jensen et Hunter 2001). Des mutations oncogéniques ou des duplications géniques dans la région juxtamembranaire de KIT ou du FLT3 entraînent une activation constitutive de ces récepteurs en absence de leur ligand, et donc une carcinogénèse (Irusta et DiMaio 1998; Hirota *et al.* 1998). Ainsi, des duplications dans la région juxtamembranaire du FLT3 sont responsables de l'activation constitutive du récepteur dans 15 à 30% des cas de leucémies myéloïdes aiguës (Meshinchi et Appelbaum 2009) et dans 65% des tumeurs stromales gastro-intestinales (GISTs) (Antonescu 2011). De plus, plusieurs mutations oncogéniques retrouvées dans les GISTs touchent la région catalytique ou le domaine juxtamembranaire de KIT, respectivement responsables de son autophosphorylation et de l'inhibition de son activité kinase (Hirota *et al.* 1998). La plupart des cancers de la thyroïde sont issus de réarrangements chromosomiques responsables de la fusion du domaine kinase de RET avec différents domaines de dimérisation protéique, mais également de mutations sporadiques touchant les cystéines du domaine extracellulaire, et conduisant à l'activation constitutive de RET (Santoro *et al.* 1995). Une stimulation autocrine ou une surexpression de l'EGFR sont également à l'origine de nombreuses tumeurs solides. L'EGFR/ErbB-1 et ErbB-2 sont ainsi surexprimés dans les cancers du poumon et ceux du sein, et leur expression est facteur d'agressivité et de mauvais pronostic dans de nombreux cancers (Lynch *et al.* 2004). Par ailleurs, des mutations activatrices sur le FGFR3 conduisent à une prolifération excessive et dérégulée des cellules épithéliales ou des cellules B hématopoïétiques et donnent lieu à des cancers. À l'inverse, lorsque cette même mutation touche les chondrocytes, elle diminue continuellement leur prolifération et débouche sur une hypochondroplasie, se traduisant par un défaut de croissance des os longs et donc par différentes formes de nanisme (Laederich et Horton 2012).

VI. Les inhibiteurs actuels ciblant les RTKs en cancérologie et problèmes posés

Considérant l'implication des RTKs dans la tumorigénèse, de nombreux traitements ciblant ces récepteurs sont en cours de développement et même déjà couramment utilisés en thérapie associés à la chimiothérapie conventionnelle. Ainsi, des inhibiteurs réversibles des RTKs sont déjà utilisés en thérapeutique depuis plusieurs années, et des inhibiteurs covalents (et donc irréversibles) sont actuellement en cours d'essais cliniques. Ces inhibiteurs sont des composés de faibles poids moléculaire qui bloquent le site de liaison à l'ATP du RTK, empêchant ainsi son activation : ils sont dits alors compétitifs. Des inhibiteurs de l'EGFR, le gefitinib et l'erlotinib sont administrés dans les cancers du poumon non à petites cellules, tandis que l'imatinib (Gleevec) est

utilisé dans le traitement des leucémies (en particulier les leucémies myéloïdes chroniques) et des GISTs pour son inhibition du PDGFR et de KIT. Il faut noter que l'Imatinib est également capable de bloquer le M-CSFR et BCR-Abl. De même, le sorafenib et le sunitinib ciblent plus largement la famille des récepteurs au VEGF dans les carcinomes rénaux de stade avancé (Carmeliet et Jain 2000). Par ailleurs, de nombreux anticorps humains, humanisés ou chimériques sont utilisés en clinique, comme ceux dirigés contre l'EGFR (le cetuximab et le panitumumab) pour lutter contre les cancers colorectaux métastatiques ainsi que contre les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou, ou le trastuzumab dirigé contre HER2 dans le traitement des cancers du sein (Ben-Kasus *et al.* 2007). Les anticorps monoclonaux développés contre le VEGFR2, l'IGF1R et MET n'étant pas encore approuvés cliniquement, d'autres anticorps sont développés pour cibler les ligands de ces récepteurs, comme le Bevacizumab, utilisé contre les cancers colorectaux et qui cible le VEGF (Ferrara 2005).

Ces traitements peuvent s'avérer très efficaces, comme l'Imatinib (Gleevec) décrit précédemment pour le traitement des GISTs, mais peuvent aussi n'avoir aucun effet comme c'est le cas pour les inhibiteurs ciblant le FLT3 dans la leucémie myéloïde aiguë (Swords, Freeman, et Giles 2012). En effet, ces traitements s'avèrent toxiques du fait d'une mauvaise spécificité, avec une biodisponibilité réduite due à une mauvaise pharmacocinétique. Il faut noter que des inhibiteurs de KIT et/ou du FLT3 comme l'imatinib, le dasatinib, le sunitinib, CEP-701 et PKC-412 sont également capables de bloquer l'activation du M-CSFR en entrant en compétition sur le site de fixation à l'ATP (Mashkani, Griffith, et Ashman 2010). De plus, des résistances primaires et secondaires ont pu être observées, ainsi qu'une augmentation autocrine ou paracrine de la production de leurs ligands par les cellules tumorales. Par conséquent, d'autres traitements ciblant plutôt l'ectodomaine de ces RTKs sont en cours de développement, comme les anticorps monoclonaux qui empêchent la liaison du ligand et induisent aussi l'internalisation du récepteur (Baselga 2006; Zhang, Yang, et Gray 2009). Le ciblage du ligand directement par des anticorps monoclonaux ou l'utilisation de récepteurs leurres sont également d'autres stratégies envisagées. En effet, l'utilisation de l'anticorps bloquant anti-M-CSFR AFS98 dans des modèles murins d'allogreffe rénale ou de souris diabétiques a montré de bons résultats (disparition de l'hyperfiltration glomérulaire et de l'inflammation du rein, diminution de la fibrose rénale, réduction de la prolifération et de l'infiltration des macrophages, *etc.*) (Jose *et al.* 2003; Lim *et al.* 2009). Cependant, étant donné la forte affinité des RTKs III pour leurs ligands (inférieure au nM), le ciblage non compétitif de l'activation des récepteurs semblerait être une meilleure approche, en empêchant par exemple les interactions homotypiques nécessaires à l'activation du récepteur. De nombreux inhibiteurs du M-CSFR sont engagés dans des études pré-cliniques, comme les anilides, les pyrimidines/pyrazines (dont le GW2580, brevet n°US20040002145 A1, couramment utilisé pour bloquer l'activité du M-CSFR en recherche), les quinolines (dont le Ki20227, nombreux brevets dont le n°EP1535910 A4), les quinolinones/pyrido-pyridines et -pyrimidines (premier brevet

n°WO2005009967), les benzothiazoles (comme le BLZ945 de chez Novartis) et les pyrrolo-pyridines,-pyrimidines,-pyrazines (comme le PLX3397/PLX108-01 alors en essai clinique de phase I/II). Les données pré-cliniques de cet inhibiteur administré par voie orale montrent une réduction des métastases et des douleurs liées au cancer, et sa capacité à passer la barrière hémato-encéphalique offre des perspectives intéressantes pour les pathologies neuronales. Ces inhibiteurs ciblant le domaine kinase peuvent être séparés en deux groupes : ceux qui inhibent la liaison de l'ATP et ceux qui ne sont pas en compétition avec l'ATP (Burns et Wilks 2011).

VII. Implication de l'axe M-CSF/M-CSFR en cancérologie : place de l'IL-34 ?

Il existe peu d'exemples de mutations activatrices du M-CSFR dans les pathologies à la différence des autres RTKs comme KIT ou le FLT3, bien que l'axe M-CSF/M-CSFR joue un rôle important dans l'activation autocrine et paracrine des cellules tumorales dans les cancers des ovaires, du sein, de l'endomètre, de la prostate, etc (Kluger *et al.* 2004). De plus, la signalisation du M-CSFR est impliquée dans le recrutement et l'activation paracrine des macrophages associés à la tumeur par la sécrétion tumorale de M-CSF. Non seulement ces macrophages favorisent la progression tumorale par la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques et d'enzymes protéolytiques, mais sont aussi capables d'activer de façon paracrine les cellules tumorales, en sécrétant des facteurs de croissance comme l'EGF par exemple (Lamagna, Aurrand-Lions, et Imhof 2006). Les macrophages associés à la tumeur sont recrutés dans le microenvironnement de toutes les tumeurs solides, et peuvent être capables de lutter contre les cellules tumorales. Cependant, les données cliniques et expérimentales montrent que dans la plupart des cas ces macrophages permettent la progression et l'agressivité des tumeurs (Allavena *et al.* 2008). En effet, les facteurs présents dans le microenvironnement tumoral suppriment leur immunité anti-tumorale en les polarisant en macrophages M2. Ainsi, la densité en macrophages dans les tumeurs humaines est corrélée avec un mauvais pronostic dans 80% des cas (Bingle, Brown, et Lewis 2002). Une surexpression du M-CSF ou de molécules chimiotactiques pour les macrophages comme le CXCL2 est donc facteur de mauvais pronostic (Mantovani *et al.* 2002). Le croisement d'un modèle murin de cancer du sein (PyMT pour *polyoma middle*) avec les souris *CSF-1^{op/op}* est associé à un retard de la progression tumorale et réduit la formation de métastases, alors que l'expression transgénique de M-CSF dans les tissus mammaires accroît l'agressivité tumorale. En effet, la surexpression de M-CSF dans les tumeurs induit le recrutement précoce de macrophages, favorisant le « switch angiogénique » et donc le développement tumoral et l'apparition de métastases (E. Y. Lin *et al.* 2001). Le M-CSF et l'IL-34 exercent un rôle redondant sur la biologie des cellules myéloïdes et l'angiogenèse. Au vu du rôle pro-tumoral de l'IL-34 dans notre modèle d'ostéosarcome et de son expression dans les biopsies de patients, il faudrait analyser dans différents types de tumeurs l'expression respective des deux cytokines. L'utilisation des souris possé-

dant une inactivation des gènes du M-CSF et de l'IL-34 permettra de conclure sur le rôle de chaque cytokine dans différents modèles tumoraux. En effet, il n'est pas exclu que suivant le type de cancer l'inhibition d'une cytokine soit sans effet à terme si l'autre cytokine prend le relais. Une des deux cytokines pourrait également exercer un rôle protecteur en plus de son rôle pathologique. L'IL-34 exerçant ainsi un rôle protecteur dans la maladie d'Alzheimer, son ciblage dans les gliomes ou neuroblastomes pourrait être controversé (Mizuno *et al.* 2011). Enfin, l'IL-34 pourrait être un régulateur du M-CSF. Considérant nos résultats, la formation d'une cytokine hétéromérique M-CSF/IL-34 pourrait réguler l'activité du M-CSF, et le ciblage d'une des deux cytokines pourrait déstabiliser ce mécanisme dont le rôle est encore inconnu. De plus, les ligands du M-CSFR régulent de façon différente le transport et l'expression à la membrane du M-CSFR, et la balance entre l'expression du M-CSF et de l'IL-34 peut être importante dans la régulation de l'expression du M-CSFR chez certains types cellulaires. La connaissance du rôle et de l'expression des deux cytokines dans les différents types de cancers est donc importante avant de définir des stratégies thérapeutiques.

VIII. Ciblage du M-CSFR en cancérologie : les différentes stratégies actuelles

Le ciblage de la signalisation du M-CSF, et donc désormais de l'IL-34, est une stratégie importante dans le cancer. Cette stratégie est multi-approche puisqu'elle permettrait de limiter l'auto-activation de certaines tumeurs exprimant à la fois les ligands et le récepteur, mais favoriserait aussi la diminution des infiltrats de macrophages. La limitation du recrutement des macrophages entraînerait le ralentissement de l'angiogenèse tumorale, de la croissance tumorale et du développement métastatique, et pourrait supprimer certaines chimiorésistances qui seraient en partie liées à ces macrophages (Ahn *et al.* 2010; Paulus *et al.* 2006). En effet, il a été montré qu'un traitement chimiothérapeutique du cancer du sein augmentait la production tumorale de M-CSF et d'IL-34, favorisant ainsi le recrutement des macrophages et l'échappement tumoral au traitement (DeNardo *et al.* 2011). L'association d'anti-M-CSFR en complément du traitement chimiothérapeutique pourrait donc être envisagée. Le développement d'anticorps ou d'inhibiteurs anti-M-CSFR est au cœur des stratégies actuelles (**Figure 78**). Ainsi, l'anticorps monoclonal anti-M-CSFR IMC-CS4 développé par la compagnie Lilly est actuellement en essai clinique de phase I sur des sujets présentant des tumeurs solides résistantes aux thérapies standards ou pour qui aucune thérapie classique n'est adaptable (ImClone LLC. 2011). De la même façon, le PLX3397 (Plexxikon), petite molécule inhibitrice du M-CSFR ciblant également KIT et le FLT3 est en essai clinique de phase I pour des patients présentant des tumeurs solides de stade avancé incurable avec les traitements actuels (Plexxikon 2009). Le PLX3397 est aussi utilisé dans un essai clinique de phase Ib/II pour des patients atteints de cancer du sein métastatique triple négatif en association avec une chimiothérapie conventionnelle utilisant des doses standards d'eribulin

dans le but de réduire l'infiltrat macrophagique et d'augmenter l'efficacité de la thérapie (Plexxikon, Eisai Inc., et Komen 2012). Néanmoins, l'utilisation d'anticorps bloquants anti-M-CSFR empêche la formation du complexe M-CSF/M-CSFR, et empêche l'internalisation et la dégradation du récepteur, affectant la biologie des cellules myéloïdes qui meurent rapidement, et perturbant la dégradation physiologique du M-CSF. Les taux plasmatiques de M-CSF vont alors fortement augmenter et favoriseront une toxicité dans les organes où la pénétration de l'anticorps est limitée, et conduiront à des effets rebonds chez les patients traités, avec un pronostic qui risque finalement de s'aggraver (Hume et MacDonald 2012). À ce jour, un seul anticorps bloque partiellement la signalisation et le transport du M-CSFR de façon non compétitive, sans empêcher la formation, l'internalisation et la dégradation du complexe M-CSF/M-CSFR. Cet anticorps monoclonal (H27K15) est très intéressant puisqu'il affecte peu la survie des monocytes, mais réduit de façon importante la différenciation et l'activité des ostéoclastes, acteurs principaux dans le cercle vicieux os/tumeur. De plus, l'utilisation de cet anticorps bloque la différenciation des macrophages en M2, favorisant plutôt un phénotype de cellules dendritiques et donc l'immunité anti-tumorale. L'anticorps H27K15 induirait l'internalisation du complexe M-CSF/M-CSFR/H27K15, réduisant ainsi la signalisation M-CSF/M-CSFR qui suffirait à induire la survie des monocytes, mais empêcherait leur différenciation en ostéoclastes et en M2. La sécrétion de MCP-1 et d'IL-6 est fortement diminuée, limitant également le recrutement des macrophages M2 (Haegel *et al.* 2013).

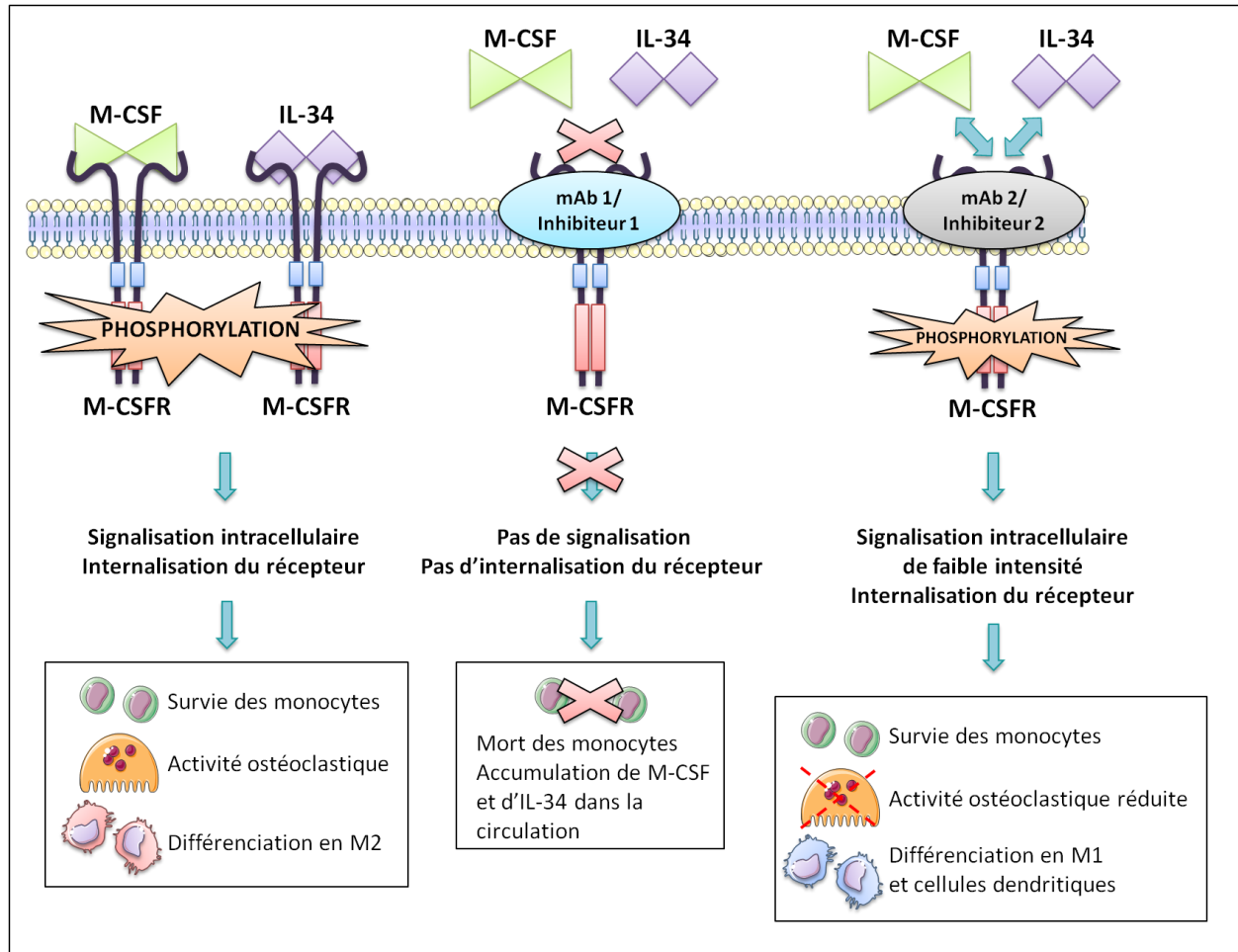


Figure 78 : Les stratégies de ciblage de l'axe M-CSF/IL-34/M-CSFR.

