

UNIVERSITE DE NANTES  
FACULTE DE MEDECINE ET PHARMACIE

**ROLE DES CYTOKINES DE LA FAMILLE DE  
L'INTERLEUKINE-6 DANS LA BIOLOGIE DE L'OS  
ET DES OSTEOSARCOMES**

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale BIOLOGIE-SANTE  
Biologie – Médecine – Santé  
Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

*présentée  
et soutenue publiquement par*

**Bénédicte BROUNAIS**

le 23 Octobre 2009, devant le jury ci-dessous

**Rapporteurs**

Mme. ENTZ-WERLE Natacha    Professeur des Universités-Praticien  
Hospitalier, Strasbourg

M. MOREL Franck                Professeur des Universités, Poitiers

**Examineurs**

Mme. REDINI Françoise        Directrice de Recherche INSERM,  
Nantes

M. DE PINIEUX Gonzague       Professeur des Universités-Praticien  
Hospitalier, Tours

**Directeur de thèse**

M. BLANCHARD Frédéric        Chargé de Recherche INSERM,  
Nantes

## REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé dans le :

**Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs  
Osseuses Primitives - INSERM UMR 957 - EA 3822**



# SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS .....	7
INTRODUCTION.....	9
I. Le tissu osseux .....	10
A. Organisation du tissu osseux.....	10
B. Constituants du tissu osseux.....	14
C. Les remaniements physiologiques de l'os.....	27
D. L'ostéosarcome : une pathologie osseuse tumorale.....	32
II. Généralités sur les cytokines de la famille de l'Interleukine-6.....	43
A. Découverte et clonage des cytokines de la famille de l'IL-6.....	44
B. Les récepteurs des cytokines de la famille de l'IL-6.....	48
C. Les voies de signalisation activées par les cytokines de la famille de l'IL-6.....	53
D. Les effets biologiques des cytokines de la famille de l'IL-6 .....	60
III. Implication des cytokines de la famille de l'IL-6 dans la physiopathologie osseuse.....	75
Article 1 .....	76
« Le rôle dual des cytokines de la famille de l'Interleukine-6 sur le remodelage osseux et les tumeurs osseuses » .....	76
IV. Les objectifs de la thèse.....	82
PARTIE I.....	84
Effets de l'Oncostatine M sur la biologie de l'os et des ostéosarcomes .....	84
I. OSM et viabilité cellulaire .....	85
Article 2.....	88
« La sensibilisation à l'apoptose des cellules d'ostéosarcome par l'Oncostatine M dépend de STAT5 et p53 ».....	88

II. OSM et différenciation ostéoblastique.....	93
Article 3.....	94
« Un traitement à long terme par l’Oncostatine M induit une différenciation de type ostéocytaire dans des cellules d’ostéosarcome et de calvaria » .....	94
III. Effets de l’OSM <i>in vivo</i> .....	99
Article 4.....	101
« L’Oncostatine M induit une perte osseuse et sensibilise les ostéosarcomes de rat à l’effet anti-tumoral du Midostaurin <i>in vivo</i> » .....	101
PARTIE II .....	106
Effets de l’Interleukine-31 en comparaison des autres cytokines de la famille de l’Interleukine-6 sur la biologie de l’os .....	106
Introduction .....	107
Matériel et méthodes .....	109
Résultats .....	116
Discussion / conclusion.....	129
CONCLUSION GENERALE .....	134
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	144
ANNEXE .....	167

## LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique	GFP : green fluorescent protein
Apaf-1 : Apoptotic-protease-activating-factor 1	gp130 : glycoprotéine 130
ARN : acide ribonucléique	gpl : gp130 like
APP : acute phase plasma protein	Grb2 : growth-factor-receptor-bound protein 2
Bad : Bcl-xL/bcl-2 associated death promoter homolog	ICAM-1 : intercellular adhesion molecule-1
Bax : Bcl-2 associated X protein	IFN $\gamma$ : interferon $\gamma$
Bcl-2 : B-cell lymphoma 2	IGF : insulin-like growth factor
Bcl-xL : B-cell lymphoma like X long	IL- : interleukine
BMP : bone morphogenetic protein	IP3 : inositol tri-phosphate
BSP : bone sialoprotein	IRS-1 : insulin receptor substrate-1
BV/TV : bone volume / total volume	JAK : janus kinase
CBD : cytokine binding domain	JNK : c-jun N-terminal kinase
CDK : cyclin dependant kinase	LIF : leukemia inhibitory factor
C/EBP $\delta$ : CCAAT/enhancer binding protein delta	LIFR : LIF récepteur
CFU-GM : colony forming unit-granulocyte macrophage	MAPK : mitogen activated protein kinase
CLC : cardiotrophin-like cytokine	Mcl-1 : myeloid cell lymphoma 1
CNTF : ciliary neurotrophic factor	M-CSF : macrophage monocyte-colony stimulating factor
Coll I : collagène de type I	Mdm2 : mouse double minute 2
CT-1 : cardiotrophine-1	MMPs : matrix metalloproteinases
CTR : calcitonin receptor	MSC : mesenchymal stem cells
DAG : di-acyl-glycérol	NP : neuropoïétine
DMP1 : dentin matrix protein 1	OC : ostéocalcine
EPO : érythropoïétine	OP : ostéopontine
Erk1/2 : extra-cellular regulated kinase	OPG : ostéoprotégérine
FGF : fibroblast growth factor	OSM : oncostatine M
FnIII : fibronectin type III	OSMR : OSM récepteur
GFAP : glial fibrillary acidic protein	PAL : phosphatase alcaline
	PDGF : platelet derived growth factor