Par ailleurs, le bénéfice d'un traitement des pathologies inflammatoires par des anticorps ciblant le M-CSFR est discuté. Certains décrivent ainsi l'importance de ces traitements dans l'inflammation aiguë, tandis que d'autres n'ont noté aucun effet. Ces résultats sont liés à l'utilisation de différents anticorps qui ne ciblent pas les mêmes épitopes, et la connaissance de l'IL-34 explique désormais que certains anticorps bloquant la liaison des deux ligands sur le M-CSFR puissent avoir un effet plus important que des anticorps ne bloquant que la liaison de l'un ou l'autre. Les anti-M-CSFR se sont généralement révélés efficaces dans le traitement de l'inflammation chronique, mais il faut noter que les voies de signalisation impliquées dans l'inflammation aiguë et chronique diffèrent (Hamilton et Achuthan 2013; Hume et MacDonald 2012). De nombreuses études ont également démontré l'efficacité de l'inhibition du M-CSFR dans des modèles animaux de cancer. Ainsi, l'injection d'anticorps bloquants anti-M-CSFR réduit l'infiltration des macrophages immunosuppresseurs, conduisant à la réduction de la croissance tumorale et à une survie prolongée des animaux (Fend *et al.* 2013). De façon intéressante, il a été montré dans un modèle de glioblastome qu'un traitement anti-M-CSFR réduisait la croissance tumorale en réversant le phénotype des macrophages M2 vers un profil plutôt proche des M1 (Pyonteck *et al.* 2013) ou des cellules dendritiques (Haegel *et al.* 2013). En fonction du con-

texte, et des classes de macrophages impliquées, le blocage de la signalisation du M-CSFR peut donc avoir des effets bénéfiques anti-inflammatoires ou pro-inflammatoires. L'existence de l'IL-34 doit donc être prise en compte dans le choix des anti-M-CSFR, afin de cibler soit les deux cytokines, qui sont toutes deux impliquées dans les maladies inflammatoires chroniques et partagent un rôle pro-tumoral, soit spécifiquement l'une des deux cytokines, dans le cas où l'autre exercerait un rôle protecteur (Mizuno *et al.* 2011). Cependant, malgré une efficacité déjà prouvée du ciblage M-CSF/M-CSFR dans de nombreux modèles pré-cliniques, une équipe a récemment démontré que la neutralisation du M-CSF ou de son récepteur favorisait le développement de métastases pulmonaires et osseuses sans affecter le développement de la tumeur primitive. En effet, le traitement induit une augmentation des taux circulants de G-CSF et du nombre de neutrophiles sur les sites tumoraux mais aussi dans la circulation générale, et ces neutrophiles sont responsables de la progression métastatique observée (Swierczak *et al.* 2014). D'autres thérapies visant à réduire les infiltrats de macrophages ciblent plus spécifiquement des molécules recrutées sur le M-CSFR comme l'unité p110 δ de PI3K. Le M-CSF induit la motilité des macrophages grâce au recrutement et à l'activation de cette sous-unité sur la tyrosine 723 phosphorylée, et l'expression de p110 δ est restreinte aux leucocytes. Des inhibiteurs de cette isoforme sont actuellement en cours de développement, et ont montré des effets positifs dans des modèles de leucémie lymphoïde chronique (Hoellenriegel *et al.* 2011).

IX. Conclusion : ciblage de l'axe M-CSF/IL-34/M-CSFR dans les thérapies futures

De nos jours, les nouvelles thérapies cancéreuses cherchent donc à cibler majoritairement les macrophages associés aux tumeurs, qui sont des acteurs cruciaux de la progression maligne. Ce ciblage se fait à différents niveaux. Tout d'abord l'inhibition des facteurs chimioattractants permet de réduire le recrutement des cellules phagocytaires mononucléées. Ensuite, l'activation des macrophages est inhibée en ciblant l'axe M-CSF/M-CSFR. La survie des macrophages peut également être diminuée par différents traitements : acide zolédronique, clodronate, etc. Pour finir, un des objectifs majeurs est d'inhiber la polarisation des macrophages vers un phénotype immunosuppresseur M2, et surtout d'induire un phénotype plutôt de type M1 immunostimulateur afin de favoriser la mort des cellules tumorales (Panni, Linehan, et DeNardo 2013). Compte tenu du rôle de l'IL-34 dans le développement de l'ostéosarcome et le recrutement de macrophages M2 dans notre modèle *in vivo*, il sera nécessaire de confirmer le rôle pro-tumoral de la cytokine dans d'autres types de cancers, et envisager pour les thérapies futures un ciblage commun des deux cytokines, plutôt qu'un ciblage spécifique du M-CSF. Néanmoins, pour les raisons évoquées précédemment, le ciblage du M-CSFR s'avère compliqué. Après avoir précisé le rôle de chaque cytokine dans différents cancers, il faudrait peut-être privilégier le dé-

veloppement d'inhibiteurs ciblant les deux cytokines. Cependant, cette réflexion s'appuie uniquement sur un axe M-CSF/IL-34/M-CSFR, et nos travaux ainsi que les précédents ont pu démontrer un rôle plus complexe de l'IL-34, qui semble posséder des récepteurs multiples, compliquant ses mécanismes d'action. En effet, l'IL-34 agit via le RPTP β/ζ , qui est également surexprimé dans les biopsies d'ostéosarcome (Toledo *et al.* 2010), mais peut également se lier au syndécan-1 qui est un acteur moléculaire important dans la carcinogenèse (Ramani *et al.* 2013; Szatmári et Dobra 2013). De plus, malgré un manque d'information sur la stabilité du complexe, l'IL-34 peut se fixer au M-CSF et formerait ainsi une cytokine hétéromérique fonctionnelle. Ces différentes données seront donc à approfondir et à prendre en compte dans le cas d'un ciblage de l'IL-34 dans certaines pathologies afin de mettre au point des stratégies thérapeutiques efficaces. En effet, suivant l'implication des deux cytokines dans la tumorigenèse, des anticorps ciblant le M-CSFR pourraient être développés sur la base de celui de Transgène pour cibler spécifiquement la signalisation M-CSF/M-CSFR ou la signalisation IL-34 sans affecter la survie des cellules myéloïdes. L'injection ou l'expression ciblée du M-CSFR pourrait être une autre stratégie envisagée pour inhiber les cytokines, puisque les formes solubles du récepteur inhibent la signalisation du M-CSF, et donc probablement de l'IL-34. Nos résultats montrent que l'expression du M-CSFR par les cellules humaines d'ostéosarcome entraîne un ralentissement de la croissance de la tumeur primitive et du remodelage osseux du tibia. L'expression du M-CSFR permet certainement de limiter l'effet des cytokines sur le microenvironnement tumoral (angiogenèse, activité ostéoclastique, recrutement des phagocytes mononucléés, etc.). Parmi les utilisations de récepteurs leures, la protéine hexamérique BAF1 est également intéressante puisqu'elle limite l'activation du M-CSFR sans empêcher totalement la formation des complexes M-CSF/M-CSFR. Il faudrait donc étudier la liaison de l'IL-34 à BAF1 et l'activation du M-CSFR en présence du récepteur leurre. Dans le cas d'un ciblage de l'IL-34, l'inhibiteur/l'anticorps développé devrait dans l'idéal avoir une bonne distribution dans le tissu cible et une faible toxicité, limiter l'activation du M-CSFR sans empêcher sa fixation et son internalisation avec le récepteur, mais aussi empêcher la fixation de l'IL-34 au syndécan-1, au M-CSF et éventuellement au RPTP β/ζ en ciblant par exemple sa partie protéique responsable de son interaction avec les chaînes de chondroïtine sulfate. Par ailleurs, chaque patient possède une signature M-CSF/pronostique propre, expliquant des réponses différentes possibles suite au ciblage de l'axe M-CSF/M-CSFR dans différents types de tumeurs (Beck *et al.* 2009). Une analyse au cas par cas devra donc être mise en place suite à l'analyse des caractéristiques de la tumeur primitive, de sa composante myéloïde, des taux de M-CSF et d'IL-34 ainsi que du nombre de cellules myéloïdes circulantes afin d'identifier les patients les plus susceptibles de répondre à une thérapie ciblant l'axe M-CSF/IL-34/M-CSFR.

Références bibliographiques

- Adapala, Naga Suresh, Mary F. Barbe, Wallace Y. Langdon, Alexander Y. Tsygankov, et Archana Sanjay.** (2010) Cbl-Phosphatidylinositol 3 Kinase Interaction Differentially Regulates Macrophage Colony-Stimulating Factor-Mediated Osteoclast Survival and Cytoskeletal Reorganization. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1192 (mars): 376-84.
- Aharinejad, S., S. C. Marks Jr., P. Böck, A. Mason-Savas, C. A. MacKay, E. K. Larson, M. E. Jackson, M. Luffensteiner, et E. Wiesbauer.** (1995) CSF-1 treatment promotes angiogenesis in the metaphysis of osteopetrotic (toothless, tl) rats. *Bone* 16 (3): 315-24.
- Ahn, G.-One, Diane Tseng, Cho-Hwa Liao, Mary Jo Dorie, Agnieszka Czechowicz, et J. Martin Brown.** (2010). Inhibition of Mac-1 (CD11b/CD18) Enhances Tumor Response to Radiation by Reducing Myeloid Cell Recruitment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (18): 8363-68.
- Ahn, Seungkirl, Jihee Kim, Carmen L. Lucaveche, Mary C. Reedy, Louis M. Luttrell, Robert J. Lefkowitz, et Yehia Daaka.** (2002) Src-Dependent Tyrosine Phosphorylation Regulates Dynamin Self-Assembly and Ligand-Induced Endocytosis of the Epidermal Growth Factor Receptor. *The Journal of Biological Chemistry* 277 (29): 26642-51.
- Akagawa, Kiyoko S.** (2002) Functional Heterogeneity of Colony-Stimulating Factor-Induced Human Monocyte-Derived Macrophages. *International Journal of Hematology* 76 (1): 27-34.
- Allavena, Paola, Antonio Sica, Graziella Solinas, Chiara Porta, et Alberto Mantovani.** (2008) The Inflammatory Micro-Environment in Tumor Progression: The Role of Tumor-Associated Macrophages. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 66 (1): 1-9.
- Alonso, Andres, Souad Rahmouni, Scott Williams, Marianne van Stipdonk, Lukasz Jaroszewski, Adam Godzik, Robert T. Abraham, Stephen P. Schoenberger, et Tomas Mustelin.** (2003) Tyrosine Phosphorylation of VHR Phosphatase by ZAP-70. *Nature Immunology* 4 (1): 44-48.
- Alonso, Andres, Joanna Sasin, Nunzio Boffini, Ilan Friedberg, Iddo Friedberg, Andrei Osterman, Adam Godzik, Tony Hunter, Jack Dixon, et Tomas Mustelin.** (2004) Protein Tyrosine Phosphatases in the Human Genome. *Cell* 117 (6): 699-711.
- Amit, Ido, Ami Citri, Tal Shay, Yiling Lu, Menachem Katz, Fan Zhang, Gabi Tarcic, et al.** (2007) A Module of Negative Feedback Regulators Defines Growth Factor Signaling. *Nature Genetics* 39 (4): 503-12.
- Amit, Ido, Ron Wides, et Yosef Yarden.** (2007) Evolvable Signaling Networks of Receptor Tyrosine Kinases: Relevance of Robustness to Malignancy and to Cancer Therapy. *Molecular Systems Biology* 3: 151.
- Andersen, Jannik N., Ole H. Mortensen, Günther H. Peters, Paul G. Drake, Lars F. Iversen, Ole H. Olsen, Peter G. Jansen, Henrik S. Andersen, Nicholas K. Tonks, et Niels Peter H. Møller.** (2001) Structural and Evolutionary Relationships among Protein Tyrosine Phosphatase Domains. *Molecular and Cellular Biology* 21 (21): 7117-36.
- Ando, Kosei, Marie-Françoise Heymann, Verena Stresing, Kanji Mori, Françoise Rédini, et Dominique Heymann.** (2013) Current Therapeutic Strategies and Novel Approaches in Osteosarcoma. *Cancers* 5 (2): 591-616.
- Ando, Kosei, Kanji Mori, Françoise Rédini, et Dominique Heymann.** (2008) RANKL/RANK/OPG: Key Therapeutic Target in Bone Oncology. *Current Drug Discovery Technologies* 5 (3): 26368.
- Antonescu, Cristina R.** (2011) The GIST Paradigm: Lessons for Other Kinase-Driven Cancers. *The Journal of Pathology* 223 (2): 251-61.
- Appelmann, Iris, Rüdiger Liersch, Torsten Kessler, Rolf M. Mesters, et Wolfgang E. Berdel.** (2010) Angiogenesis Inhibition in Cancer Therapy: Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Their Receptors: Biological Functions and Role in Malignancy. *Recent Results in Cancer Research*. 180: 51-81.
- Arceci, R. J., F. Shanahan, E. R. Stanley, et J. W. Pollard.** (1989) Temporal Expression and Location of Colony-Stimulating Factor 1 (CSF-1) and Its Receptor in the Female Reproductive Tract Are Consistent with CSF-1-Regulated Placental Development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (22): 8818-22.
- Aricescu, A. Radu, Iain W. McKinnell, Willi Halfter, et Andrew W. Stoker.** (2002) Heparan Sulfate Proteoglycans Are Ligands for Receptor Protein Tyrosine Phosphatase Sigma. *Molecular and Cellular Biology* 22 (6): 1881-92.
- Arkin, Isaiah T.** (2002) Structural aspects of oligomerization taking place between the transmembrane α -helices of bitopic membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, Membrane Protein Structure*, 1565 (2): 347-63.

- Averbeck, Marco, Carl Gebhardt, Ulf Anderegg, Christian Termeer, Jonathan P. Sleeman, et Jan C. Simon.** (2007) Switch in Syndecan-1 and Syndecan-4 Expression Controls Maturation Associated Dendritic Cell Motility ». *Experimental Dermatology* 16 (7): 580-89.
- Baeriswyl, Vanessa, et Gerhard Christofori.** (2009) The angiogenic switch in carcinogenesis ». *Seminars in Cancer Biology, Angiogenesis in malignancy*, 19 (5): 329-37.
- Balogh, E, M Connolly, M Binięcka, J McCormick, DJ Veale, et U Fearon.** (2013) Interleukin-34 regulates angiogenesis and cell proliferation in inflammatory arthritis, This effect is potentiated by hypoxia. In *Ann Rheum Dis*, 140.
- Barve, Ruteja A, Marc D Zack, David Weiss, Ruo-Hua Song, David Beidler, et Richard D Head.** (2013) Transcriptional Profiling and Pathway Analysis of CSF-1 and IL-34 Effects on Human Monocyte Differentiation. *Cytokine* 63 (1): 10-17.
- Baselga, Jose.** (2006) Targeting Tyrosine Kinases in Cancer: The Second Wave ». *Science* 312 (5777): 1175-78.
- Baud'huin, Marc, Laurence Duplomb, Stéphane Telefchea, François Lamoureux, Carmen Ruiz-Velasco, Mike Maillason, Françoise Redini, Marie-Françoise Heymann, et Dominique Heymann.** (2013) Osteoprotegerin: Multiple Partners for Multiple Functions. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 24 (5): 401-9.
- Baud'Huin, Marc, Romain Renault, Céline Charrier, Anne Riet, Anne Moreau, Régis Brion, François Guoin, Laurence Duplomb, et Dominique Heymann.** (2010) Interleukin-34 is expressed by giant cell tumours of bone and plays a key role in RANKL-induced osteoclastogenesis. *The Journal of Pathology* 221 (1): 77-86.
- Beauvais, DeannaLee M., Brian J. Ell, Andrea R. McWhorter, et Alan C. Rapraeger.** (2009) Syndecan-1 Regulates alphavbeta3 and alphavbeta5 Integrin Activation during Angiogenesis and Is Blocked by Synstatin, a Novel Peptide Inhibitor. *The Journal of Experimental Medicine* 206 (3): 691-705.
- Beck, Andrew H., Inigo Espinosa, Badreddin Edris, Rui Li, Kelli Montgomery, Shirley Zhu, Sushama Varma, Robert J. Marinelli, Matt van de Rijn, et Robert B. West.** (2009) The Macrophage Colony-Stimulating Factor 1 Response Signature in Breast Carcinoma. *Clinical Cancer Research* 15 (3): 778-87.
- Ben-Kasus, Tsipi, Bilha Schechter, Michael Sela, et Yosef Yarden.** (2007) Cancer Therapeutic Antibodies Come of Age: Targeting Minimal Residual Disease. *Molecular Oncology* 1 (1): 42-54.
- Benslimane-Ahmim, Zahia, Florence Poirier, Claudine Delomenie, Anna Lokajczyk, Françoise Grelac, Isabelle Galy-Fauroux, Amel Mohamedi, et al.** (2013) Mechanistic Study of the Proangiogenic Effect of Osteoprotegerin. *Angiogenesis* 16 (3): 575-93.
- Bergers, Gabriele, et Laura E. Benjamin.** (2003) Tumorigenesis and the Angiogenic Switch. *Nature Reviews Cancer* 3 (6): 401-10.
- Bernfield, M., M. T. Hinkes, et R. L. Gallo.** (1993) Developmental Expression of the Syndecans: Possible Function and Regulation. *Development Supplement*, 205-12.
- Bhattacharya, M., A. V. Babwah, et S. S. G. Ferguson.** (2004) Small GTP-Binding Protein-Coupled Receptors. *Biochemical Society Transactions* 32 (Pt 6): 1040-44.
- Bingle, L., N. J. Brown, et C. E. Lewis.** (2002) The Role of Tumour-Associated Macrophages in Tumour Progression: Implications for New Anticancer Therapies. *The Journal of Pathology* 196 (3): 254-65.
- Biscardi, J. S., M. C. Maa, D. A. Tice, M. E. Cox, T. H. Leu, et S. J. Parsons.** (1999) C-Src-Mediated Phosphorylation of the Epidermal Growth Factor Receptor on Tyr845 and Tyr1101 Is Associated with Modulation of Receptor Function. *The Journal of Biological Chemistry* 274 (12): 8335-43.
- Biswas, Subhra K., et Alberto Mantovani.** (2010) Macrophage Plasticity and Interaction with Lymphocyte Subsets: Cancer as a Paradigm ». *Nature Immunology* 11 (10): 889-96.
- Blake, R. A., P. Garcia-Paramio, P. J. Parker, et S. A. Courtneidge.** (1999) Src Promotes PKCdelta Degradation ». *Cell Growth & Differentiation: The Molecular Biology Journal of the American Association for Cancer Research* 10 (4): 231-41.
- Blume-Jensen, P., et T. Hunter.** (2001) Oncogenic Kinase Signalling ». *Nature* 411 (6835): 355-65.
- Boissy, Patrice, Luc Malaval, et Pierre Jurdic.** (2000) Ostéoblastes et ostéoclastes: une coopération exemplaire entre cellules mésenchymateuses et cellules hématopoïétiques ». *Hématologie* 6 (1): 6-16.
- Bonewald, Lynda F., et Mark L. Johnson.** (2008) Osteocytes, Mechanosensing and Wnt Signaling. *Bone* 42 (4): 606-15.

- Bonifer, Constanze, et David A. Hume.** (2008) The Transcriptional Regulation of the Colony-Stimulating Factor 1 Receptor (*csf1r*) Gene during Hematopoiesis ». *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 13: 549-60.
- Boström, Elisabeth A., et Pernilla Lundberg.** (2013) The Newly Discovered Cytokine IL-34 Is Expressed in Gingival Fibroblasts, Shows Enhanced Expression by Pro-Inflammatory Cytokines, and Stimulates Osteoclast Differentiation. *PLoS ONE* 8 (12): e81665.
- Bottini, Nunzio, Lucia Musumeci, Andres Alonso, Souad Rahmouni, Konstantina Nika, Masoud Rostamkhani, James MacMurray, et al.** (2004) A Functional Variant of Lymphoid Tyrosine Phosphatase Is Associated with Type I Diabetes. *Nature Genetics* 36 (4): 337-38.
- Bourette, R. P., G. M. Myles, J. L. Choi, et L. R. Rohrschneider.** (1997) Sequential Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase and Phospholipase C- γ 2 by the M-CSF Receptor Is Necessary for Differentiation Signaling. *The EMBO Journal* 16 (19): 5880-93.
- Bourgin, Caroline, Roland P. Bourette, Sylvie Arnaud, Yan Liu, Larry R. Rohrschneider, et Guy Mouchiroud.** (2002) Induced Expression and Association of the Mona/Gads Adapter and Gab3 Scaffolding Protein during Monocyte/macrophage Differentiation ». *Molecular and Cellular Biology* 22 (11): 3744-56.
- Boyle, William J., W. Scott Simonet, et David L. Lacey.** (2003) Osteoclast Differentiation and Activation. *Nature* 423 (6937): 337-42.
- Brach, M. A., R. Henschler, R. H. Mertelsmann, et F. Herrmann.** (1991) Regulation of M-CSF Expression by M-CSF: Role of Protein Kinase C and Transcription Factor NF Kappa B. *Pathobiology: Journal of Immunopathology, Molecular and Cellular Biology* 59 (4): 284-88.
- Bradshaw, R. A., R. J. Chalkley, J. Biarc, et A. L. Burlingame.** (2013) Receptor tyrosine kinase signaling mechanisms: Devolving TrkA responses with phosphoproteomics. *Advances in Biological Regulation* 53 (1): 87-96.
- Brady-Kalnay, S. M., T. Mourton, J. P. Nixon, G. E. Pietz, M. Kinch, H. Chen, R. Brackenbury, D. L. Rimm, R. L. Del Vecchio, et N. K. Tonks.** (1998) Dynamic Interaction of PTPmu with Multiple Cadherins in Vivo. *The Journal of Cell Biology* 141 (1): 287-96.
- Brockstedt, Ulrika, Katalin Dobra, Mervi Nurminen, et Anders Hjerpe.** (2002) Immunoreactivity to Cell Surface Syndecans in Cytoplasm and Nucleus: Tubulin-Dependent Rearrangements. *Experimental Cell Research* 274 (2): 235-45.
- Bromann, Paul A., Hasan Korkaya, et Sara A. Courtneidge.** (2004) The Interplay between Src Family Kinases and Receptor Tyrosine Kinases. *Oncogene* 23 (48): 7957-68.
- Brule, Severine, Nathalie Charnaux, Angela Sutton, Dominique Ledoux, Thomas Chaigneau, Line Saffar, et Liliane Gattegno.** (2006) The Shedding of Syndecan-4 and Syndecan-1 from HeLa Cells and Human Primary Macrophages Is Accelerated by SDF-1/CXCL12 and Mediated by the Matrix Metalloproteinase-9 ». *Glycobiology* 16 (6): 488-501.
- Burns, Christopher J, et Andrew F Wilks.** (2011) c-FMS inhibitors: a patent review ». *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 21: 147-65.
- Camozzi, V., F. Vescini, G. Luisetto, et L. Moro.** (2010) Bone Organic Matrix Components: Their Roles in Skeletal Physiology. *Journal of Endocrinological Investigation* 33 (7 Suppl): 13- 15.
- Canoll, P. D., S. Petanceska, J. Schlessinger, et J. M. Musacchio.** (1996) Three Forms of RPTP-Beta Are Differentially Expressed during Gliogenesis in the Developing Rat Brain and during Glial Cell Differentiation in Culture. *Journal of Neuroscience Research* 44 (3): 199-215.
- Capasso, Luigi L.** (2005) Antiquity of Cancer. *International Journal of Cancer* 113 (1): 2-13.
- Cappariello, Alfredo, Antonio Maurizi, Vimal Veeriah, et Anna Teti.** (2014) The Great Beauty of the Osteoclast . *Archives of Biochemistry and Biophysics* 558C : 70-78.
- Capulli, Mattia, Riccardo Paone, et Nadia Rucci.** (2014) Osteoblast and Osteocyte: Games without Frontiers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*.
- Cargnello, Marie, et Philippe P. Roux.** (2011) Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 75 (1): 50-83.
- Carmeliet, Peter, et Rakesh K. Jain.** (2000) Angiogenesis in Cancer and Other Diseases ». *Nature* 407 (6801): 249-57.

- Castaño, Zafira, Christine M. Fillmore, Carla F. Kim, et Sandra S. McAllister.** (2012) The Bed and the Bugs: Interactions between the Tumor Microenvironment and Cancer Stem Cells. *Seminars in Cancer Biology* 22 (5-6): 462-70.
- Cerretti, D. P., J. Wignall, D. Anderson, R. J. Tushinski, B. Gallis, et D. Cosman.** (1990) Membrane Bound Forms of Human Macrophage Colony Stimulating Factor (M-CSF, CSF-1). *Progress in Clinical and Biological Research* 352: 63-70.
- Chang, Seon Hee, et Chen Dong.** (2007) A Novel Heterodimeric Cytokine Consisting of IL-17 and IL-17F Regulates Inflammatory Responses. *Cell Research* 17 (5): 435-40.
- Chang, Sung Hae, Byoong Yong Choi, Jungbum Choi, Jong Jin Yoo, You-Jung Ha, Hyon Joung Cho, Eun Ha Kang, Yeong Wook Song, et Yun Jong Lee.** (2014) Baseline Serum Interleukin-34 Levels Independently Predict Radiographic Progression in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Rheumatology International*. [Epub ahead of print]
- Chemel, M, B Le Goff, R Brion, C Cozic, M Berreur, J Amiaud, G Bougras, et al.** (2012) Interleukin 34 expression is associated with synovitis severity in rheumatoid arthritis patients. *Annals of the rheumatic diseases* 71 (1): 150-54.
- Chen, Qishan, Min Jin, Feng Yang, Jianhua Zhu, Qingzhong Xiao, et Li Zhang.** (2013) Matrix Metalloproteinases: Inflammatory Regulators of Cell Behaviors in Vascular Formation and Remodeling. *Mediators of Inflammation* 2013: 928315.
- Chen, Xiaoyan, Heli Liu, Pamela J Focia, Ann Hye-Ryong Shim, et Xiaolin He.** (2008) Structure of Macrophage Colony Stimulating Factor Bound to FMS: Diverse Signaling Assemblies of Class III Receptor Tyrosine Kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (47): 18267-72.
- Chen, Zhi, Kalman Buki, Jukka Vääräniemi, Guoliang Gu, et H. Kalervo Väänänen.** (2011) The Critical Role of IL-34 in Osteoclastogenesis. *PLoS One* 8;6(4):e18689.
- Chihara, T, S Suzu, R Hassan, N Chutiwitoonchai, M Hiyoshi, K Motoyoshi, F Kimura, et S Okada.** (2010) IL-34 and M-CSF share the receptor Fms but are not identical in biological activity and signal activation. *Cell Death Differ* 17 (12): 1917-27.
- Chitu, Violeta, et E Richard Stanley.** (2006) Colony-Stimulating Factor-1 in Immunity and Inflammation. *Current Opinion in Immunology* 18 (1): 39-48.
- Choi, Sojoong, Hawon Lee, Jung Ran Choi, et Eok Soo Oh.** (2010) Shedding; towards a New Paradigm of Syndecan Function in Cancer. *BMB Reports* 43 (5): 305-10.
- Choudhary, Chunaram, et Matthias Mann.** (2010) Decoding Signalling Networks by Mass Spectrometry-Based Proteomics. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 11 (6): 427-39.
- Choy, Edwin, Francis Hornicek, Laura MacConaill, David Harmon, Zeeshan Tariq, Levi Garraway, et Zhenfeng Duan.** (2012) High-Throughput Genotyping in Osteosarcoma Identifies Multiple Mutations in Phosphoinositide-3-Kinase and Other Oncogenes. *Cancer* 118 (11): 2905-14.
- Ciccia, Francesco, Riccardo Alessandro, Vito Rodolico, Giuliana Guggino, Stefania Raimondo, Carla Guarnotta, AnnaRita Giardina, et al.** (2013) IL-34 Is Overexpressed in the Inflamed Salivary Glands of Patients with Sjogren's Syndrome and Is Associated with the Local Expansion of pro-Inflammatory CD14(bright)CD16+ Monocytes. *Rheumatology* 52 (6): 1009-17.
- Civitelli, Roberto.** (2008) Cell-Cell Communication in the Osteoblast/osteocyte Lineage. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 473 (2): 188-92.
- Clark, Simon J., Paul N. Bishop, et Anthony J. Day.** (2013) The proteoglycan glycomatrix: a sugar microenvironment essential for complement regulation. *Inflammation* 4: 412.
- Clavel, Gaëlle, Allan Thiolat, et Marie-Christophe Boissier.** (2013) Interleukin Newcomers Creating New Numbers in Rheumatology: IL-34 to IL-38. *Joint, Bone, Spine: Revue Du Rhumatisme* 80 (5): 449-53.
- Clézardin, Philippe.** (2011) The role of RANK/RANKL/osteoprotegerin (OPG) triad in cancer-induced bone diseases: physiopathology and clinical implications. *Bulletin Du Cancer* 98 (7): 8377-46.
- Cohen, Paula E., Liyin Zhu, Kayoko Nishimura, et Jeffrey W. Pollard.** (2002) Colony-Stimulating Factor 1 Regulation of Neuroendocrine Pathways That Control Gonadal Function in Mice. *Endocrinology* 143 (4): 1413-22.

- Coussens, L., C. Van Beveren, D. Smith, E. Chen, R. L. Mitchell, C. M. Isacke, I. M. Verma, et A. Ullrich.** (1986) Structural Alteration of Viral Homologue of Receptor Proto-Oncogene Fms at Carboxyl Terminus ». *Nature* 320 (6059): 277-80.
- Cseh, Botond, Eszter Doma, et Manuela Baccarini.** (2014) "RAF" neighborhood: Protein–protein interaction in the Raf/Mek/Erk pathway. *FEBS Letters*, Paris, 588 (15): 2398-2406.
- Cully, Megan, Han You, Arnold J. Levine, et Tak W. Mak.** (2006) Beyond PTEN Mutations: The PI3K Pathway as an Integrator of Multiple Inputs during Tumorigenesis. *Nature Reviews. Cancer* 6 (3): 184-92.
- Curry, Jennifer M, Tim D Eubank, Ryan D Roberts, Yijie Wang, Nabendu Pore, Amit Maity, et Clay B Marsh.** (2008) M-CSF Signals through the MAPK/ERK Pathway via Sp1 to Induce VEGF Production and Induces Angiogenesis in Vivo. *PLoS One* 3 (10): e3405.
- Dai, Xu-Ming, Gregory R Ryan, Andrew J Hapel, Melissa G Dominguez, Robert G Russell, Sara Kapp, Vonetta Sylvestre, et E Richard Stanley.** (2002) Targeted Disruption of the Mouse Colony-Stimulating Factor 1 Receptor Gene Results in Osteopetrosis, Mononuclear Phagocyte Deficiency, Increased Primitive Progenitor Cell Frequencies, and Reproductive Defects. *Blood* 99 (1): 111-20.
- Dai, Xu-Ming, Xiao-Hua Zong, Vonetta Sylvestre, et E. Richard Stanley.** (2004) Incomplete Restoration of Colony-Stimulating Factor 1 (CSF-1) Function in CSF-1–deficient *Csf1op/Csf1op* Mice by Transgenic Expression of Cell Surface CSF-1. *Blood* 103 (3): 1114-23.
- DeNardo, David G., Donal J. Brennan, Elton Rexhepaj, Brian Ruffell, Stephen L. Shiao, Stephen F. Madden, William M. Gallagher, et al.** (2011) Leukocyte Complexity Predicts Breast Cancer Survival and Functionally Regulates Response to Chemotherapy. *Cancer Discovery* 1 (1): 54-67
- Derksen, Patrick W. B., Robert M. J. Keehnen, Ludo M. Evers, Marinus H. J. van Oers, Marcel Spaargaren, et Steven T. Pals.** (2002) Cell Surface Proteoglycan Syndecan-1 Mediates Hepatocyte Growth Factor Binding and Promotes Met Signaling in Multiple Myeloma. *Blood* 99 (4): 1405-10.
- Desandes, Emmanuel, Jacqueline Clavel, Claire Berger, Jean-Louis Bernard, Pascale Blouin, Lionel de Lumley, François Demeocq, et al.** (2004) Cancer Incidence among Children in France, 1990-1999. *Pediatric Blood & Cancer* 43 (7): 749-57.
- Deuel, Thomas F.** (2013) Anaplastic Lymphoma Kinase: "Ligand Independent Activation" Mediated by the PTN/RPTPβ/ζ Signaling Pathway. *Biochimica et Biophysica Acta* 1834 (10): 2219-23.
- Deuel, Thomas F., Nan Zhang, Hsui-Jen Yeh, Inmaculada Silos-Santiago, et Zhao-Yi Wang.** (2002) Pleiotrophin: A Cytokine with Diverse Functions and a Novel Signaling Pathway. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 397 (2): 162-71.
- Dikic, Ivan, et Silvia Giordano.** (2003) Negative Receptor Signalling. *Current Opinion in Cell Biology* 15 (2): 128-35.
- Domanska, Urszula M., Roeliene C. Kruizinga, Wouter B. Nagengast, Hetty Timmer-Bosscha, Gerwin Huls, Elisabeth G. E. de Vries, et Annemiek M. E. Walenkamp.** (2013) A review on CXCR4/CXCL12 axis in oncology: No place to hide. *European Journal of Cancer* 49 (1): 219-30.
- Dougall, William C., Ingunn Holen, et Eva González Suárez.** (2014) Targeting RANKL in Metastasis. *BoneKey Reports* 3. [Epub ahead of print]
- Downing, J. R., M. F. Roussel, et C. J. Sherr.** (1989) Ligand and Protein Kinase C Downmodulate the Colony-Stimulating Factor 1 Receptor by Independent Mechanisms. *Molecular and Cellular Biology* 9 (7): 2890-96.
- Drain, Nathalie, et Eric Solary.** (2010) Editorial: CSF1R, CSF-1, and IL-34, a "ménage à trois" conserved across vertebrates. *Journal of Leukocyte Biology* 87 (5): 745-47.
- Duan, Lei, Yuko Miura, Manjari Dimri, Biswanath Majumder, Ingrid L. Dodge, Alagarsamy L. Reddi, Amiya Ghosh, et al.** (2003) Cbl-Mediated Ubiquitinylation Is Required for Lysosomal Sorting of Epidermal Growth Factor Receptor but Is Dispensable for Endocytosis. *The Journal of Biological Chemistry* 278 (31): 28950-60.
- Dujardin, Fanny, Matthieu Bui Nguyen Binh, Corinne Bouvier, Anne Gomez-Brouchet, Frédérique Larousserie, Anne de Muret, Caroline Louis-Brennetot, et al.** (2011) MDM2 and CDK4 Immunohistochemistry Is a Valuable Tool in the Differential Diagnosis of Low-Grade Osteosarcomas and Other Primary Fibro-Osseous Lesions of the Bone. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 24 (5): 624-37.
- Duong, S. B. Rodan and L. T.** (2008) Cathepsin K – A new molecular target for osteoporosis. *IBMS BoneKey* 5: 16-24.