Phex : phosphate regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome

PI3K : phosphatidylinositol-3 kinase

PIAS : protein inhibitory of activated STATs

PKC $\delta$  : protéine kinase C delta

PLC $\gamma$  : phospholipase C gamma

PPAR $\gamma$ 2 : proliferator activated receptor gamma 2

PTH : hormone parathyroïdienne

PTH-rP : parathormone related peptide

PMA : phorbol 12-myristate13-acetate

PUMA : p53-upregulated modulator of apoptosis

RANK : receptor activator of nuclear factor kappa B

RANKL : RANK ligand

Rb : retinoblastoma susceptibility tumor-suppressor

S1P : sphingosine 1 phosphate

SH2 : Src homology 2

Shc : SH2 and collagen-homology-domain containing protein

SOCS: suppressor of cytokine signaling

SOS : son of sevenless

STAT : signal transducer and activator of transcription

Sts : staurosporine

TGF $\beta$  : transforming growth factor bêta

TIMPs : tissue inhibitors of matrix metallo-proteinases

TNF : tumor necrosis factor

TRAP : tartrate resistant acidic protein

# **INTRODUCTION**

## **I. Le tissu osseux**

Le tissu osseux est un tissu conjonctif spécialisé composé d'une fraction organique et d'une fraction minérale qui lui confèrent ses propriétés de rigidité et d'élasticité. Il s'agit d'un tissu de soutien servant de points d'ancrage au système musculaire et assurant la protection des organes vitaux. En effet, le système nerveux central est protégé par les os du crâne et le rachis vertébral, alors que le cœur et les poumons sont entourés par la cage thoracique. Principale réserve d'ions minéraux de l'organisme (calcium, phosphate, magnésium), le tissu osseux est un tissu dynamique, constamment remodelé, entraînant la libération ou le stockage de sels minéraux, et jouant ainsi un rôle extrêmement important dans le maintien de l'homéostasie phosphocalcique. De plus, dans les espaces médullaires des os se trouve la moelle osseuse, siège de l'hématopoïèse.

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

### **A. Organisation du tissu osseux**

#### **1. Organisation générale**

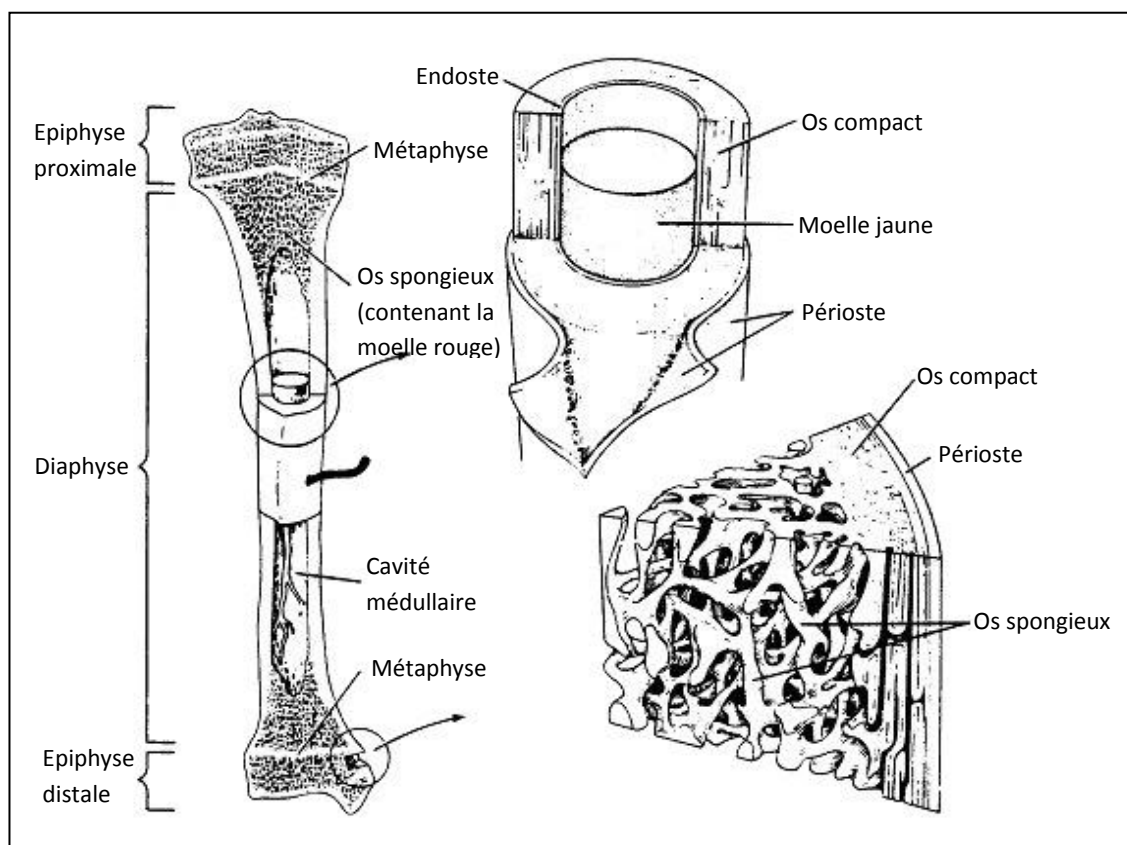
Le squelette humain comporte trois types d'os :

- Les os longs comme l'humérus, le fémur ou le tibia présentent une de leurs dimensions nettement plus grande que les deux autres. Ils servent classiquement de modèle pour décrire la structure de l'os.
- Les os courts tels que les vertèbres ou les phalanges ont leurs trois dimensions sensiblement égales. Ils sont composés d'un noyau d'os spongieux entouré d'os compact.



- Les os plats comme le sternum ou les os pariétaux ont une dimension nettement plus courte que les deux autres. Ils sont composés de deux couches d'os compact, les tables interne et externe, renfermant une couche d'os spongieux.

L'os long chez l'adulte est constitué d'une partie centrale cylindrique appelée diaphyse et de deux extrémités élargies et arrondies appelées épiphyses, couvertes de cartilage articulaire. Des régions coniques, appelées métaphyses, connectent la diaphyse à chaque épiphyse. La forme particulière des os longs leur confère la capacité de résister aux forces de tension, de traction et de cisaillement. Histologiquement, on distingue l'os cortical ou compact de l'os trabéculaire ou spongieux, l'ensemble étant entouré d'une enveloppe externe richement vascularisée, le périoste, sauf au niveau du cartilage articulaire et aux endroits d'insertion des tendons et des ligaments (figure 1). Cette enveloppe joue un rôle fondamental dans la croissance en longueur et surtout circonférentielle de l'os. Chez l'enfant, elle est constituée de deux couches, une couche superficielle fibreuse vascularisée et une couche profonde contenant des cellules souches et des pré-ostéoblastes (Toppets, 2004).