- Eda, Hiroyuki, Hideaki Shimada, David R. Beidler, et Joseph B. Monahan.** (2010) Proinflammatory cytokines, IL-1 β and TNF- α , induce expression of interleukin-34 mRNA via JNK- and p44/42 MAPK-NF- κ B pathway but not p38 pathway in osteoblasts. *Rheumatology International*, 31 (11):1525-30.
- Ek-Rylander, Barbro, et Göran Andersson.** (2010) Osteoclast Migration on Phosphorylated Osteopontin Is Regulated by Endogenous Tartrate-Resistant Acid Phosphatase. *Experimental Cell Research* 316 (3): 443-51.
- Elegheert, Jonathan, Ambroise Desfosses, Alexander V Shkumatov, Xiongwu Wu, Nathalie Bracke, Kenneth Verstraete, Kathleen Van Craenenbroeck, et al.** (2011) Extracellular Complexes of the Hematopoietic Human and Mouse CSF-1 Receptor Are Driven by Common Assembly Principles. *Structure* 19 (12): 1762-72.
- Elenius, Klaus, et Markku Jalkanen.** (1994) Function of the Syndecans - a Family of Cell Surface Proteoglycans. *Journal of Cell Science* 107 (11): 2975-82.
- Elgerf, K. D., D. G. Alleva, et D. W. Mullins.** (1998) Tumor-Induced Immune Dysfunction: The Macrophage Connection. *Journal of Leukocyte Biology* 64 (3): 275-90.
- Entz-Werlé, Natacha, Luc Marcellin, Marie-Pierre Gaub, Eric Guerin, Anne Schneider, Perrine Berard-Marec, Chantal Kalifa, et al.** (2005) Prognostic Significance of Allelic Imbalance at the c-Kit Gene Locus and c-Kit Overexpression by Immunohistochemistry in Pediatric Osteosarcomas. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 23 (10): 2248-55.
- Eswarakumar, V. P., I. Lax, et J. Schlessinger.** (2005) Cellular Signaling by Fibroblast Growth Factor Receptors. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 16 (2): 139-49.
- Eubank, Tim D, Michelle Galloway, Christine M Montague, W James Waldman, et Clay B Marsh.** (2003) M-CSF Induces Vascular Endothelial Growth Factor Production and Angiogenic Activity from Human Monocytes. *Journal of Immunology* 171 (5): 2637-43.
- Felix, Jan, Jonathan Elegheert, Irina Gutsche, Alexander V. Shkumatov, Yurong Wen, Nathalie Bracke, Erwin Pannecoucke, et al.** (2013) Human IL-34 and CSF-1 Establish Structurally Similar Extracellular Assemblies with Their Common Hematopoietic Receptor. *Structure* 21 (4): 528-39.
- Fend, Laetitia, Nathalie Accart, Jacqueline Kintz, Sandrine Cochin, Carine Reymann, Fabrice Le Pogam, Jean-Baptiste Marchand, et al.** (2013) Therapeutic Effects of Anti-CD115 Monoclonal Antibody in Mouse Cancer Models through Dual Inhibition of Tumor-Associated Macrophages and Osteoclasts. *PloS One* 8 (9): e73310.
- Ferenbach, D., et J. Hughes.** (2008) Macrophages and Dendritic Cells: What Is the Difference?. *Kidney International* 74 (1): 5-7.
- Ferrara, Napoleone.** (2004) Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress. *Endocrine Reviews* 25 (4): 581-611.
- Fitzgerald, Marilyn L., Zihua Wang, Pyong Woo Park, Gillian Murphy, et Merton Bernfield.** (2000) Shedding of Syndecan-1 and -4 Ectodomains Is Regulated by Multiple Signaling Pathways and Mediated by a Timp-3-Sensitive Metalloproteinase. *The Journal of Cell Biology* 148 (4): 811-24.
- Fleetwood, Andrew J., Toby Lawrence, John A. Hamilton, et Andrew D. Cook.** (2007) Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (CSF) and Macrophage CSF-Dependent Macrophage Phenotypes Display Differences in Cytokine Profiles and Transcription Factor Activities: Implications for CSF Blockade in Inflammation. *Journal of Immunology* 178 (8): 5245-52.
- Fletcher, CDM, JA Bridge, P Hogendoorn, et F Mertens.** (2013) WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone. Fourth Edition. Vol. 5. WHO.
- Forget, Mary A, Jeffrey L Voorhees, Sara L Cole, Duaa Dakhallah, Ivory L Patterson, Amy C Gross, Leni Moldovan, et al.** (2014) Macrophage Colony-Stimulating Factor Augments tie2-Expressing Monocyte Differentiation, Angiogenic Function, and Recruitment in a Mouse Model of Breast Cancer. *PloS One* 9 (6): e98623.
- Foucher, Etienne D, Simon Blanchard, Laurence Preisser, Erwan Garo, Norbert Ibrah, Philippe Guardiola, Yves Delneste, et Pascale Jeannin.** (2013) IL-34 Induces the Differentiation of Human Monocytes into Immunosuppressive Macrophages. Antagonistic Effects of GM-CSF and IFN γ . *PloS one* 8 (2): e56045.
- Franz-Odenaal, Tamara A., Brian K. Hall, et P. Eckhard Witten.** (2006) Buried Alive: How Osteoblasts Become Osteocytes. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 235 (1): 176-90.
- Freeley, Michael, Dermot Kelleher, et Aideen Long.** (2011) Regulation of Protein Kinase C function by phosphorylation on conserved and non-conserved sites. *Cellular Signalling* 23 (5): 753-62.

- Freeman, M.** (2000) Feedback Control of Intercellular Signalling in Development. *Nature* 408 (6810): 313-19.
- Frérier, Stéphanie, Arnaud Besse, Adriana Delwail, Martine Garcia, Franck Morel, Valérie Leprivey-Lorgeot, John Wijdenes, Vincent Praloran, et Jean-Claude Lecron.** (2002) Cyclosporin A Inhibition of Macrophage Colony-Stimulating Factor (M-CSF) Production by Activated Human T Lymphocytes. *Journal of Leukocyte Biology* 71 (2): 289-94.
- Friedlander, M., P. C. Brooks, R. W. Shaffer, C. M. Kincaid, J. A. Varner, et D. A. Cheresh.** (1995) Definition of Two Angiogenic Pathways by Distinct Alpha v Integrins. *Science* 270 (5241): 1500-1502.
- Fuchs, Bruno, et Douglas J. Pritchard.** (2002) Etiology of Osteosarcoma. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, no 397: 40-52.
- Furstoss, Olivia, Karel Dorey, Valérie Simon, Daniela Barilà, Giulio Superti-Furga, et Serge Roche.** (2002) C-Abl Is an Effector of Src for Growth Factor-Induced c-Myc Expression and DNA Synthesis. *The EMBO Journal* 21 (4): 514-24.
- Galson, Deborah L., et G. David Roodman.** (2014) Pathobiology of Paget's Disease of Bone. *Journal of Bone Metabolism* 21 (2): 85-98.
- Gangoiti, Patricia, María H. Granado, Shih Wei Wang, Jennifer Y. Kong, Urs P. Steinbrecher, et Antonio Gómez-Muñoz.** (2008) Ceramide 1-Phosphate Stimulates Macrophage Proliferation through Activation of the PI3-kinase/PKB, JNK and ERK1/2 Pathways. *Cellular Signalling* 20 (4): 726-36.
- Garbers, D L, D Koelsing, et G Schultz.** (1994) Guanylyl cyclase receptors. » *Molecular Biology of the Cell* 5 (1): 1-5.
- Garceau, Valerie, Jacqueline Smith, Ian R. Paton, Megan Davey, Mario A. Fares, David P. Sester, David W. Burt, et David A. Hume.** (2010) Pivotal Advance: Avian colony-stimulating factor 1 (CSF-1), interleukin-34 (IL-34), and CSF-1 receptor genes and gene products. *J Leukoc Biol* 87(5):753-64.
- Gaspar, Nathalie, Angela Di Giannatale, Birgit Georger, Françoise Redini, Nadège Corradini, Natacha Enz-Werle, Franck Tirode, et al.** (2012) Bone Sarcomas: From Biology to Targeted Therapies. *Sarcoma* 2012: 301975.
- Geissmann, Frédéric, Siamon Gordon, David A. Hume, Allan M. Mowat, et Gwendalyn J. Randolph.** (2010) Unravelling Mononuclear Phagocyte Heterogeneity. *Nature Reviews Immunology* 10 (6): 453-60.
- Geissmann, Frederic, Markus G. Manz, Steffen Jung, Michael H. Sieweke, Miriam Merad, et Klaus Ley.** (2010) Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells. *Science* 327 (5966): 656-61.
- Georgess, Dan, Irma Machuca-Gayet, Anne Blangy, et Pierre Jurdic.** (2014) Podosome Organization Drives Osteoclast-Mediated Bone Resorption. *Cell Adhesion & Migration* 8 (3).
- Ginhoux, Florent, Melanie Greter, Marylene Leboeuf, Sayan Nandi, Peter See, Solen Gokhan, Mark F Mehler, et al.** (2010) Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages ». *Science* 330 (6005): 841-45.
- Ginhoux, Florent, Frank Tacke, Veronique Angeli, Milena Bogunovic, Martine Loubeau, Xu-Ming Dai, E. Richard Stanley, Gwendalyn J. Randolph, et Miriam Merad.** (2006) Langerhans Cells Arise from Monocytes in Vivo. *Nature Immunology* 7 (3): 265-73.
- Gobin, Bérengère, Séverine Battaglia, Rachel Lanel, Julie Chesneau, Jérôme Amiaud, Françoise Rédini, Benjamin Ory, et Dominique Heymann.** (2014) NVP-BEZ235, a Dual PI3K/mTOR Inhibitor, Inhibits Osteosarcoma Cell Proliferation and Tumor Development in Vivo with an Improved Survival Rate. *Cancer Letters* 344 (2): 291-98.
- Gobin, Bérengère, Marc Baud' Huin, François Lamoureux, Benjamin Ory, Céline Charrier, Rachel Lanel, Séverine Battaglia, et al.** (2014) BYL719, a New A-Specific PI3K Inhibitor: Single Administration and in Combination with Conventional Chemotherapy for the Treatment of Osteosarcoma. *International Journal of Cancer*. [Epub ahead of print]
- Gobin, Bérengère, Gatien Moriceau, Benjamin Ory, Céline Charrier, Régis Brion, Frederic Blanchard, Françoise Redini, et Dominique Heymann.** (2014) Imatinib Mesylate Exerts Anti-Proliferative Effects on Osteosarcoma Cells and Inhibits the Tumour Growth in Immunocompetent Murine Models ». *PloS One* 9 (3): e90795.
- Gohji, K., M. Nakajima, D. Boyd, C. P. Dinney, C. D. Bucana, S. Kitazana, S. Kamidono, et I. J. Fidler.** (1997) Organ-Site Dependence for the Production of Urokinase-Type Plasminogen Activator and Metastasis by Human Renal Cell Carcinoma Cells. *The American Journal of Pathology* 151 (6): 1655-61.

- Goi, T., M. Shipitsin, Z. Lu, D. A. Foster, S. G. Klinz, et L. A. Feig.** (2000) An EGF receptor/Ral-GTPase Signaling Cascade Regulates c-Src Activity and Substrate Specificity. *The EMBO Journal* 19 (4): 623-30.
- Goldmann, T., F. Otto, et E. Vollmer.** (2000) A Receptor-Type Protein Tyrosine Phosphatase PTP Zeta Is Expressed in Human Cutaneous Melanomas. *Folia Histochemica Et Cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society* 38 (1): 19-20.
- Gordon, Siamon, et Fernando O. Martinez.** (2010) Alternative Activation of Macrophages: Mechanism and Functions ». *Immunity* 32 (5): 593-604.
- Götte, Martin, Antonia M. Jousen, Christoph Klein, Patrick Andre, Denisa D. Wagner, Michael T. Hinkes, Bernd Kirchhof, Anthony P. Adamis, et Merton Bernfield.** (2002) Role of Syndecan-1 in Leukocyte-Endothelial Interactions in the Ocular Vasculature. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 43 (4): 1135-41.
- Goubran, Hadi A., Rami R. Kotb, Julie Stakiw, Mohamed E. Emara, et Thierry Burnouf.** (2014) Regulation of Tumor Growth and Metastasis: The Role of Tumor Microenvironment. *Cancer Growth and Metastasis* 7: 9-18.
- Gouon-Evans, V., M. E. Rothenberg, et J. W. Pollard.** (2000) Postnatal Mammary Gland Development Requires Macrophages and Eosinophils. *Development* 127 (11): 2269-82.
- Graf, M. R., M. R. Jadus, J. C. Hiserodt, H. T. Wepsic, et G. A. Granger.** (1999) Development of Systemic Immunity to Glioblastoma Multiforme Using Tumor Cells Genetically Engineered to Express the Membrane-Associated Isoform of Macrophage Colony-Stimulating Factor. *Journal of Immunology* 163 (10): 5544-51.
- Green, Jeffery T., et Anne M. Mills.** (2014). Osteogenic Tumors of Bone. *Seminars in Diagnostic Pathology* 31 (1): 21-29.
- Greter, Melanie, Iva Lelios, Pawel Pelczar, Guillaume Hoeffel, Jeremy Price, Marylene Leboeuf, Thomas M Kündig, et al.** (2012) Stroma-Derived Interleukin-34 Controls the Development and Maintenance of Langerhans Cells and the Maintenance of Microglia. *Immunity* 37 (6): 1050-60.
- Gu, Guoliang, Mika Mulari, Zhiqi Peng, Teuvo A. Hentunen, et H. Kalervo Väänänen.** (2005) Death of Osteocytes Turns off the Inhibition of Osteoclasts and Triggers Local Bone Resorption. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 335 (4): 1095-1101.
- Guilbert, L. J., et E. R. Stanley.** (1980) Specific Interaction of Murine Colony-Stimulating Factor with Mononuclear Phagocytic Cells. *The Journal of Cell Biology* 85 (1): 153-59.
- Guilbert, L J, et E R Stanley.** (1986) The Interaction of 125I-Colony-Stimulating Factor-1 with Bone Marrow-Derived Macrophages. *The Journal of Biological Chemistry* 261 (9): 4024-32.
- Guillon, Maud AM, Pierre MJ Mary, Laurence Brugiere, Perrine Marec-Berard, Helene D Pacquement, Claudine Schmitt, Jean-Marc Guinebretiere, et Marie-Dominique P Tabone.** (2011) Clinical characteristics and prognosis of osteosarcoma in young children: a retrospective series of 15 cases. *BMC Cancer* 11: 407.
- Guinebretière, JM, A , Le Cenne, C Le p échoux, G Missenard, S Bonvalot, P Terrier, et D Vanel.** (2001) « Osté ». In *Encycl Méd Chir*, 14-704.
- Habuchi, Hiroko, Osami Habuchi, et Koji Kimata.** (2004) Sulfation Pattern in Glycosaminoglycan: Does It Have a Code?. *Glycoconjugate Journal* 21 (1-2): 47-52.
- Häcker, Udo, Kent Nybakken, et Norbert Perrimon.** (2005) Heparan Sulphate Proteoglycans: The Sweet Side of Development. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 6 (7): 530-41.
- Haegel, Hélène, Christine Thioudellet, Rémy Hallet, Michel Geist, Thierry Menguy, Fabrice Le Pogam, Jean-Baptiste Marchand, et al.** (2013) A Unique Anti-CD115 Monoclonal Antibody Which Inhibits Osteolysis and Skews Human Monocyte Differentiation from M2-Polarized Macrophages toward Dendritic Cells. *mAbs* 5 (5): 736-47.
- Hamilton, John A.** (2008) Colony-Stimulating Factors in Inflammation and Autoimmunity. *Nature Reviews Immunology* 8 (7): 533-44.
- Hamilton, John A., et Adrian Achuthan.** (2013) Colony Stimulating Factors and Myeloid Cell Biology in Health and Disease. *Trends in Immunology* 34 (2): 81-89.
- Hampe, A., B. M. Shamoan, M. Gobet, C. J. Sherr, et F. Galibert.** (1989) Nucleotide Sequence and Structural Organization of the Human FMS Proto-Oncogene. *Oncogene Research* 4 (1): 9-17.
- Harada, Shun-ichi, et Gideon A. Rodan.** (2003) Control of Osteoblast Function and Regulation of Bone Mass ». *Nature* 423 (6937): 349-55.
- Harroch, S., M. Palmeri, J. Rosenbluth, A. Custer, M. Okigaki, P. Shrager, M. Blum, J. D. Buxbaum, et J. Schlessinger.** 2000. « No Obvious Abnormality in Mice Deficient in Receptor Protein Tyrosine Phosphatase B ». *Molecular and Cellular Biology* 20 (20): 7706-15.