*Figure 1 : Organisation structurale d'un os long.*

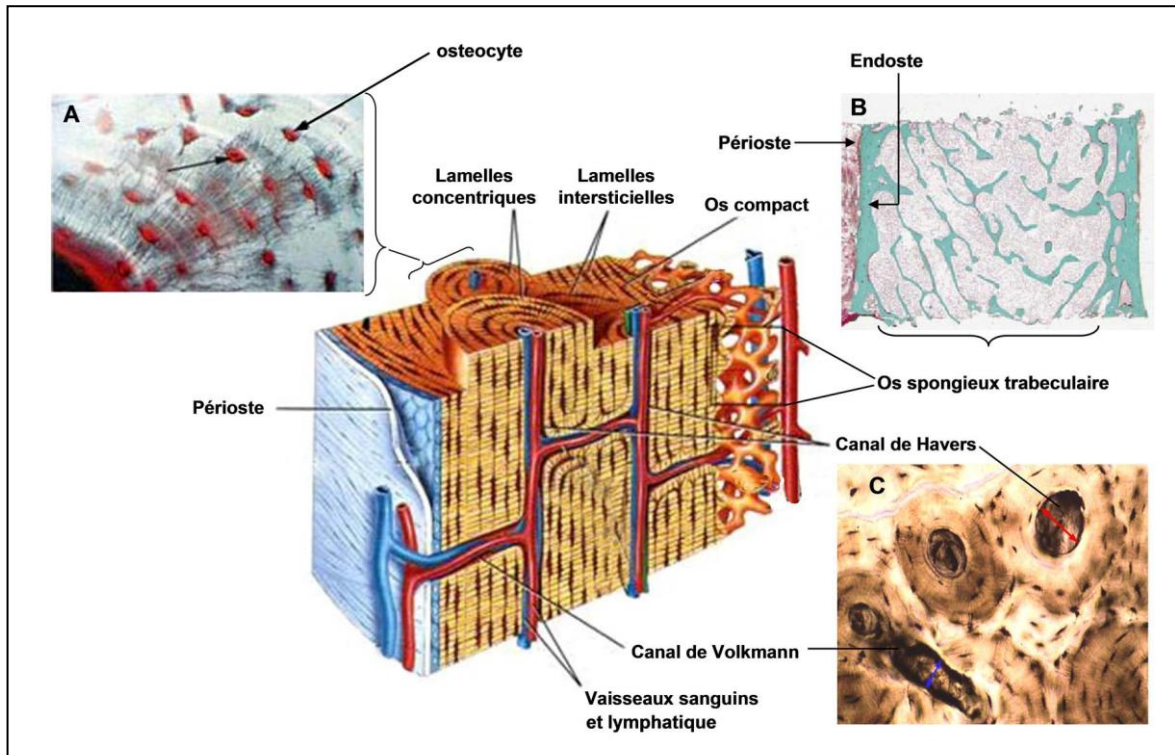
## 2. Organisation macroscopique

La classification en os cortical et trabéculaire est basée sur le degré de porosité (Toppets, 2004) :

- 5 à 30% pour l'os cortical qui constitue la diaphyse des os longs et l'enveloppe des os plats et courts.
- 30 à 90% pour l'os trabéculaire situé surtout au centre de la diaphyse et dans les régions métaphysaire et diaphysaire ainsi que dans les os courts et plats. (Young and Kobluk, 1995).

### a. Os cortical

L'os cortical, également appelé os compact, représente 80-85% du tissu osseux et constitue une enveloppe résistante composée par la juxtaposition d'ostéons cylindriques de 200 à 300µm de diamètre alignés parallèlement à la diaphyse. Chaque ostéon, qui correspond à l'unité structurale de l'os cortical, est composé de lamelles concentriques (de 20 à 30) de fibres de collagène disposées autour d'un canal. Ce canal, appelé canal de Havers, large de 40 à 50µm, permet le passage de vaisseaux et de fibres nerveuses amyéliniques mais aussi les connexions intercellulaires. Les canaux de Havers sont délimités par des cellules ostéoprogénitrices et des ostéoblastes qui se retrouvent emmurées dans la matrice extracellulaire lors de la maturation des ostéons et deviennent alors des ostéocytes. Les canaux de Havers sont reliés entre eux par des canaux transversaux dits de Volkman assurant l'homéostasie phospho-calcique mais aussi la communication entre la vascularisation périostée et les vaisseaux de la moelle osseuse (figure 2)(Heymann, 2008).

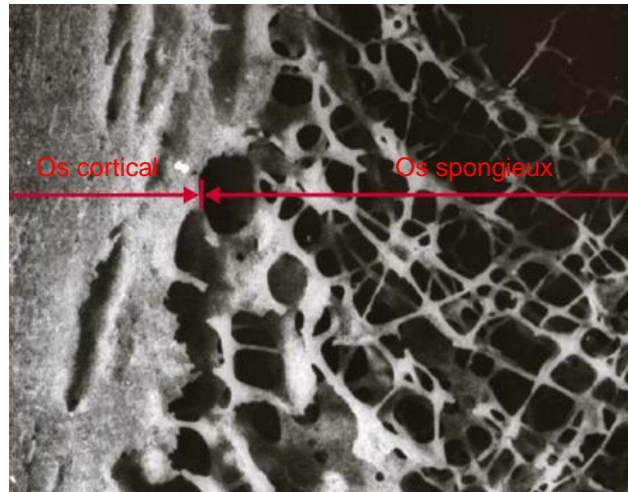


*Figure 2 : Représentation schématique d'un os de type haversien. D'après (Marieb, 1998)*

*A : coloration d'ostéocytes figés dans les lamelles concentriques de l'unité structurale de l'os compact : l'ostéon. B : réseau trabéculaire limité à l'endoste par les deux corticales (composées d'os compact) recouvertes de périoste. Coloration au trichrome de Goldner. C : canal de Havers et canal de Volkmann vue en coupe.*

#### b. Os trabéculaire

L'os trabéculaire ou os spongieux est constitué d'un réseau de travées osseuses composées de plaques de tissu minéralisé reliées entre elles par des arches (figure 3). Entre les travées osseuses se positionne la moelle osseuse représentant environ 75% du volume total de l'os spongieux. De par sa structure, l'os trabéculaire dispose d'une large surface d'échange avec la moelle osseuse, lui permettant ainsi d'effectuer au mieux ses fonctions hématopoïétiques. A l'interface de la moelle osseuse et du tissu minéralisé se trouvent les cellules ostéoblastiques (Heymann, 2008).



*Figure 3 : Jonction entre os spongieux et os cortical (grossissement 4x)(Gotzos et al., 2007).*

## **B. Constituants du tissu osseux**

L'os est un tissu conjonctif constitué de cellules : les ostéoblastes, les ostéocytes et les ostéoclastes, ainsi que d'une matrice extracellulaire occupant entre 92 et 95% du volume tissulaire.

### **1. La matrice extracellulaire**

L'os sec et dégraissé est formé de 70% de substances minérales et de 30% de substances organiques. Ces deux fractions ne sont pas simplement juxtaposées mais au contraire liées l'une à l'autre.

La fraction organique du tissu osseux est composée essentiellement de fibres de collagène de type I entourées d'une substance fondamentale interfibrillaire. Dans le tissu osseux lamellaire, les fibres de collagène sont arrangées de façon parallèle au sein d'une même lamelle osseuse, mais leur orientation varie d'une lamelle à l'autre. La substance interfibrillaire est composée de constituants variés tels que des glycoprotéines (ostéopontine, sialoprotéine osseuse), des protéines contenant des résidus d'acide glutamique carboxylé (ostéocalcine), des phosphoprotéines, des phospholipides, des protéoglycanes, des cytokines et des facteurs de croissance. L'ostéocalcine, qui est la plus abondante des protéines non collagéniques (10 à 20%), est spécifique de la matrice extracellulaire du tissu osseux. Elle

jouerait un rôle dans l'attraction des ostéoclastes dans les foyers de résorption et dans le processus de minéralisation (Glowacki et al., 1991; Swaminathan, 2001). Plusieurs protéines non collagéniques telles que l'ostéopontine, la sialoprotéine osseuse et la fibronectine renferment une séquence arginine-glycine-acide aspartique (RGD). Cette séquence RGD caractérise les protéines d'adhérence cellulaire et est reconnue par certaines protéines membranaires appelées intégrines (Ruoslahti, 1991). Ainsi, les intégrines présentes à la surface des ostéoblastes permettraient leur attachement à la matrice extracellulaire. Des facteurs de croissance et des cytokines (transforming growth factor  $\beta$  ou TGF $\beta$ , insulin-like growth factor ou IGF, tumor necrosis factor ou TNF, les interleukines et les bone morphogenetic proteins ou BMP) sont également présents en petites quantités dans la matrice osseuse (Hauschka et al., 1986). Ces facteurs protéiques jouent un rôle important dans l'activation et la différenciation cellulaire et interviennent dans le couplage entre formation et résorption osseuse (Heymann, 2008).

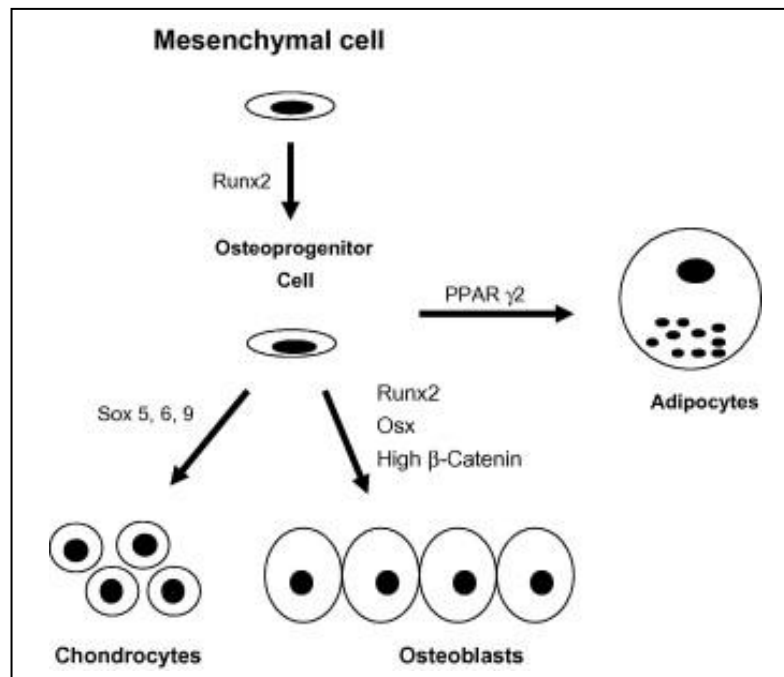
La phase minérale de la matrice osseuse confère à l'os sa rigidité et sa résistance mécanique et représente une importante réserve minérale. En effet, environ 99% du calcium de l'organisme, 85% du phosphore et entre 40 et 60% du sodium et du magnésium sont incorporés dans les cristaux qui constituent la substance minérale osseuse. Elle est essentiellement composée de phosphate de calcium cristallisé sous forme de cristaux d'hydroxyapatite ( $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) qui ont une forme hexagonale, aplatie et sont disposés dans les espaces interfibrillaires. Leur nombre et leur taille s'accroissent lentement au cours du processus de minéralisation secondaire succédant à la minéralisation primaire qui elle-même suit immédiatement la synthèse de matrice par les ostéoblastes (Heymann, 2008).

## **2. L'ostéoblaste**

### **a. Origine et différenciation des ostéoblastes**

Les ostéoblastes sont des cellules ostéoformatrices, responsables de la synthèse des constituants de la matrice organique osseuse et de sa minéralisation. D'origine mésodermique, les progéniteurs ostéoblastiques sont des cellules mésenchymateuses (Owen, 1988), essentiellement présentes chez l'adulte dans le stroma médullaire mais également au niveau du périoste et de l'endoste. Ces cellules souches pluripotentes sont communes aux

ostéoblastes, chondrocytes, myocytes et adipocytes. La différenciation vers l'une ou l'autre voie implique l'expression de facteurs de transcription spécifiques. Ainsi, l'expression de Sox-9 induit la voie chondroblastique, celle de Myo-D la voie myoblastique et celle de PPAR $\gamma$ 2 (proliferator activated receptor gamma 2) la voie adipocytaire (Pittenger et al., 1999). Une série complexe d'étapes de prolifération et de différenciation conduisent aux ostéoblastes matures depuis les cellules souches mésenchymateuses (figure 4).



*Figure 4 : Les ostéoblastes proviennent de la différenciation de cellules souches mésenchymateuses sous l'action de différents facteurs de transcription (Marie, 2008).*

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

précurseurs, seules Fra-2 et JunD composent le complexe AP1 dans les ostéoblastes matures (McCabe et al., 1996).

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

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

#### b. Les différentes cellules de la lignée ostéoblastique

Plusieurs stades peuvent être définis au cours de la différenciation ostéoblastique.