- Hart, I. R.** (1979) The Selection and Characterization of an Invasive Variant of the B16 Melanoma. *The American Journal of Pathology* 97 (3): 587-600.
- Hauben, E. I., J. Arends, J. P. Vandenbroucke, C. J. van Asperen, E. Van Marck, et P. C. W. Hogendoorn.** (2003) Multiple Primary Malignancies in Osteosarcoma Patients. Incidence and Predictive Value of Osteosarcoma Subtype for Cancer Syndromes Related with Osteosarcoma. *European Journal of Human Genetics: EJHG* 11 (8): 611-18.
- Hauben, El, et PCW Hogendoorn.** (2010) Epidemiology of primary bone tumors and economical aspects of bone metastasis. Cytogenetics of bone tumors. In *Bone Cancer: Progression and therapeutic approaches*. Academic Press. Heymann.
- Haupt, Larisa M., Sadasivam Murali, Foong Kin Mun, Nadiya Teplyuk, Leong Fong Mei, Gary S. Stein, Andre J. van Wijnen, Victor Nurcombe, et Simon M. Cool.** (2009) The Heparan Sulfate Proteoglycan (HSPG) Glypican-3 Mediates Commitment of MC3T3-E1 Cells toward Osteogenesis. *Journal of Cellular Physiology* 220 (3): 780-91.
- Hayman, Alison R.** (2008) Tartrate-Resistant Acid Phosphatase (TRAP) and the Osteoclast/immune Cell Dichotomy. *Autoimmunity* 41 (3): 218-23.
- Heldin, C. H., et B. Westermark.** (1999) Mechanism of Action and in Vivo Role of Platelet-Derived Growth Factor. *Physiological Reviews* 79 (4): 1283-1316.
- Hemingway, F., R. Taylor, H. J. Knowles, et N. A. Athanasou.** (2011) RANKL-Independent Human Osteoclast Formation with APRIL, BAFF, NGF, IGF I and IGF II. *Bone* 48 (4): 938-44.
- Heymann, Dominique, Sébastien Lepreux.** (2008) Le tissu osseux. In *Histologie: bases fondamentales*.
- Heymann, Dominique.** (2010) Interleukin-34: An Enigmatic Cytokine. *IBMS BoneKEy* 7 (11): 406-13.
- Heymann, Dominique.** (2010) Bone cancer : progression and therapeutic approaches. Academic Press.
- Heymann, Dominique, Yannick Fortun, Françoise Rédini, et Marc Padrines.** (2005) Osteolytic bone diseases: physiological analogues of bone resorption effectors as alternative therapeutic tools. *Drug discovery today* 10 (4): 242-47.
- Heymann, Dominique, et Françoise Rédini.** (2013) Targeted Therapies for Bone Sarcomas. *BoneKEy Reports* 2: 378.
- Hiasa, Masahiro, Masahiro Abe, Ayako Nakano, Asuka Oda, Hiroe Amou, Shinsuke Kido, Kyoko Takeuchi, et al.** (2009) GM-CSF and IL-4 Induce Dendritic Cell Differentiation and Disrupt Osteoclastogenesis through M-CSF Receptor Shedding by up-Regulation of TNF- α Converting Enzyme (TACE). *Blood* 114 (20): 4517-26.
- Hicke, L.** (2001) Protein Regulation by Monoubiquitin. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 2 (3): 195-201.
- Hicklin, Daniel J., et Lee M. Ellis.** (2005) Role of the Vascular Endothelial Growth Factor Pathway in Tumor Growth and Angiogenesis. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 23 (5): 1011-27.
- Hirota, S., K. Iozaki, Y. Moriyama, K. Hashimoto, T. Nishida, S. Ishiguro, K. Kawano, et al.** (1998) Gain-of-Function Mutations of c-Kit in Human Gastrointestinal Stromal Tumors ». *Science* 279 (5350): 577-80.
- Hoellenriegel, Julia, Sarah A. Meadows, Mariela Sivina, William G. Wierda, Hagop Kantarjian, Michael J. Keating, Neill Giese, et al.** (2011) The Phosphoinositide 3'-Kinase Delta Inhibitor, CAL-101, Inhibits B-Cell Receptor Signaling and Chemokine Networks in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood* 118 (13): 3603-12.
- Holliday, L. Shannon, Michael R. Bubb, Jin Jiang, I. Rita Hurst, et Jian Zuo.** (2005) Interactions between Vacuolar H⁺-ATPases and Microfilaments in Osteoclasts ». *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 37 (6): 419-23.
- Hubbard, Stevan R.** (2002) Autoinhibitory Mechanisms in Receptor Tyrosine Kinases. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 7: d330-40.
- Hubbard, Stevan R., et W. Todd Miller.** (2007) Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling. *Current opinion in cell biology* 19 (2): 117-23.
- Hubbard, Stevan R., et Jeffrey H. Till.** (2000) Protein Tyrosine Kinase Structure and Function. *Annual Review of Biochemistry* 69 (1): 373-98.
- Hume, David A, et Kelli P A MacDonald.** (2012) Therapeutic Applications of Macrophage Colony-Stimulating Factor-1 (CSF-1) and Antagonists of CSF-1 Receptor (CSF-1R) Signaling. *Blood* 119 (8): 1810-20.

- Huynh, Jennifer, Mei Qi Kwa, Andrew D. Cook, John A. Hamilton, et Glen M. Scholz.** (2012) CSF-1 Receptor Signalling from Endosomes Mediates the Sustained Activation of Erk1/2 and Akt in Macrophages. *Cellular Signalling* 24 (9): 1753-61.
- Hwang, Seung-Jun, Bongkun Choi, Soon-Suk Kang, Jae-Ho Chang, Yong-Gil Kim, Yeon-Ho Chung, Dong Hyun Sohn, et al.** (2012) Interleukin-34 Produced by Human Fibroblast-like Synovial Cells in Rheumatoid Arthritis Supports Osteoclastogenesis. *Arthritis Research & Therapy* 14 (1): R14.
- ImClone LLC.** (2011) Study of IMC-CS4 in subjects with advanced solid tumors. <http://clinicaltrials.gov/show/NCT01346358>.
- Ingnot, A. D.** (1997) Classification of Cytokines according to the Receptor Code. *Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis* 45 (5-6): 353-57.
- Izzo, Renato V., et Ralph D. Sanderson.** (2011) Proteoglycans in Cancer Biology, Tumour Microenvironment and Angiogenesis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 15 (5): 1013-31.
- Irusta, P. M., et D. DiMaio.** (1998) A Single Amino Acid Substitution in a WW-like Domain of Diverse Members of the PDGF Receptor Subfamily of Tyrosine Kinases Causes Constitutive Receptor Activation. *The EMBO Journal* 17 (23): 6912-23.
- Jacquel, Arnaud, Naïma Benikhlef, Jérôme Paggetti, Najoua Lalaoui, Leslie Guery, Erick K Dufour, Marion Ciudad, et al.** (2009) Colony-stimulating factor-1-induced oscillations in phosphatidylinositol-3 kinase/AKT are required for caspase activation in monocytes undergoing differentiation into macrophages. *Blood* 114 (17): 3633-41.
- Jadus, Martin R., Yijun Chen, Mehrdokht Tarbiyat Boldaji, Christina Delgado, Ramon Sanchez, Thomas Douglass, Usama Al-Atar, William Schulz, Cheri Lloyd, et H. Terry Wepsic.** (2003) Human U251MG Glioma Cells Expressing the Membrane Form of Macrophage Colony-Stimulating Factor (mM-CSF) Are Killed by Human Monocytes in Vitro and Are Rejected within Immunodeficient Mice via Paraptosis That Is Associated with Increased Expression of Three Different Heat Shock Proteins. *Cancer Gene Therapy* 10 (5): 411-20.
- Jeffrey, Kate L., Montserrat Camps, Christian Rommel, et Charles R. Mackay.** (2007) Targeting dual-specificity phosphatases: manipulating MAP kinase signalling and immune responses. *Nature Reviews Drug Discovery* 6 (5): 391-403.
- Jiang, G., J. den Hertog, et T. Hunter.** (2000) Receptor-like Protein Tyrosine Phosphatase Alpha Homodimerizes on the Cell Surface. *Molecular and Cellular Biology* 20 (16): 5917-29.
- Jiang, Xuejun, Fangtian Huang, Andriy Marusyk, et Alexander Sorkin.** (2003) Grb2 Regulates Internalization of EGF Receptors through Clathrin-Coated Pits. *Molecular Biology of the Cell* 14 (3): 858-70.
- Jodele, Sonata, Laurence Blavier, Janet M. Yoon, et Yves A. DeClerck.** (2006) Modifying the Soil to Affect the Seed: Role of Stromal-Derived Matrix Metalloproteinases in Cancer Progression. *Cancer Metastasis Reviews* 25 (1): 35-43.
- Johnson, Karl G., Alan P. Tenney, Aurnab Ghose, April M. Duckworth, Misao E. Higashi, Karen Parfitt, Oana Marcu, et al.** (2006) The HSPGs Syndecan and Dallylike Bind the Receptor Phosphatase LAR and Exert Distinct Effects on Synaptic Development ». *Neuron* 49 (4): 517-31.
- Jose, Matthew D., Yannick Le Meur, Robert C. Atkins, et Steven J. Chadban.** (2003) Blockade of Macrophage Colony-Stimulating Factor Reduces Macrophage Proliferation and Accumulation in Renal Allograft Rejection. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 3 (3): 294-300.
- Kainulainen, V., L. Nelimarkka, H. Järveläinen, M. Laato, M. Jalkanen, et K. Elenius.** (1996) Suppression of Syndecan-1 Expression in Endothelial Cells by Tumor Necrosis Factor-Alpha. *The Journal of Biological Chemistry* 271 (31): 18759-66.
- Kanagasundaram, V., A. Jaworowski, et J. A. Hamilton.** (1996) Association between Phosphatidylinositol-3 Kinase, Cbl and Other Tyrosine Phosphorylated Proteins in Colony-Stimulating Factor-1-Stimulated Macrophages. *The Biochemical Journal* 320 (Pt 1) : 69-77.
- Kirkbride, Kellye C., Bridgette N. Ray, et Gerard C. Blobe.** (2005) Cell-Surface Co-Receptors: Emerging Roles in Signaling and Human Disease. *Trends in Biochemical Sciences* 30 (11): 611-21.
- Kirma, Nameer, Luciano S. Hammes, Ya-Guang Liu, Hareesh B. Nair, Philip T. Valente, Shantha Kumar, Lisa C. Flowers, et Rajeshwar Rao Tekmal.** (2007) Elevated Expression of the Oncogene c-Fms and Its Ligand, the Macrophage Colony-Stimulating Factor-1, in Cervical Cancer and the Role of Transforming Growth Factor-beta1 in Inducing c-Fms Expression. *Cancer Research* 67 (5): 1918-26.

- Kirsch, Matthias, Gabriele Schackert, et Peter McL Black.** (2004) Metastasis and Angiogenesis. *Cancer Treatment and Research* 117: 285-304.
- Kluger, Harriet M., Marisa Dolled-Filhart, Sofya Rodov, Barry M. Kacinski, Robert L. Camp, et David L. Rimm.** (2004) Macrophage Colony-Stimulating Factor-1 Receptor Expression Is Associated with Poor Outcome in Breast Cancer by Large Cohort Tissue Microarray Analysis. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 10 (1 Pt 1): 173-77.
- Knowles, H. J., et N. A. Athanasou.** (2009) Canonical and Non-Canonical Pathways of Osteoclast Formation. *Histology and Histopathology* 24 (3): 337-46.
- Kogawa, Masakazu, Asiri R. Wijenayaka, Renee T. Ormsby, Gethin P. Thomas, Paul H. Anderson, Lynda F. Bonewald, David M. Findlay, et Gerald J. Atkins.** (2013) Sclerostin Regulates Release of Bone Mineral by Osteocytes by Induction of Carbonic Anhydrase 2». *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 28 (12): 2436-48.
- Kristjánsdóttir, K., et J. Rudolph.** (2004) Cdc25 Phosphatases and Cancer. *Chemistry & Biology* 11 (8): 1043-51.
- Krueger, N. X., et H. Saito.** (1992) A Human Transmembrane Protein-Tyrosine-Phosphatase, PTP Zeta, Is Expressed in Brain and Has an N-Terminal Receptor Domain Homologous to Carbonic Anhydrases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (16): 7417-21.
- Schofield, K, Gallagher, J, David, G.** (1999) Expression of Proteoglycan Core Proteins in Human Bone Marrow Stroma. <http://www.biochemj.org.gate2.inist.fr/bj/343/0663/bj3430663.htm>.
- Kubota, Yoshiaki, Keiyo Takubo, Takatsune Shimizu, Hiroaki Ohno, Kazuo Kishi, Masabumi Shibuya, Hideyuki Saya, et Toshio Suda.** (2009) M-CSF Inhibition Selectively Targets Pathological Angiogenesis and Lymphangiogenesis. *The Journal of Experimental Medicine* 206 (5): 1089-1102.
- Kwon, Mi-Jung, Bohee Jang, Jae Youn Yi, Inn-Oc Han, et Eok Soo Oh.** (2012) Syndecans Play Dual Roles as Cell Adhesion Receptors and Docking Receptors. *FEBS Letters* 586 (16): 2207-11.
- Lacour, Brigitte, Aurélie Guyot-Goubin, Sandra Guissou, Stéphanie Bellec, Emmanuel Désandes, et Jacqueline Clavel.** (2010) Incidence of Childhood Cancer in France: National Children Cancer Registries, 2000-2004. *European Journal of Cancer Prevention: The Official Journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)* 19 (3): 173-81.
- Laederich, Melanie B., et William A. Horton.** (2012) FGFR3 Targeting Strategies for Achondroplasia. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 14: e11.
- Lamagna, Chrystelle, Michel Aurrand-Lions, et Beat A. Imhof.** (2006) Dual Role of Macrophages in Tumor Growth and Angiogenesis. *Journal of Leukocyte Biology* 80 (4): 705-13.
- Lamoureux, François, Marc Baud'huin, Laurence Duplomb, Dominique Heymann, et Françoise Rédini.** (2007) Proteoglycans: Key Partners in Bone Cell Biology. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 29 (8): 758-71.
- Lamoureux, François, Marc Baud'huin, Lidia Rodriguez Calleja, Camille Jacques, Martine Berreur, Françoise Rédini, Fernando Lecanda, James E. Bradner, Dominique Heymann, et Benjamin Ory.** (2014) Selective Inhibition of BET Bromodomain Epigenetic Signalling Interferes with the Bone-Associated Tumour Vicious Cycle. *Nature Communications* 5: 3511.
- Langer, Jerome A., E. Cali Cutrone, et Sergei Kotenko.** (2004) The Class II Cytokine Receptor (CRF2) Family: Overview and Patterns of Receptor-ligand Interactions. *Cytokine and Growth Factor Reviews* 15 (1): 33-48.
- Lawicki, Sławomir, Małgorzata Czygier, Ewa Bedkowska, Marek Wojtukiewicz, et Maciej Szmilkowski.** (2008) Comparative Evaluation of Plasma Levels and Diagnostic Values of Macrophage-Colony Stimulating Factor in Patients with Breast Cancer and Benign Tumors. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej* 118 (9): 464-69.
- Lemmon, Mark A., et Joseph Schlessinger.** (2010) Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell* 141 (7): 1117-34.
- Levy, J. B., P. D. Canoll, O. Silvennoinen, G. Barnea, B. Morse, A. M. Honegger, J. T. Huang, L. A. Cannizzaro, S. H. Park, et T. Druck.** (1993) The Cloning of a Receptor-Type Protein Tyrosine Phosphatase Expressed in the Central Nervous System. *Journal of Biological Chemistry* 268 (14): 10573-81.
- Lewis, Claire E., et Jeffrey W. Pollard.** (2006) Distinct Role of Macrophages in Different Tumor Microenvironments. *Cancer Research* 66 (2): 605-12.

- Liang, Jing, Yan-Ling Wu, Bing-Jia Chen, Wen Zhang, Yoshimasa Tanaka, et Hiroshi Sugiyama.** (2013) The C-Kit Receptor-Mediated Signal Transduction and Tumor-Related Diseases. *International Journal of Biological Sciences* 9 (5): 435-43.
- Lim, A. K. H., F. Y. Ma, D. J. Nikolic-Paterson, M. C. Thomas, L. A. Hurst, et G. H. Tesch.** (2009) Antibody Blockade of c-Fms Suppresses the Progression of Inflammation and Injury in Early Diabetic Nephropathy in Obese Db/db Mice. *Diabetologia* 52 (8): 1669-79.
- Lindahl, U., et M. Höök.** (1978) Glycosaminoglycans and Their Binding to Biological Macromolecules. *Annual Review of Biochemistry* 47: 385-417.
- Lin, Elaine Y., et Jeffrey W. Pollard.** (2007) Tumor-Associated Macrophages Press the Angiogenic Switch in Breast Cancer. *Cancer Research* 67 (11): 5064-66.
- Lin, E. Y., A. V. Nguyen, R. G. Russell, et J. W. Pollard.** (2001) Colony-Stimulating Factor 1 Promotes Progression of Mammary Tumors to Malignancy. *The Journal of Experimental Medicine* 193 (6): 727-40.
- Ling, Ling, Sadasivam Murali, Christian Dombrowski, Larisa M. Haupt, Gary S. Stein, Andre J. van Wijnen, Victor Nurcombe, et Simon M. Cool.** (2006) Sulfated Glycosaminoglycans Mediate the Effects of FGF2 on the Osteogenic Potential of Rat Calvarial Osteoprogenitor Cells ». *Journal of Cellular Physiology* 209 (3): 811-25.
- Lin, Haishan, Ernestine Lee, Kevin Hestir, Cindy Leo, Minmei Huang, Elizabeth Bosch, Robert Halenbeck, et al.** (2008) Discovery of a Cytokine and Its Receptor by Functional Screening of the Extracellular Proteome. *Science* 320 (5877): 807-11.
- Liongue, Clifford, et Alister C. Ward.** (2007) Evolution of Class I Cytokine Receptors. *BMC Evolutionary Biology* 7 (1): 120.
- Li, Shupeng, Albert H. C. Wong, et Fang Liu.** (2014) Ligand-gated ion channel interacting proteins and their role in neuroprotection. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8: 125.
- Liu, Heli, Cindy Leo, Xiaoyan Chen, Brian R Wong, Lewis T Williams, Haishan Lin, et Xiaolin He.** (2012) The mechanism of shared but distinct CSF-1R signaling by the non-homologous cytokines IL-34 and CSF-1. *Biochimica et biophysica acta* 1824 (7): 938-45.
- Liu, Yan, et Larry R. Rohrschneider.** (2002) The Gift of Gab. *FEBS Letters* 515 (1-3): 1-7.
- Li, W., et E. R. Stanley.** (1991) Role of Dimerization and Modification of the CSF-1 Receptor in Its Activation and Internalization during the CSF-1 Response. *The EMBO Journal* 10 (2): 277-88.
- Li, Zhenglong, Daoqun Jin, Yongbo Wu, Kai Zhang, Peng Hu, Xuemin Cao, et Zhiqiang Chen.** (2012) Increased Serum Interleukin-34 in Patients with Coronary Artery Disease. *The Journal of International Medical Research* 40 (5): 1866-70.
- Lynch, Thomas J., Daphne W. Bell, Raffaella Sordella, Sarada Gurubhagavatula, Ross A. Okimoto, Brian W. Brannigan, Patricia L. Harris, et al.** (2004) Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non-Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib. *The New England Journal of Medicine* 350 (21): 2129-39.
- Ma, Di, Yukiko Doi, Shijie Jin, Endong Li, Yoshifumi Sonobe, Hideyuki Takeuchi, Tetsuya Mizuno, et Akio Suzumura.** (2012) TGF- β Induced by Interleukin-34-Stimulated Microglia Regulates Microglial Proliferation and Attenuates Oligomeric Amyloid β Neurotoxicity. *Neuroscience Letters* 529 (1): 86-91.
- Maeda, Nobuaki.** (2010) Structural Variation of Chondroitin Sulfate and Its Roles in the Central Nervous System. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry* 10 (1): 22-31.
- Malhotra, Deepali, Anne L. Fletcher, Jillian Astarita, Veronika Lukacs-Kornek, Prakriti Tayalia, Santiago F. Gonzalez, Kutlu G. Elpek, et al.** (2012) Transcriptional Profiling of Stroma from Inflamed and Resting Lymph Nodes Defines Immunological Hallmarks. *Nature Immunology* 13 (5): 499-510.
- Mancini, Annalisa, Alexandra Koch, Anthony D. Whetton, et Teruko Tamura.** (2004) The M-CSF Receptor Substrate and Interacting Protein FMIP Is Governed in Its Subcellular Localization by Protein Kinase C-Mediated Phosphorylation, and Thereby Potentiates M-CSF-Mediated Differentiation. *Oncogene* 23 (39): 6581-89.
- Manolagas, S. C.** (2000) Birth and Death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis. *Endocrine Reviews* 21 (2): 115-37.
- Manos, M. M.** (1988) Expression and Processing of a Recombinant Human Macrophage Colony-Stimulating Factor in Mouse Cells. *Molecular and Cellular Biology* 8 (11): 5035-39.