Les **pré-ostéoblastes**, cellules précurseurs déjà engagées dans la voie ostéoblastique, sont généralement situés près des surfaces de formation osseuse où les ostéoblastes actifs produisent de l'os. Ces cellules, allongées, ont la capacité de se diviser mais ne synthétisent pas de matrice. Elles produisent néanmoins des précurseurs des molécules de collagène de type I et expriment quelques marqueurs précoces du tissu osseux, tels que la phosphatase alcaline ou l'ostéonectine (Franz-Odendaal et al., 2006).

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

des ostéoblastes actifs est en effet la production de la matrice osseuse organique.

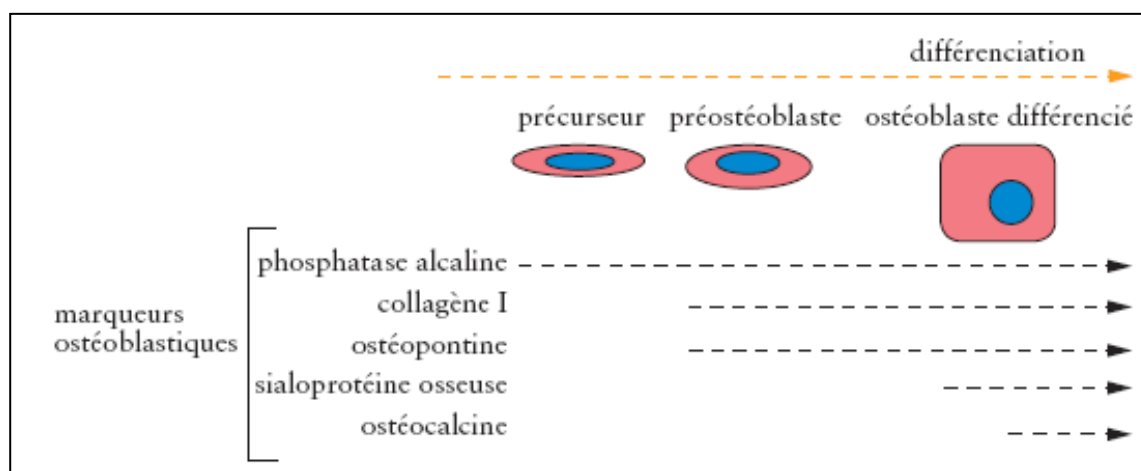
Les ostéoblastes matures synthétisent et expriment alors de nombreux marqueurs (figure 5) :

- la phosphatase alcaline, enzyme localisée dans la membrane plasmique dont l'activité se traduit par l'hydrolyse des pyrophosphates inorganiques, qui sont des inhibiteurs de la calcification. Elle contribue alors au processus de minéralisation de la matrice (Wennberg et al., 2000).

- le collagène de type I, qui représente 90% de la matrice organique de l'os. Cette molécule est constituée d'une triple hélice de trois chaînes polypeptidiques alpha, deux chaînes  $\alpha 1$  et une chaîne  $\alpha 2$ . Ces chaînes sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique de l'ostéoblaste puis sécrétées dans la matrice extracellulaire où elles subissent des modifications avec clivage des propeptides C- et N- terminaux et association des molécules en fibres.

- la sialoprotéine osseuse et l'ostéopontine, protéines adhésives possédant une séquence peptidique RGD qui, en se fixant à des récepteurs membranaires de type intégrine, permet l'adhésion des cellules à la matrice osseuse.

- l'ostéocalcine, protéine spécifique du tissu osseux. Elle y est exprimée en grande quantité, représentant 10 à 20 % des protéines non collagéniques de l'os. Elle contient des résidus acides carboxyglutamiques (gla) dont la carboxylation est dépendante de la vitamine K. Cette protéine, exprimée tardivement par l'ostéoblaste mature, semble jouer un rôle clé dans la résorption osseuse en stimulant la différenciation ostéoclastique (Glowacki et al., 1991).



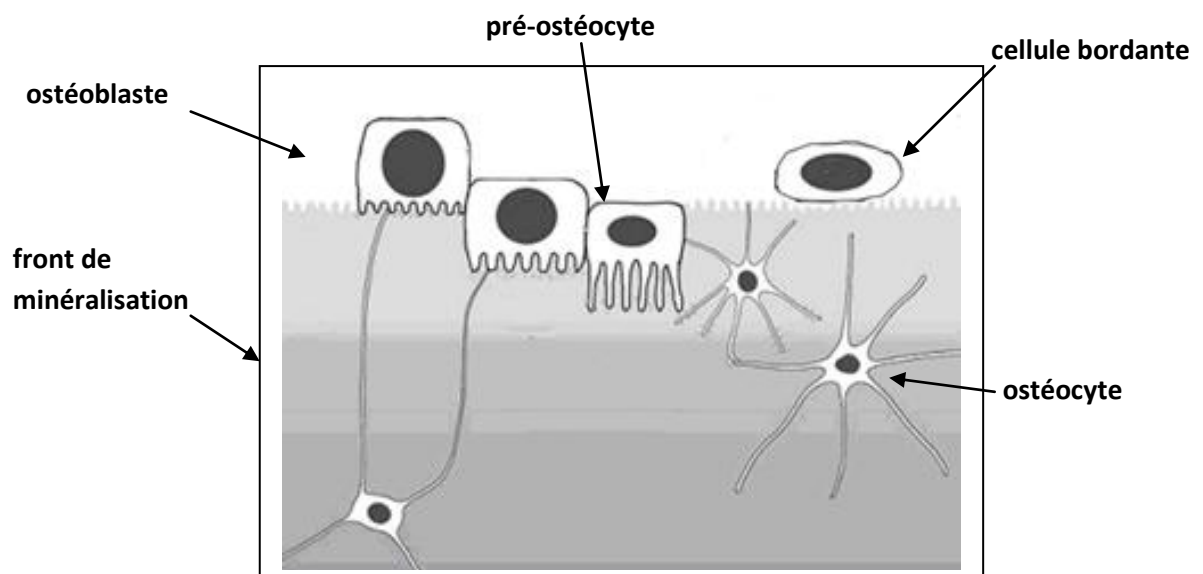
*Figure 5 : Les principaux marqueurs exprimés au cours de la différenciation ostéoblastique (Heymann, 2008).*



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

En dehors des protéines osseuses, les ostéoblastes sécrètent un certain nombre de facteurs de croissance qui jouent un rôle important dans la régulation du métabolisme osseux, tels que le TGF- $\beta$ , le FGF (fibroblast growth factor) et les BMPs. Ils produisent également des molécules régulatrices solubles comme des cytokines (Interleukine-6, Interleukine-11, TNF $\alpha$ ), RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor  $\kappa$ B Ligand) ou OPG (Ostéoprotégérine), relarguées dans le milieu extracellulaire ou exprimées à la surface de l'ostéoblaste et agissant sur les cellules précurseurs des ostéoclastes (Suda et al., 1999). Certaines protéases, capables de réguler le remodelage osseux par leur action sur les protéines de la matrice osseuse, sont également produites par les ostéoblastes. C'est le cas des MMPs (matrix metalloproteinases), dont la MMP13 ou collagénase 3 (Stahle-Backdahl et al., 1997).