- Manthey, Carl L., Dana L. Johnson, Carl R. Illig, Robert W. Tuman, Zhao Zhou, Judith F. Baker, Margery A. Chaikin, et al.** (2009) JNJ-28312141, a Novel Orally Active Colony-Stimulating Factor-1 receptor/FMS-Related Receptor Tyrosine Kinase-3 Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor with Potential Utility in Solid Tumors, Bone Metastases, and Acute Myeloid Leukemia. *Molecular Cancer Therapeutics* 8 (11): 3151-61.
- Mantovani, Alberto, Silvano Sozzani, Massimo Locati, Paola Allavena, et Antonio Sica.** (2002) Macrophage Polarization: Tumor-Associated Macrophages as a Paradigm for Polarized M2 Mononuclear Phagocytes. *Trends in Immunology* 23 (11): 549-55.
- Marie, Pierre J.** (2008) Transcription Factors Controlling Osteoblastogenesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 473 (2): 98-105.
- Marini, Joan C., et Angela R. Blissett.** (2013) New Genes in Bone Development: What's New in Osteogenesis Imperfecta. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 98 (8): 3095-3103.
- Marmor, Mina D., et Yosef Yarden.** (2004) Role of Protein Ubiquitylation in Regulating Endocytosis of Receptor Tyrosine Kinases. *Oncogene* 23 (11): 2057-70.
- Mashkani, Baratali, Renate Griffith, et Leonie K. Ashman.** (2010) Colony Stimulating Factor-1 Receptor as a Target for Small Molecule Inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 18 (5): 1789-97.
- Massena, Sara, Gustaf Christoffersson, Elina Hjertstrom, Eyal Zcharia, Israel Vlodavsky, Nora Ausmees, Charlotte Rolny, Jin-Ping Li, et Mia Phillipson.** (2010) A chemotactic gradient sequestered on endothelial heparan sulfate induces directional intraluminal crawling of neutrophils. *Blood* 116 (11): 1924-31.
- Masson, Kristina, et Lars Rönnstrand.** (2009) Oncogenic Signaling from the Hematopoietic Growth Factor Receptors c-Kit and Flt3. *Cellular Signalling* 21 (12): 1717-26.
- Masteller, Emma L, et Brian R Wong.** (2014) Targeting IL-34 in Chronic Inflammation. *Drug Discovery Today*. [Epub ahead of print]
- Matozaki, Takashi, Yoji Murata, Munemasa Mori, Takenori Kotani, Hideki Okazawa, et Hiroshi Ohnishi.** (2010) Expression, localization, and biological function of the R3 subtype of receptor-type protein tyrosine phosphatases in mammals. *Cellular Signalling* 22 (12): 1811-17.
- Ma, Xiaolei, Wei Yu Lin, Yongmei Chen, Scott Stawicki, Kiran Mukhyala, Yan Wu, Flavius Martin, J. Fernando Bazan, et Melissa A. Starovasnik.** (2012) Structural Basis for the Dual Recognition of Helical Cytokines IL-34 and CSF-1 by CSF-1R. *Structure* 20 (4): 676-87.
- Mbeunkui, Flaubert, et Donald J. Johann.** (2009) Cancer and the Tumor Microenvironment: A Review of an Essential Relationship. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 63 (4): 571-82.
- McDermott, Raymond S., Laurent Deneux, Véronique Mosseri, Jacques Védrenne, Krishna Clough, Alain Fourquet, José Rodriguez, et al.** (2002) Circulating Macrophage Colony Stimulating Factor as a Marker of Tumour Progression. *European Cytokine Network* 13 (1): 121-27.
- Meng, K, A Rodriguez-Peña, T Dimitrov, W Chen, M Yamin, M Noda, et T F Deuel.** (2000) Pleiotrophin Signals Increased Tyrosine Phosphorylation of Beta Beta-Catenin through Inactivation of the Intrinsic Catalytic Activity of the Receptor-Type Protein Tyrosine Phosphatase Beta/zeta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (6): 2603-8.
- Menke, Julia, Jörg Kriegsmann, Carl Christoph Schimanski, Melvin M. Schwartz, Andreas Schwarting, et Vicki R. Kelley.** (2012) Autocrine CSF-1 and CSF-1 Receptor Coexpression Promotes Renal Cell Carcinoma Growth. *Cancer Research* 72 (1): 187-200.
- Meshinchi, Soheil, et Frederick R. Appelbaum.** (2009) Structural and Functional Alterations of FLT3 in Acute Myeloid Leukemia. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 15 (13): 4263-69.
- Mettler, Liselotte, Andreas G Schmutzler, Kerstin Koch, Thoralf Schollmeyer, et Ali Salmassi.** (2004) Identification of the M-CSF Receptor in Endometriosis by Immunohistochemistry and RT-PCR. *American Journal of Reproductive Immunology* 52 (5): 298-305.
- Mikelis, Constantinos, Evanthia Sfaelou, Marina Koutsoumpa, Nelly Kieffer, et Evangelia Papadimitriou.** (2009) Integrin alpha(v)beta(3) Is a Pleiotrophin Receptor Required for Pleiotrophin-Induced Endothelial Cell Migration through Receptor Protein Tyrosine Phosphatase Beta/zeta. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23 (5): 1459-69.
- Mizuno, Tetsuya, Yukiko Doi, Hiroyuki Mizoguchi, Shijie Jin, Mariko Noda, Yoshifumi Sonobe, Hideyuki Takeuchi, et Akio Suzumura.** (2011) Interleukin-34 Selectively Enhances the Neuroprotective Effects of

Microglia to Attenuate Oligomeric Amyloid- β Neurotoxicity. *The American Journal of Pathology* 179 (4): 2016-27.

Modrowski, D., M. Baslé, A. Lomri, et P. J. Marie. (2000) Syndecan-2 Is Involved in the Mitogenic Activity and Signaling of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor in Osteoblasts. *The Journal of Biological Chemistry* 275 (13): 9178-85.

Moon, Su-Jin, Yeon-Sik Hong, Ji Hyeon Ju, Seung-Ki Kwok, Sung-Hwan Park, et Jun-Ki Min. (2013) Increased Levels of Interleukin 34 in Serum and Synovial Fluid Are Associated with Rheumatoid Factor and Anticyclic Citrullinated Peptide Antibody Titers in Patients with Rheumatoid Arthritis. *The Journal of Rheumatology* 40 (11): 1842-49.

Moriki, T., H. Maruyama, et I. N. Maruyama. (2001) Activation of Preformed EGF Receptor Dimers by Ligand-Induced Rotation of the Transmembrane Domain. *Journal of Molecular Biology* 311 (5): 1011-26.

Moro, Laura, Laura Dolce, Sara Cabodi, Elena Bergatto, Elisabetta Boeri Erba, Monica Smeriglio, Emilia Turco, et al. (2002) Integrin-Induced Epidermal Growth Factor (EGF) Receptor Activation Requires c-Src and p130Cas and Leads to Phosphorylation of Specific EGF Receptor Tyrosines. *The Journal of Biological Chemistry* 277 (11): 9405-14.

Mosheimer, Birgit A., Nicole C. Kaneider, Clemens Feistritzer, Angela M. Djanani, Daniel H. Sturn, Josef R. Patsch, et Christian J. Wiedermann. (2005) Syndecan-1 Is Involved in Osteoprotegerin-Induced Chemotaxis in Human Peripheral Blood Monocytes. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 90 (5): 2964-71.

Mouchemore, Kellie A., et Fiona J. Pixley. (2012) CSF-1 signaling in macrophages: pleiotrophy through phosphotyrosine-based signaling pathways. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 49 (2): 49-61.

Murdoch, Craig, Athina Giannoudis, et Claire E. Lewis. (2004) Mechanisms Regulating the Recruitment of Macrophages into Hypoxic Areas of Tumors and Other Ischemic Tissues. *Blood* 104 (8): 2224-34.

Murray, Lesley J., Tinya J. Abrams, Kelly R. Long, Theresa J. Ngai, Lisa M. Olson, Weiru Hong, Paul K. Keast, et al. (2003) SU11248 Inhibits Tumor Growth and CSF-1R-Dependent Osteolysis in an Experimental Breast Cancer Bone Metastasis Model. *Clinical & Experimental Metastasis* 20 (8): 757-66.

Murray, Peter J., et Thomas A. Wynn. (2011) Obstacles and Opportunities for Understanding Macrophage Polarization. *Journal of Leukocyte Biology* 89 (4): 557-63.

Mythreya, Karthikeyan, et Gerard C. Blobe. (2009) Proteoglycan Signaling Co-Receptors: Roles in Cell Adhesion, Migration and Invasion. *Cellular Signalling* 21 (11): 1548-58.

Nakamichi, Yuko, Toshihide Mizoguchi, Atsushi Arai, Yasuhiro Kobayashi, Masahiro Sato, Josef M Penninger, Hisataka Yasuda, et al. (2012) Spleen serves as a reservoir of osteoclast precursors through vitamin D-induced IL-34 expression in osteopetrotic op/op mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (25): 10006-11.

Nakamichi, Yuko, Nobuyuki Udagawa, et Naoyuki Takahashi. (2013) IL-34 and CSF-1: Similarities and Differences. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 1-10.

Nandi, Sayan, Mohammed P. Akhter, Mark F. Seifert, Xu-Ming Dai, et E. Richard Stanley. (2006) Developmental and Functional Significance of the CSF-1 Proteoglycan Chondroitin Sulfate Chain. *Blood* 107 (2): 786-95.

Nandi, Sayan, Mario Cioce, Yee-Guide Yeung, Edward Nieves, Lydia Tesfa, Haishan Lin, Amy W. Hsu, et al. (2013) Receptor-Type Protein Tyrosine Phosphatase Zeta Is a Functional Receptor for Interleukin-34. *Journal of Biological Chemistry* 288(30):21972-86.

Nandi, Sayan, Solen Gokhan, Xu-Ming Dai, Suwen Wei, Grigori Enikolopov, Haishan Lin, Mark F Mehler, et E Richard Stanley. (2012) The CSF-1 receptor ligands IL-34 and CSF-1 exhibit distinct developmental brain expression patterns and regulate neural progenitor cell maintenance and maturation. *Developmental biology* 367 (2): 100-113.

Neve, Anna, Addolorata Corrado, et Francesco Paolo Cantatore. (2013) Osteocalcin: Skeletal and Extra-Skeletal Effects. *Journal of Cellular Physiology* 228 (6): 1149-53.

Nicholson, Alexandra M., Matt C. Baker, Nicole A. Finch, Nicola J. Rutherford, Christian Wider, Neill R. Graff-Radford, Peter T. Nelson, et al. (2013) CSF1R Mutations Link POLD and HDLS as a Single Disease Entity. *Neurology* 80 (11): 1033-40.

- Nikolova, Viktoriya, Chuay-Yeng Koo, Sherif Abdelaziz Ibrahim, Zihua Wang, Dorothe Spillmann, Rita Dreier, Reinhard Kelsch, et al.** (2009) Differential Roles for Membrane-Bound and Soluble Syndecan-1 (CD138) in Breast Cancer Progression. *Carcinogenesis* 30 (3): 397-407.
- Nishina, Takuya, Yoshio Naomoto, Akira Gouchi, Mehmet Gunduz, Yasuhiro Shirakawa, Tetsuji Nobuhisa, Takayuki Motoki, et al.** (2004) Macrophage Colony-Stimulating Factor Inhibits Tumor Necrosis Factor Production and Prolongs Skin Graft Survival. *Transplantation* 77 (3): 456-59.
- Nishiwaki, T., N. Maeda, et M. Noda.** (1998) Characterization and Developmental Regulation of Proteoglycan-Type Protein Tyrosine Phosphatase zeta/RPTPbeta Isoforms. *Journal of Biochemistry* 123 (3): 458-67.
- Noble, Brendon S.** (2008) The Osteocyte Lineage. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 473 (2): 106-11.
- Obeid, Elias, Rita Nanda, Yang-Xin Fu, et Olufunmilayo I. Olopade.** (2013) The Role of Tumor-Associated Macrophages in Breast Cancer Progression (review). *International Journal of Oncology* 43 (1): 5-12.
- Ogiso, Hideo, Ryuichiro Ishitani, Osamu Nureki, Shuya Fukai, Mari Yamanaka, Jae-Hoon Kim, Kazuki Saito, et al.** (2002) Crystal Structure of the Complex of Human Epidermal Growth Factor and Receptor Extracellular Domains. *Cell* 110 (6): 775-87.
- Ohno, Hiroaki, Kazuo Kubo, Hideko Murooka, Yoshiko Kobayashi, Tsuyoshi Nishitoba, Masabumi Shibuya, Toshiyuki Yoneda, et Toshiyuki Isoe.** (2006) A c-Fms Tyrosine Kinase Inhibitor, Ki20227, Suppresses Osteoclast Differentiation and Osteolytic Bone Destruction in a Bone Metastasis Model. *Molecular Cancer Therapeutics* 5 (11): 2634-43.
- Okina, E., T. Manon-Jensen, J. R. Whiteford, et J. R. Couchman.** (2009) Syndecan Proteoglycan Contributions to Cytoskeletal Organization and Contractility. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports* 19 (4): 479-89.
- Okolicsanyi, Rachel K., Lyn R. Griffiths, et Larisa M. Haupt.** (2014) Mesenchymal stem cells, neural lineage potential, heparan sulfate proteoglycans and the matrix . *Developmental Biology* 388 (1): 1-10.
- Olszta, Matthew J., Xingguo Cheng, Sang Soo Jee, Rajendra Kumar, Yi-Yeoun Kim, Michael J. Kaufman, Elliot P. Douglas, et Laurie B. Gower.** (2007) Bone structure and formation: A new perspective. *Materials Science and Engineering: R: Reports* 58 (3-5): 77-116.
- Otero, Karel, Isaiah R. Turnbull, Pietro Luigi Poliani, William Vermi, Elisa Cerutti, Taiki Aoshi, Ilaria Tassi, et al.** (2009) Macrophage Colony-Stimulating Factor Induces the Proliferation and Survival of Macrophages via a Pathway Involving DAP12 and Beta-Catenin. *Nature Immunology* 10 (7): 734-43.
- Ottaviani, Giulia, et Norman Jaffe.** (2009) The Epidemiology of Osteosarcoma. *Cancer Treatment and Research* 152: 3-13.
- Ozaki, Katsutoshi, et Warren J. Leonard.** (2002) Cytokine and Cytokine Receptor Pleiotropy and Redundancy. *The Journal of Biological Chemistry* 277 (33): 29355-58.
- Paget, S.** (1989) The Distribution of Secondary Growths in Cancer of the Breast. 1889. *Cancer Metastasis Reviews* 8 (2): 98-101.
- Pandit, J, A Bohm, J Jancarik, R Halenbeck, K Koths, et S H Kim.** (1992) Three-Dimensional Structure of Dimeric Human Recombinant Macrophage Colony-Stimulating Factor. *Science* 258 (5086): 1358-62.
- Panni, Roheena Z., David C. Linehan, et David G. DeNardo.** (2013) Targeting Tumor-Infiltrating Macrophages to Combat Cancer. *Immunotherapy* 5 (10): 1075-87.
- Pap, Thomas, et Jessica Bertrand.** (2013) Syndecans in Cartilage Breakdown and Synovial Inflammation. *Nature Reviews Rheumatology* 9 (1): 43-55.
- Patterson, Randen L., Damian B. van Rossum, Nikolas Nikolaidis, Donald L. Gill, et Solomon H. Snyder.** (2005) Phospholipase C-Gamma: Diverse Roles in Receptor-Mediated Calcium Signaling. *Trends in Biochemical Sciences* 30 (12): 688-97.
- Paulus, Patrick, E. Richard Stanley, Romana Schäfer, Dietmar Abraham, et Seyedhossein Aharinejad.** (2006) Colony-Stimulating Factor-1 Antibody Reverses Chemoresistance in Human MCF-7 Breast Cancer Xenografts. *Cancer Research* 66 (8): 4349-56.
- Pawson, Tony.** (2002) Regulation and Targets of Receptor Tyrosine Kinases. *European Journal of Cancer* 38 Suppl 5 (septembre): S3-10.
- Perrimon, N., et M. Bernfield.** (2000) Specificities of Heparan Sulphate Proteoglycans in Developmental Processes. *Nature* 404 (6779): 725-28.
- Picci, Piero.** (2007) Osteosarcoma (osteogenic Sarcoma). *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2: 6.

- Pixley, Fiona J.** (2012) Macrophage Migration and Its Regulation by CSF-1. *International Journal of Cell Biology* 2012: 501962.
- Pixley, Fiona J., et E. Richard Stanley.** (2004) CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action. *Trends in Cell Biology* 14 (11): 628-38.
- Plexikon.** (2009) Safety study of PLX108-01 in patients with solid tumors. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01004861?term=PLX3397+and+cancer&rank=4>.
- Plexikon, Eisai Inc., et Vrgo H Komen.** (2012) Phase Ib/II study of PLX 3397 and eribulin in patients with metastatic breast cancer. » <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01596751?term=PLX3397+and+cancer&rank=1>.
- Pollard, Jeffrey W.** (2009) Trophic Macrophages in Development and Disease. *Nature Reviews. Immunology* 9 (4): 259-70.
- Pollard, J. W., A. Bartocci, R. Arceci, A. Orlofsky, M. B. Ladner, et E. R. Stanley.** (1987) Apparent Role of the Macrophage Growth Factor, CSF-1, in Placental Development. *Nature* 330 (6147): 484-86.
- Polykratis, Apostolos, Panagiotis Katsoris, José Courty, et Evangelia Papadimitriou.** (2005) Characterization of Heparin Affin Regulatory Peptide Signaling in Human Endothelial Cells. *Journal of Biological Chemistry* 280 (23): 22454-61.
- Pomin, Vitor H.** (2014) Biological Findings from the Recent NMR-Based Studies of Glycosaminoglycan-Protein Interactions. *Glycobiology*. [Epub ahead of print]
- Praloran, P. Fixe and V.** (1997) Macrophage colony-stimulating-factor (M-CSF or CSF-1) and its receptor: structure-function relationships. *European Cytokine Network* 8 (2): 125-36.
- Preisser, Laurence, Charline Miot, Hélène Le Guillou-Guillemette, Elodie Beaumont, Etienne D. Foucher, Erwan Garo, Simon Blanchard, et al.** (2014) IL-34 and M-CSF Are Overexpressed in HCV Fibrosis and Induce pro-Fibrotic Macrophages Which Promote Collagen Synthesis by Hepatic Stellate Cells. *Hepatology*. [Epub ahead of print]
- Price, L. K., H. U. Choi, L. Rosenberg, et E. R. Stanley.** (1992) The Predominant Form of Secreted Colony Stimulating Factor-1 Is a Proteoglycan. *The Journal of Biological Chemistry* 267 (4): 2190-99.
- Purushothaman, Anurag, Douglas R. Hurst, Claudio Pisano, Shuji Mizumoto, Kazuyuki Sugahara, et Ralph D. Sanderson.** (2011) Heparanase-Mediated Loss of Nuclear Syndecan-1 Enhances Histone Acetyltransferase (HAT) Activity to Promote Expression of Genes That Drive an Aggressive Tumor Phenotype. *The Journal of Biological Chemistry* 286 (35): 30377-83.
- Purushothaman, Anurag, Toru Uyama, Fumi Kobayashi, Shuhei Yamada, Kazuyuki Sugahara, Alan C. Rapraeger, et Ralph D. Sanderson.** (2010) Heparanase-Enhanced Shedding of Syndecan-1 by Myeloma Cells Promotes Endothelial Invasion and Angiogenesis. *Blood* 115 (12): 2449-57.
- Pyonteck, Stephanie M., Leila Akkari, Alberto J. Schuhmacher, Robert L. Bowman, Lisa Sevenich, Daniela F. Quail, Oakley C. Olson, et al.** (2013) CSF-1R Inhibition Alters Macrophage Polarization and Blocks Glioma Progression. *Nature Medicine* 19 (10): 1264-72.
- Ralston, R., et J. M. Bishop.** (1985) The Product of the Protooncogene c-Src Is Modified during the Cellular Response to Platelet-Derived Growth Factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82 (23): 7845-49.
- Ramani, Vishnu C, Anurag Purushothaman, Mark D Stewart, Camilla A Thompson, Israel Vlodaysky, Jessie L-S Au, et Ralph D Sanderson.** (2013) The Heparanase/syndecan-1 Axis in Cancer: Mechanisms and Therapies. *The FEBS Journal* 280 (10): 2294-2306.
- Raman, M., W. Chen, et M. H. Cobb.** (2007) Differential Regulation and Properties of MAPKs. *Oncogene* 26 (22): 3100-3112.
- Rao, Q., J. S. Han, Y. Q. Geng, G. G. Zheng, L. S. Qian, et K. F. Wu.** (2001) Decreased Serum Soluble Macrophage Colony Stimulating Factor Receptor Level in Leukemia Patients. *Haematologica* 86 (9): 989-90.
- Richardsen, Elin, Sveinung Wergeland Sørbye, John Phil Crowe, Jia-Lin Yang, et Lill-Tove Busund.** (2009) Expression of M-CSF and CSF-1R Is Correlated with Histological Grade in Soft Tissue Tumors ». *Anticancer Research* 29 (10): 3861-66.
- Robinson, D. R., Y. M. Wu, et S. F. Lin.** (2000) The Protein Tyrosine Kinase Family of the Human Genome. *Oncogene* 19 (49): 5548-57.
- Robling, Alexander G., Alesha B. Castillo, et Charles H. Turner.** (2006) Biomechanical and Molecular Regulation of Bone Remodeling. *Annual Review of Biomedical Engineering* 8: 455-98.

- Rochefort, G. Y., S. Pallu, et C. L. Benhamou.** (2010) Osteocyte: The Unrecognized Side of Bone Tissue. *Osteoporosis International: A Journal Established as Result of Cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 21 (9): 1457-69.
- Roskoski Jr., Robert.** (2012) ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation. *Pharmacological Research* 66 (2): 105-43.
- Rothschild, Bruce M, Brian J Witzke, et Israel Hershkovitz.** (1999) Metastatic cancer in the Jurassic. *The Lancet* 354 (9176): 398.
- Rousselle, A.-V., et D. Heymann.** (2002) Osteoclastic Acidification Pathways during Bone Resorption. *Bone* 30 (4): 533-40.
- Roussel, M. F.** (1994) Signal Transduction by the Macrophage-Colony-Stimulating Factor Receptor (CSF-1R). *Journal of Cell Science. Supplement* 18: 105-8.
- Roussel, M. F., J. R. Downing, C. W. Reffemier, et C. J. Sherr.** (1988) A Point Mutation in the Extracellular Domain of the Human CSF-1 Receptor (c-Fms Proto-Oncogene Product) Activates Its Transforming Potential. *Cell* 55 (6): 979-88.
- Rovida, Elisabetta, Alessandro Paccagnini, Mario Del Rosso, Jacques Peschon, et Persio Dello Sbarba.** (2001) TNF- α -Converting Enzyme Cleaves the Macrophage Colony-Stimulating Factor Receptor in Macrophages Undergoing Activation. *The Journal of Immunology* 166 (3): 1583-89.
- Rovida, Elisabetta, Elena Spinelli, Sara Sdelci, Valentina Barbetti, Andrea Morandi, Serena Giuntoli, et Persio Dello Sbarba.** (2008) ERK5/BMK1 Is Indispensable for Optimal Colony-Stimulating Factor 1 (CSF-1)-Induced Proliferation in Macrophages in a Src-Dependent Fashion. *Journal of Immunology* 180 (6): 4166-72.
- Rovira-Clavé, Xavier, Maria Angulo-Ibáñez, Manuel Reina, et Enric Espel.** (2014) The PDZ-Binding Domain of Syndecan-2 Inhibits LFA-1 High-Affinity Conformation. *Cellular Signalling*. [Epub ahead of print]
- Ruiz, Ximena D., Logan R. Mlakar, Yukie Yamaguchi, Yunyun Su, Adriana T. Larregina, Joseph M. Pilewski, et Carol A. Feghali-Bostwick.** (2012) Syndecan-2 Is a Novel Target of Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-3 and Is Over-Expressed in Fibrosis. *PLoS ONE* 7 (8): e43049.
- Ryan, G. R., X. M. Dai, M. G. Dominguez, W. Tong, F. Chuan, O. Chisholm, R. G. Russell, J. W. Pollard, et E. R. Stanley.** (2001) Rescue of the Colony-Stimulating Factor 1 (CSF-1)-Nullizygous Mouse (Csf1^{op})/Csf1^{op}) Phenotype with a CSF-1 Transgene and Identification of Sites of Local CSF-1 Synthesis. *Blood* 98 (1): 74-84.
- Saltel, Frédéric, Anne Chabadel, Edith Bonnelye, et Pierre Jurdic.** (2008) Actin Cytoskeletal Organisation in Osteoclasts: A Model to Decipher Transmigration and Matrix Degradation. *European Journal of Cell Biology* 87 (8-9): 459-68.
- Sampaio, Natalia G., Wenfeng Yu, Dianne Cox, Jeffrey Wyckoff, John Condeelis, E. Richard Stanley, et Fiona J. Pixley.** (2011) Phosphorylation of CSF-1R Y721 Mediates Its Association with PI3K to Regulate Macrophage Motility and Enhancement of Tumor Cell Invasion. *Journal of Cell Science* 124 (Pt 12): 2021-31.
- Sandberg, Avery A., et Julia A. Bridge.** (2003) Updates on the Cytogenetics and Molecular Genetics of Bone and Soft Tissue Tumors: Osteosarcoma and Related Tumors. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 145 (1): 1-30.
- Santoro, M., F. Carlomagno, A. Romano, D. P. Bottaro, N. A. Dathan, M. Grieco, A. Fusco, G. Vecchio, B. Matoskova, et M. H. Kraus.** (1995) Activation of RET as a Dominant Transforming Gene by Germline Mutations of MEN2A and MEN2B. *Science* 267 (5196): 381-83.
- Santos, Silvia D. M., Peter J. Verveer, et Philippe I. H. Bastiaens.** (2007) Growth Factor-Induced MAPK Network Topology Shapes Erk Response Determining PC-12 Cell Fate. *Nature Cell Biology* 9 (3): 324-30.
- Sapi, Eva.** (2004) The Role of CSF-1 in Normal Physiology of Mammary Gland and Breast Cancer: An Update. *Experimental Biology and Medicine* 229 (1): 1-11.
- Sasaki, Atsushi, Yukio Iwashita, Kohei Shibata, Toshifumi Matsumoto, Masayuki Ohta, et Seigo Kitano.** (2006) Prognostic Value of Preoperative Peripheral Blood Monocyte Count in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Surgery* 139 (6): 755-64.
- Scheft, Georg, et Ellen Gravallese.** (2012) Bone Erosion in Rheumatoid Arthritis: Mechanisms, Diagnosis and Treatment. *Nature Reviews Rheumatology* 8 (11): 656-64.
- Seidel, C., M. Børset, O. Hjertner, D. Cao, N. Abildgaard, H. Hjorth-Hansen, R. D. Sanderson, A. Waage, et A. Sundan.** (2000) High Levels of Soluble Syndecan-1 in Myeloma-Derived Bone Marrow: Modulation of Hepatocyte Growth Factor Activity. *Blood* 96 (9): 3139-46.

- Sherr, C. J., C. W. Reffenmier, R. Sacca, M. F. Roussel, A. T. Look, et E. R. Stanley.** (1985) The c-Fms Proto-Oncogene Product Is Related to the Receptor for the Mononuclear Phagocyte Growth Factor, CSF-1. *Cell* 41 (3): 665-76.
- Shim, Ann Hye-Ryong, Rhoda Ahn Chang, Xiaoyan Chen, Richard Longnecker, et Xiaolin He.** (2012) Multipronged Attenuation of Macrophage-Colony Stimulating Factor Signaling by Epstein-Barr Virus BARP1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (32): 12962-67.
- Shimose, Shoji, Tadahiko Kubo, Jun Fujimori, Taisuke Furuta, et Mitsuo Ochi.** (2014) A Novel Assessment Method of Serum Alkaline Phosphatase for the Diagnosis of Osteosarcoma in Children and Adolescents. *Journal of Orthopaedic Science: Official Journal of the Japanese Orthopaedic Association*. [Epub ahead of print]
- Silva, I., et Jaime C. Branco.** (2011) Rank/Rankl/opg: Literature Review. *Acta Reumatológica Portuguesa* 36 (3): 209-18.
- Sims, Natalie A., et Jonathan H. Gooi.** (2008) Bone Remodeling: Multiple Cellular Interactions Required for Coupling of Bone Formation and Resorption. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 19 (5): 444-51.
- Sims, Natalie A., et Christina Vrahnas.** (2014) Regulation of Cortical and Trabecular Bone Mass by Communication between Osteoblasts, Osteocytes and Osteoclasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. [Epub ahead of print]
- Soares, Maria J., Mafalda Pinto, Rui Henrique, Joana Vieira, Nuno Cerveira, Ana Peixoto, Ana T. Martins, Jorge Oliveira, Carmen Jerónimo, et Manuel R. Teixeira.** (2009) CSF1R Copy Number Changes, Point Mutations, and RNA and Protein Overexpression in Renal Cell Carcinomas. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 22 (6): 744-52.
- Sobacchi, Cristina, Ansgar Schulz, Fraser P. Coxon, Anna Villa, et Miep H. Helfrich.** (2013) Osteopetrosis: Genetics, Treatment and New Insights into Osteoclast Function. *Nature Reviews. Endocrinology* 9 (9): 522-36.
- Song, Gang, Gaoliang Ouyang, et Shideng Bao.** (2005) The Activation of Akt/PKB Signaling Pathway and Cell Survival. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 9 (1): 59-71.
- Souza, Pedro P. C., et Ulf H. Lerner.** (2013) The role of cytokines in inflammatory bone loss. *Immunological Investigations* 42 (7): 555-622.
- Standal, Therese, Carina Seidel, Øyvind Hjertner, Torben Plesner, Ralph D. Sanderson, Anders Waage, Magne Borset, et Anders Sundan.** (2002) Osteoprotegerin Is Bound, Internalized, and Degraded by Multiple Myeloma Cells. *Blood* 100 (8): 3002-7.
- Stanley, E. R., D. M. Chen, et H. S. Lin.** (1978) Induction of Macrophage Production and Proliferation by a Purified Colony Stimulating Factor. *Nature* 274 (5667): 168-70.
- Stanley, E. R., M. Cifone, P. M. Heard, et V. Defendi.** (1976) Factors Regulating Macrophage Production and Growth: Identity of Colony-Stimulating Factor and Macrophage Growth Factor. *The Journal of Experimental Medicine* 143 (3): 631-47.
- Stanley, E. R., et P. M. Heard.** (1977) Factors Regulating Macrophage Production and Growth. Purification and Some Properties of the Colony Stimulating Factor from Medium Conditioned by Mouse L Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 252 (12): 4305-12.
- Stanley, E Richard, et Violeta Chitu.** (2014) CSF-1 Receptor Signaling in Myeloid Cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6 (6).
- Stout, Robert D., Chuancang Jiang, Bharati Matta, Illya Tietzel, Stephanie K. Watkins, et Jill Suttles.** (2005) Macrophages Sequentially Change Their Functional Phenotype in Response to Changes in Microenvironmental Influences. *Journal of Immunology* 175 (1): 342-49.
- Stupack, D. G., X. S. Puente, S. Boutsabouloy, C. M. Storgard, et D. A. Cheresh.** (2001) Apoptosis of Adherent Cells by Recruitment of Caspase-8 to Unligated Integrins. *The Journal of Cell Biology* 155 (3): 459-70.
- Suzu, S, T Inaba, N Yanai, T Kawashima, N Yamada, T Oka, R Machinami, T Ohtsuki, F Kimura, et S Kondo.** (1994) Proteoglycan Form of Macrophage Colony-Stimulating Factor Binds Low Density Lipoprotein. *Journal of Clinical Investigation* 94 (4): 1637-41.
- Suzu, S., F. Kimura, M. Yamada, N. Yanai, T. Kawashima, N. Nagata, et K. Motoyoshi.** (1994) Direct Interaction of Proteoglycan Macrophage Colony-Stimulating Factor and Basic Fibroblast Growth Factor. *Blood* 83 (11): 3113-19.