A l'issue de la période de formation osseuse, la majorité des ostéoblastes (65%) meurent par apoptose, un processus de mort cellulaire programmée commun à de nombreux tissus. Les cellules restantes peuvent alors se transformer en cellules bordantes ou en ostéocytes (Manolagas, 2000) (figure 6).



*Figure 6 : Ostéoblastes, ostéocytes et cellules bordantes.*

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

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

Les **ostéocytes** proviennent d'ostéoblastes enfouis dans la matrice osseuse minéralisée, à l'intérieur d'une lacune périostéocytaire ou ostéoplaste. Ce sont les cellules les plus abondantes de l'os mature. La transformation de l'ostéoblaste en ostéocyte dure environ trois jours pendant lesquels de nombreux changements histologiques et morphologiques vont s'opérer. Le volume cytoplasmique est réduit de 70% alors que de nombreux et fins prolongements cytoplasmiques sont formés (Palumbo, 1986), leur conférant une forme étoilée (figure 7). Le cytoplasme des ostéocytes renferme un abondant cytosquelette, composé de microtubules, de filaments intermédiaires et de filaments d'actine. Par contre, il est très peu riche en organites : le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et les mitochondries sont fortement réduits, correspondant à une faible activité de synthèse protéique, alors que s'accumule du glycogène (Knothe Tate et al., 2004). Les marqueurs ostéoblastiques précédemment exprimés vont progressivement disparaître (phosphatase alcaline, collagène de type I, sialoprotéine osseuse, ostéocalcine) lors de la différenciation terminale en ostéocyte (Franz-Odenaal et al., 2006).

Les ostéocytes possèdent de nombreux et fins prolongements cytoplasmiques qui leur permettent d'établir des contacts avec les autres ostéocytes et les cellules bordantes qui recouvrent la surface osseuse. Les substances nutritives qui proviennent du sang atteignent les ostéocytes en diffusant soit dans les canalicules autour des prolongements cellulaires, soit dans les cellules elles-mêmes, passant de l'une à l'autre par des jonctions communicantes (jonctions GAP). Ce mode de diffusion, peu efficace, impose aux ostéocytes de se trouver à moins de 0,2 mm d'un vaisseau sanguin. Cette limitation explique la taille des travées de l'os spongieux et la structure de base de l'os compact : l'os haversien.

Les ostéocytes, qui forment un vaste réseau, interviennent essentiellement dans la transmission de signaux mécanosensoriels au cours du processus de remodelage osseux. En

effet, ces cellules interagissent avec les fibres de collagènes tapissant les ostéoplastes par l'intermédiaire de molécules de type intégrines et fonctionnent comme des mécanorécepteurs, percevant les modulations des contraintes mécaniques appliquées à l'os. Ils transmettent ensuite les informations aux ostéoblastes et aux cellules bordantes par l'intermédiaire des jonctions communicantes (Bonewald and Johnson, 2008; Genetos et al., 2007), assurant une adaptation fonctionnelle du tissu osseux.

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

- la sclérostine, protéine produite et sécrétée par les ostéocytes durant la phase de minéralisation de la matrice (van Bezooijen et al., 2005), qui réduit la formation osseuse en inhibant la prolifération et la différenciation des ostéoblastes, et en stimulant leur apoptose (Sutherland et al., 2004).

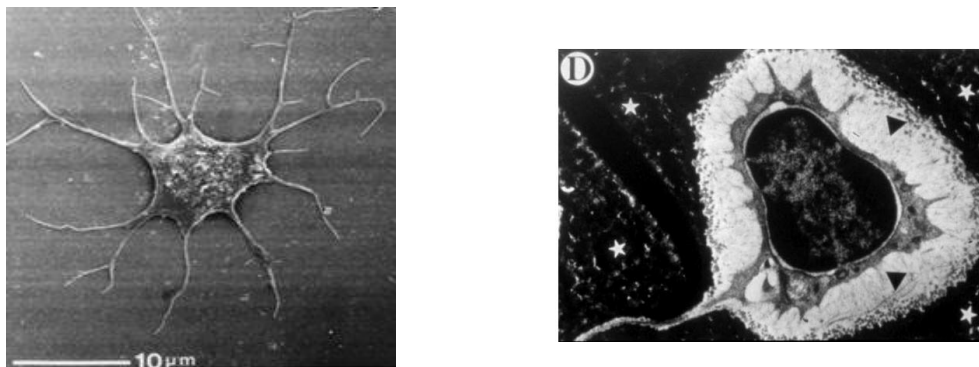
- l'antigène E11, protéine de surface exprimée lors de la transition ostéoblaste/ostéocyte (Zhang et al., 2006). Si certaines études tendent à prouver que ce marqueur est spécifique des ostéocytes (Schulze et al., 1999), d'autres au contraire ont montré une expression commune aux ostéoblastes et ostéocytes (Hadjjargyrou et al., 2001).

- le CD44, une glycoprotéine transmembranaire ayant des fonctions d'adhésion entre cellules et matrice, qui est exprimé très fortement par les ostéocytes mais également par les lignées d'ostéosarcomes (Hughes et al., 1994; Jamal and Aubin, 1996)

- la DMP1 (Dentin Matrix Protein 1), phosphoprotéine détectée dans la matrice et exprimée par les pré-ostéocytes et ostéocytes (Rios et al., 2005; Toyosawa et al., 2001)

- la métalloprotéase Phex (Phosphate regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome) exprimée par les ostéoblastes et les ostéocytes (Ruchon et al., 2000).