- Swierczak, Agnieszka, Andrew D. Cook, Jason C. Lenzo, Christina M. Restall, Judy P. Doherty, Robin L. Anderson, et John A. Hamilton.** (2014) The Promotion of Breast Cancer Metastasis Caused by Inhibition of CSF-1R/CSF-1 Signaling Is Blocked by Targeting the G-CSF Receptor. *Cancer Immunology Research* 2 (8): 765-76.
- Swords, R., C. Freeman, et F. Giles.** (2012) Targeting the FMS-like Tyrosine Kinase 3 in Acute Myeloid Leukemia. *Leukemia* 26 (10): 2176-85.
- Szatmári, Tünde, et Katalin Dobra.** (2013) The role of syndecan-1 in cellular signaling and its effects on heparan sulfate biosynthesis in mesenchymal tumors. *Frontiers in Molecular and Cellular Oncology* 3: 310.
- Tanaka-Kamioka, K., H. Kamioka, H. Ris, et S. S. Lim.** (1998) Osteocyte Shape Is Dependent on Actin Filaments and Osteocyte Processes Are Unique Actin-Rich Projections. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 13 (10): 1555-68.
- Tang, Xiaoqiang.** (2013) Tumor-Associated Macrophages as Potential Diagnostic and Prognostic Biomarkers in Breast Cancer. *Cancer Letters* 332 (1): 3-10.
- Tarbouriech, Nicolas, Florence Ruggiero, Mireille de Turenne-Tessier, Tadamasu Ooka, et Wim P. Burmeister.** (2006) Structure of the Epstein-Barr Virus Oncogene BARF1. *Journal of Molecular Biology* 359 (3): 667-78.
- Teitelbaum, Steven L.** (2011) The Osteoclast and Its Unique Cytoskeleton. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1240 : 14-17.
- Teitelbaum, Steven L., et F. Patrick Ross.** (2003) Genetic Regulation of Osteoclast Development and Function. *Nature Reviews. Genetics* 4 (8): 638-49.
- Theoleyre, Sandrine, Yohann Wiffrant, Steeve Kwan Tat, Yannick Fortun, Françoise Redini, et Dominique Heymann.** (2004) The Molecular Triad OPG/RANK/RANKL: Involvement in the Orchestration of Pathophysiological Bone Remodeling. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 15 (6): 457-75.
- Thien, C. B., et W. Y. Langdon.** (2001) Cbl: Many Adaptations to Regulate Protein Tyrosine Kinases. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 2 (4): 294-307.
- Tian, Ye, Hui Shen, Liping Xia, et Jing Lu.** (2013) Elevated Serum and Synovial Fluid Levels of Interleukin-34 in Rheumatoid Arthritis: Possible Association with Disease Progression Via Interleukin-17 Production. *Journal of Interferon & Cytokine Research: the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 33(7):398-401.
- Tkachenko, Eugene, John M. Rhodes, et Michael Simons.** (2005) Syndecans: New Kids on the Signaling Block. *Circulation Research* 96 (5): 488-500.
- Toledo, Sílvia Regina Caminada, Indhira Dias Oliveira, Oswaldo Keith Okamoto, Marco Antonio Zago, Maria Teresa de Seixas Alves, Reynaldo Jesus Garcia Filho, Carla Renata Pacheco Donado Macedo, et Antonio Sergio Petrilli.** (2010) Bone Deposition, Bone Resorption, and Osteosarcoma. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society* 28 (9): 1142-48.
- Tonini, Tiziana, Francesca Rossi, et Pier Paolo Claudio.** (2003) Molecular Basis of Angiogenesis and Cancer. *Oncogene* 22 (42): 6549-56.
- Tonks, Nicholas K.** (2013) Protein Tyrosine Phosphatases – from Housekeeping Enzymes to Master Regulators of Signal Transduction. *FEBS Journal* 280 (2): 346-78.
- Tonks, N. K., C. D. Diltz, et E. H. Fischer.** (1988) Purification of the Major Protein-Tyrosine-Phosphatases of Human Placenta. *The Journal of Biological Chemistry* 263 (14): 6722-30.
- Toppets, V, V Pastoret, V De Behr, C Dessy, et A Gabriel.** (2004) Morphologie, croissance et remaniement du tissu osseux. *Ann Méd Vét*, no 148: 1-13.
- Trusolino, Livio, Andrea Bertotti, et Paolo M. Comoglio.** (2010) MET Signalling: Principles and Functions in Development, Organ Regeneration and Cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11 (12): 834-48.
- Tushinski, R. J., et E. R. Stanley.** (1983) The Regulation of Macrophage Protein Turnover by a Colony Stimulating Factor (CSF-1). *Journal of Cellular Physiology* 116 (1): 67-75.
- Uhlen-Hansen, L., T. Wik, L. Kjellen, E. Berg, F. Forsdahl, et S. O. Kolset.** (1993) Proteoglycan Metabolism in Normal and Inflammatory Human Macrophages. *Blood* 82 (9): 2880-89.
- Van der Geer, P., et T. Hunter.** (1993) Mutation of Tyr697, a GRB2-Binding Site, and Tyr721, a PI3-Kinase Binding Site, Abrogates Signal Transduction by the Murine CSF-1 Receptor Expressed in Rat-2 Fibroblasts. *The EMBO Journal* 12 (13): 5161-72.

- Veneri, Mary Anna, Michele De Palma, Maurilio Ponzoni, Ferdinando Pucci, Cristina Scielzo, Erika Zonari, Roberta Mazzieri, Claudio Doglioni, et Luigi Naldini.** (2007) Identification of Proangiogenic TIE2-Expressing Monocytes (TEMs) in Human Peripheral Blood and Cancer. *Blood* 109 (12): 5276-85.
- Verstraete, Kenneth, et Savvas N Savvides.** (2012) Extracellular Assembly and Activation Principles of Oncogenic Class III Receptor Tyrosine Kinases. *Nature Reviews. Cancer* 12 (11): 753-66.
- Wagner, Denisa D., et Paul S. Frenette.** (2008) The Vessel Wall and Its Interactions. *Blood* 111 (11): 5271-81.
- Wagner, Eric R., Gaurav Luther, Gaohui Zhu, Qing Luo, Qiong Shi, Stephanie H. Kim, Jian-Li Gao, et al.** (2011) Defective Osteogenic Differentiation in the Development of Osteosarcoma. *Sarcoma* 2011: 325238.
- Walter, Mark, Isabelle S. Lucet, Onisha Patel, Sophie E. Broughton, Rebecca Bamert, Neal K. Williams, Emmanuelle Fantino, Andrew F. Wilks, et Jamie Rossjohn.** (2007) The 2.7 Å Crystal Structure of the Autoinhibited Human c-Fms Kinase Domain. *Journal of Molecular Biology* 367 (3): 839-47.
- Wang, J. M., J. D. Griffin, A. Rambaldi, Z. G. Chen, et A. Mantovani.** (1988) Induction of Monocyte Migration by Recombinant Macrophage Colony-Stimulating Factor. *Journal of Immunology* 141 (2): 575-79.
- Wang, Tiehui, Tomoya Kono, Milena M. Monte, Haruka Kuse, Maria M. Costa, Hiroki Korenaga, Tanja Maehr, Mansourah Husain, Masahiro Sakai, et Christopher J. Secombes.** (2013) Identification of IL-34 in Teleost Fish: Differential Expression of Rainbow Trout IL-34, MCSF1 and MCSF2, Ligands of the MCSF Receptor. *Molecular Immunology* 53 (4): 398-409.
- Wang, Yaming, et Marco Colonna.** (2014) Interleukin-34, a Cytokine Crucial for the Differentiation and Maintenance of Tissue Resident Macrophages and Langerhans Cells. *European Journal of Immunology* 44 (6): 1575-81.
- Wang, Yaming, Kristy J Szretter, William Vermi, Susan Gilfillan, Cristina Rossini, Marina Cella, Alexander D Barrow, Michael S Diamond, et Marco Colonna.** (2012) IL-34 is a tissue-restricted ligand of CSF1R required for the development of Langerhans cells and microglia. *Nature immunology* 13(8):753-60.
- Wegrowski, Y, A-L Milard, G Kotlarz, E Toulmonde, F-X Maquart, et J Bernard.** (2006) Cell surface proteoglycan expression during maturation of human monocytes-derived dendritic cells and macrophages. *Clinical and Experimental Immunology* 144 (3): 485-93.
- Weinberg, J B, A F Haney, F J Xu, et S Ramakrishnan.** (1991) Peritoneal Fluid and Plasma Levels of Human Macrophage Colony-Stimulating Factor in Relation to Peritoneal Fluid Macrophage Content. *Blood* 78 (2): 513-16.
- Weiner, Steve, Wolfie Traub, et H. Daniel Wagner.** (1999) Lamellar Bone: Structure–Function Relations ». *Journal of Structural Biology* 126 (3): 241-55.
- Wei, Suwen, Sayan Nandi, Violeta Chitu, Yee-Guide Yeung, Wenfeng Yu, Minmei Huang, Lewis T. Williams, Haishan Lin, et E. Richard Stanley.** (2010) Functional overlap but differential expression of CSF-1 and IL-34 in their CSF-1 receptor-mediated regulation of myeloid cells. *Journal of Leukocyte Biology* 88 (3): 495-505.
- Wiktor-Jedrzejczak, W, A Bartocci, A W Ferrante Jr, A Ahmed-Ansari, K W Sell, J W Pollard, et E R Stanley.** (1990) Total Absence of Colony-Stimulating Factor 1 in the Macrophage-Deficient Osteopetrotic (op/op) Mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (12): 4828-32.
- Wiktor-Jedrzejczak, W., E. Urbanowska, S. L. Aukerman, J. W. Pollard, E. R. Stanley, P. Ralph, A. A. Ansari, K. W. Sell, et M. Szperl.** (1991) Correction by CSF-1 of Defects in the Osteopetrotic Op/op Mouse Suggests Local, Developmental, and Humoral Requirements for This Growth Factor. *Experimental Hematology* 19 (10): 1049-54.
- Wishart, Matthew J., et Jack E. Dixon.** (2002) PTEN and Myotubularin Phosphatases: From 3-Phosphoinositide Dephosphorylation to Disease ». *Trends in Cell Biology* 12 (12): 579-85.
- Witfrant, Y., S. Théoleyre, C. Chipoy, M. Padrines, F. Blanchard, D. Heymann, et F. Rédini.** (2004) RANKL/RANK/OPG: New Therapeutic Targets in Bone Tumours and Associated Osteolysis ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1704 (2): 49-57.
- Wright, Jill F., Yongjing Guo, Amira Quazi, Deborah P. Luxenberg, Frann Bennett, John F. Ross, Yongchang Qiu, et al.** (2007) Identification of an Interleukin 17F/17A Heterodimer in Activated Human CD4+ T Cells. *Journal of Biological Chemistry* 282 (18): 13447-55.
- Wu, Xiaojun, Margaret A. McKenna, Xu Feng, Tim R. Nagy, et Jay M. McDonald.** (2003) Osteoclast Apoptosis: The Role of Fas in Vivo and in Vitro. *Endocrinology* 144 (12): 5545-55.

- Wu, Xing, Zheng-dong Cai, Lie-ming Lou, et Yan-bo Zhu.** (2012) Expressions of p53, c-MYC, BCL-2 and Apoptotic Index in Human Osteosarcoma and Their Correlations with Prognosis of Patients. *Cancer Epidemiology* 36 (2): 212-16.
- Yamane, Fumihiko, Yumiko Nishikawa, Kazue Matsui, Miki Asakura, Eriko Iwasaki, Koji Watanabe, Hikaru Tanimoto, et al.** (2014) CSF-1 Receptor-Mediated Differentiation of a New Type of Monocytic Cell with B Cell-Stimulating Activity: Its Selective Dependence on IL-34. *Journal of Leukocyte Biology* 95 (1): 19-31.
- Yao, G. Q., B. H. Sun, K. L. Insogna, et E. C. Weir.** (2000) Nuclear Factor-kappaB p50 Is Required for Tumor Necrosis Factor-Alpha-Induced Colony-Stimulating Factor-1 Gene Expression in Osteoblasts. *Endocrinology* 141 (8): 2914-22.
- Yarden, Y., J. A. Escobedo, W. J. Kuang, T. L. Yang-Feng, T. O. Daniel, P. M. Tremble, E. Y. Chen, M. E. Ando, R. N. Harkins, et U. Francke.** (1986) Structure of the Receptor for Platelet-Derived Growth Factor Helps Define a Family of Closely Related Growth Factor Receptors. *Nature* 323 (6085): 226-32.
- Yarmish, Gail, Michael J. Klein, Jonathan Landa, Robert A. Lefkowitz, et Sinchun Hwang.** (2010) Imaging Characteristics of Primary Osteosarcoma: Nonconventional Subtypes. *Radiographics: A Review Publication of the Radiological Society of North America, Inc* 30 (6): 1653-72.
- Yeaman, C, et A C Rapraeger.** (1993) Membrane-Anchored Proteoglycans of Mouse Macrophages: P388D1 Cells Express a Syndecan-4-like Heparan Sulfate Proteoglycan and a Distinct Chondroitin Sulfate Form. *Journal of Cellular Physiology* 157 (2): 413-25.
- Yeung, Y. G., P. T. Jubinsky, A. Sengupta, D. C. Yeung, et E. R. Stanley.** (1987) Purification of the Colony-Stimulating Factor 1 Receptor and Demonstration of Its Tyrosine Kinase Activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (5): 1268-71.
- Yoshida, H, S Hayashi, T Kunisada, M Ogawa, S Nishikawa, H Okamura, T Sudo, L D Shultz, et S Nishikawa.** (1990) The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature* 345 (6274): 442-44.
- Young, Marian F.** (2003) Bone Matrix Proteins: Their Function, Regulation, and Relationship to Osteoporosis. *Osteoporosis International: A Journal Established as Result of Cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 14 Suppl 3: S35-42.
- Yucel-Lindberg, Tülay, et Tove Båge.** (2013) Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 15.
- Yu, Wenfeng, Jian Chen, Ying Xiong, Fiona J. Pixley, Yee-Guide Yeung, et E. Richard Stanley.** (2012) Macrophage Proliferation Is Regulated through CSF-1 Receptor Tyrosines 544, 559, and 807. *The Journal of Biological Chemistry* 287 (17): 13694-704.
- Zhang, Jianming, Priscilla L. Yang, et Nathanael S. Gray.** (2009) Targeting Cancer with Small Molecule Kinase Inhibitors. *Nature Reviews. Cancer* 9 (1): 28-39.
- Zheng, Guoguang, Qing Rao, Kefu Wu, Zhihong He, et Yiqi Geng.** (2000) Membrane-bound macrophage colony-stimulating factor and its receptor play adhesion molecule-like roles in leukemic cells. *Leukemia Research* 24 (5): 375-83.
- Zimmermann, P, et G David.** (1999) The Syndecans, Tuners of Transmembrane Signaling. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 13 Suppl: S91-100.
- Zong, Fang, Eleni Fthenou, Nina Wolmer, Péter Hollósi, Ilona Kovalszky, László Szilák, Carolin Mogler, Gustav Nilsson, Georgios Tzanakakis, et Katalin Dobra.** (2009) Syndecan-1 and FGF-2, but Not FGF Receptor-1, Share a Common Transport Route and Co-Localize with Heparanase in the Nuclei of Mesenchymal Tumor Cells. *PLoS One* 4 (10): e7346.

BIOLOGIE DE L'INTERLEUKINE-34 ET RÔLE DANS LA PATHOGENÈSE DE L'OSTÉOSARCOME

Mots-clés : interleukine-34, macrophage colony-stimulating factor, M-CSFR, ostéosarcome, angiogenèse, macrophages, syndécan-1, cytokine hétéromérique

Surexprimé dans de nombreux cancers, le M-CSF se révèle être facteur de mauvais pronostic, et favorise l'initiation, la croissance et la dissémination tumorale. En 2008, une nouvelle cytokine, l'IL-34, a été identifiée comme facteur de survie monocytaire et de différenciation macrophagique/ostéoclastique, pouvant ainsi se substituer au M-CSF. Son implication a également été décrite dans certaines pathologies osseuses comme les tumeurs à cellules géantes, la polyarthrite rhumatoïde ou les maladies parodontales. Néanmoins, le rôle de l'IL-34 dans l'ostéosarcome n'a à ce jour jamais été décrit. Par ailleurs, ces cytokines « jumelles » homodimériques sont en compétition sur un récepteur commun, le M-CSFR, bien qu'un autre récepteur à l'IL-34 ait récemment été identifié. Ces travaux se sont donc intéressés aux interrelations fonctionnelles entre le M-CSF, l'IL-34 et le M-CSFR.

Tout d'abord, nous avons pu montrer que l'IL-34 était exprimée dans les tumeurs de patients atteints d'ostéosarcome, et que la cytokine favorisait la progression tumorale et le développement métastatique *in vivo* dans un modèle murin d'ostéosarcome, via l'angiogenèse et le recrutement de macrophages tumoraux. Ensuite, nous avons mis en évidence avec des études plus fondamentales l'existence d'une autre chaîne réceptrice pour l'IL-34, le syndécan-1, capable de moduler l'activation du M-CSFR induite par l'IL-34. Pour finir, l'IL-34 est capable de former une cytokine hétéromérique fonctionnelle avec sa jumelle, le M-CSF.

En conclusion, la biologie de l'IL-34 est très complexe et met en jeu différents acteurs moléculaires qu'il faudra prendre en compte pour le développement de futures thérapies.

BIOLOGY OF INTERLEUKIN-34 AND ROLE IN THE PATHOGENESIS OF OSTEOSARCOMA

Keywords : interleukin-34, macrophage colony-stimulating factor, M-CSFR, osteosarcoma, angiogenesis, macrophages, syndecan-1, heteromeric cytokine

M-CSF is highly expressed in several cancers and is often associated with a bad prognosis, as its expression correlates with increased tumor initiation, growth and metastasis. Discovered in 2008, IL-34 is a challenging cytokine that regulates, like M-CSF, the survival, proliferation and differentiation of mononuclear phagocytes. Furthermore, IL-34 is involved in some bone diseases such as giant-cell tumour of bone, rheumatoid arthritis or periodontitis. However, IL-34 role in osteosarcoma has never been described. Besides, the "twin" cytokines are homodimers known to bind to the M-CSFR in a competitive manner, even another receptor was identified more recently for IL-34. The aim of the present work was also to study the functional relationships of these cytokines and to look for an alternative binding for IL-34.

First, we demonstrated that IL-34 was expressed in tumours of patients who suffered from osteosarcoma. In addition, IL-34 promoted tumour growth and metastasis through angiogenesis development and macrophages recruitment in tumour microenvironment in an *in vivo* murine model of osteosarcoma. In a second part, this work evidenced novel and original functional mechanisms in the M-CSF/IL-34/M-CSFR triad. Indeed, IL-34 is able to bind to syndecan-1, thereby modulating the M-CSFR activation. In addition, IL-34 and M-CSF are able to form a new heteromeric cytokine, biologically active.

To conclude, these functional interactions and new partners should be further analyzed in pathophysiological contexts and should be taken into account in new treatments development.

SÉGALINY Aude

Apt25, 56 route de Saint Sébastien

44 200 NANTES