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



*Figure 7 : Ostéocyte*

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

*à droite : microscopie électronique à transmission.*

### c. Fonction des ostéoblastes

La fonction essentielle de l'ostéoblaste mature est la synthèse, le dépôt et la minéralisation de la matrice osseuse organique.

- Production de la matrice osseuse (Malaval et al., 1996)

La matrice osseuse organique est constituée essentiellement de collagène de type I, de protéoglycane, de protéines non collagéniques et de facteurs de croissance.

L'ostéoblaste mature synthétise du collagène de type I, qui forme la majorité de la substance organique osseuse et les molécules de collagène s'assemblent dans le milieu extracellulaire en fibrilles après coupure enzymatique des propeptides C et N terminaux. La stabilité et l'organisation des fibrilles de collagène assurent la rigidité nécessaire au tissu osseux tout en assurant une certaine élasticité. Un rôle important de la trame collagénique osseuse est de se lier aux protéines non collagéniques et aux facteurs de croissance produits par l'ostéoblaste (Manolagas, 2000).

- Minéralisation de la matrice

La minéralisation se fait, dans un deuxième temps, au niveau du front de minéralisation, à la jonction entre tissu ostéoïde, c'est-à-dire la substance pré-osseuse non minéralisée, et tissu minéralisé. Les ostéoblastes, qui régulent la concentration locale en calcium et phosphate, sont impliqués dans l'initiation de la minéralisation ainsi que dans la régulation de la propagation du minéral. Les espaces situés entre les fibres de collagène de type I alignées

jouent un rôle important dans la minéralisation de la matrice osseuse puisqu'ils seraient le site de formation des cristaux d'hydroxyapatite associés avec les complexes collagène-protéines non collagéniques (Manolagas, 2000). En effet, certaines protéines telles que l'ostéocalcine et l'ostéonectine ont une forte affinité pour le calcium et pourraient contribuer à la minéralisation du collagène auquel elles sont associées (Hauschka et al., 1986).

Le processus de minéralisation du tissu osseux dépend, d'une part, de la présence d'une substance matricielle extracellulaire et, d'autre part, d'une concentration adéquate en minéraux. C'est un processus complexe faisant intervenir, à la partie basale des ostéoblastes, de petites vésicules provenant de la membrane plasmique des ostéoblastes, contenant une fraction de cytoplasme et nommées vésicules matricielles. Ces vésicules matricielles sont des réservoirs de phosphatases alcalines et d'ions, qui, déversées dans le milieu extracellulaire initieraient la minéralisation du tissu ostéoïde en favorisant les concentrations locales en ions calcium et phosphate (Toppets, 2004).

### **3. L'ostéoclaste**

#### **a. Origine et différenciation des ostéoclastes**

Responsable de la résorption osseuse, l'ostéoclaste est une grosse cellule multinucléée pouvant renfermer de 2 à 30 noyaux. Elle possède un appareil de golgi très développé, de nombreuses mitochondries péri-nucléaires et est riche en enzymes lysosomales telles que TRAP (Tartrate Resistant Acide Phosphatase) ou la cathepsine K et en collagénases nécessaires à son activité de dégradation osseuse (Heymann, 2008).

Contrairement aux ostéoblastes qui dérivent de cellules souches mésenchymateuses pluripotentes, les ostéoclastes dérivent de la lignée hématopoïétique monocytaire (Suda et al., 1992). Les cellules souches hématopoïétiques donnent naissance aux cellules mononucléées circulantes appelées CFU-GM (Colony Forming Unit-Granulocyte Macrophage). Le M-CSF (Macrophage Monocyte-Colony Stimulating Factor) stimule la prolifération de ces CFU-GM afin de maintenir un pool de cellules mononucléées appartenant à la lignée monocyte/macrophage, ces cellules étant considérées comme les précurseurs des ostéoclastes et caractérisées par l'absence de deux marqueurs ostéoclastiques, TRAP et le récepteur à la calcitonine (CTR).

Les précurseurs mononucléés sont ensuite attirés vers un site de résorption, par chimiotactisme, puis se fixent à la matrice osseuse pour se différencier, sous l'action de M-CSF et RANKL, en ostéoclastes mononucléés exprimant le CTR et TRAP. Ces cellules, toujours sous l'effet de M-CSF et RANKL, fusionnent pour former des cellules multinucléées qui ne sont pas encore actives et ne développent pas de bordure en brosse. L'activation des ostéoclastes est due à RANKL qui va stimuler la formation de la bordure en brosse (Lacey et al., 1998; Suda et al., 1999). L'ostéoclaste mature est visible au fond des lacunes de résorption appelées lacunes de Howship, au contact de la matrice osseuse calcifiée.

#### b. Fonction des ostéoclastes

La fonction essentielle des ostéoclastes est la résorption osseuse. Durant la première phase de ce processus, une réorganisation du cytosquelette des ostéoclastes est observée : les microfilaments d'actine, de vinculine et de taline s'organisent en anneaux. Ce phénomène est indispensable à la formation de la zone claire, zone dépourvue d'organites intracellulaires et riche en filaments d'actine (Lakkakorpi and Vaananen, 1996). Elle correspond à une région où la membrane plasmique est en contact avec l'os délimitant ainsi un compartiment clos entre la bordure en brosse et la surface osseuse. Le processus de résorption est réalisé dans ce compartiment appelé chambre de résorption (Holtrop and King, 1977) et s'effectue en deux étapes : la dissolution de la matrice minérale précède la dégradation de la phase organique. Ainsi, l'acidification de la chambre de résorption ( $\text{pH} = 4,5$ ) permet la déminéralisation de la matrice. Ce processus fait intervenir des pompes à protons ATP dépendantes. Le pH à l'intérieur de l'ostéoclaste est maintenu par un transport passif de  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ . Enfin, l'électroneutralité est assurée par un canal chlore (figure 8). Quand à la digestion de la trame organique, elle s'effectue sous l'action des enzymes protéolytiques (cathepsine K, collagénases, métalloprotéases telles que la MMP-9, ...) contenues dans les lysosomes notamment (Blair et al., 1986).

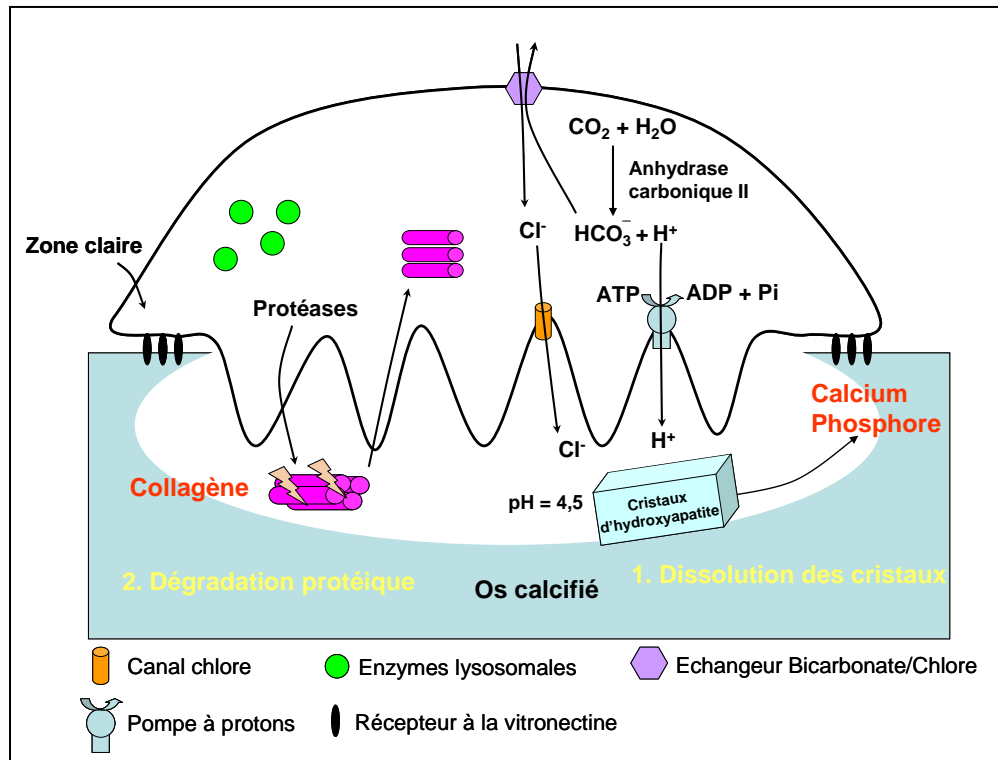


Figure 8 : Schéma d'un ostéoclaste actif (Rousselle and Heymann, 2002).

#### 4. Interactions entre les cellules osseuses

En 1981, Rodan et Martin (Rodan and Martin, 1981) ont émis l'hypothèse selon laquelle la régulation de la résorption osseuse par les hormones ostéotropiques serait dépendante des ostéoblastes. Ils se basaient sur le fait que les ostéoclastes ne semblaient pas avoir de récepteurs à la PTH (hormone parathyroïdienne), ni aux autres hormones ostéotropiques alors que les ostéoblastes possédaient de tels récepteurs. Cette hypothèse a cependant été récemment invalidée puisqu'il a été démontré que les ostéoclastes expriment un récepteur à la PTH (Dempster et al., 2005). Des expériences de co-cultures de cellules stromales/ostéoblastes et de cellules spléniques/cellules de moelle osseuse ont par ailleurs permis de mettre en évidence que les ostéoblastes sont nécessaires au développement des ostéoclastes et que les contacts cellule-cellule sont indispensables à leur différenciation et activation (Chambers, 1988; Takahashi et al., 1988). En effet, les ostéoblastes produisent deux facteurs nécessaires et suffisants pour l'ostéoclastogenèse : M-CSF et RANKL, cette dernière cytokine existant sous forme soluble et membranaire (Lacey et al., 1998; Yasuda et al., 1998). Ce contact cellule-cellule est également très important pour la fonction des ostéoclastes

matures. En effet, si les cellules ostéoblastiques et les ostéoclastes sont cultivés dans des chambres de culture séparées par une membrane, et que les contacts entre ces cellules sont ainsi bloqués, la formation des lacunes de résorption par les ostéoclastes est fortement diminuée (Jimi et al., 1996).

Les ostéoblastes/cellules stromales sont les cellules cibles des hormones ostéotropiques et cytokines [PTH, vitamine D3 (1 alpha, 25(OH)2-D3), IL-1, IL-6, ...], et contrôlent les processus de différenciation/activation ostéoclastiques (Collin et al., 1992; Suda et al., 1995). Ces hormones et cytokines agissent sur les ostéoblastes en induisant l'expression de RANKL (Horwood et al., 1998) qui va alors interagir avec son récepteur RANK présent à la surface des précurseurs et des ostéoclastes matures et ainsi stimuler la différenciation et l'activation des ostéoclastes (Hsu et al., 1999; Nakagawa et al., 1998). Les ostéoblastes jouent donc un rôle fondamental dans le recrutement et l'activité de résorption des ostéoclastes.

De même, des expériences de co-culture de cellules de la lignée murine ostéocytaire MLOY4 et de cellules spléniques/cellules de moelle osseuse ont montré que les ostéocytes supportent la formation d'ostéoclastes en l'absence de vitamine D3 ou d'autres facteurs ostéotropiques exogènes. En effet, ces cellules sécrètent des quantités importantes de M-CSF et expriment RANKL à leur surface, en particulier le long de leurs prolongements cytoplasmiques. De plus, des milieux conditionnés de cellules MLOY4 ne sont pas capables d'induire la formation d'ostéoclastes indiquant que le contact cellulaire est nécessaire (Zhao et al., 2002). Cette capacité des ostéocytes à induire la différenciation ostéoclastique est réduite par les contraintes mécaniques puisque celles-ci inhibent la production de RANKL et augmentent la libération d'OPG (You et al., 2008), molécule anti-résorptive soluble sécrétée par l'ostéoblaste et jouant le rôle de récepteur leurre pour RANKL (Wittrant et al., 2004). Cependant, la capacité des ostéocytes à établir des contacts directs avec les précurseurs ostéoclastiques *in vivo* n'a pas été démontrée.

Inversement, les ostéoclastes sont capables de contrôler la formation osseuse par les ostéoblastes. En effet, des milieux conditionnés d'ostéoclastes stimulent la migration cellulaire et la différenciation de cellules souches mésenchymateuses (MSC) humaines en cellules ostéoblastiques capables de former des nodules minéralisés *in vitro*. Cet effet dépend d'une augmentation de la production de la sphingosine kinase 1 qui catalyse la phosphorylation de la sphingosine 1 pour former la sphingosine 1 phosphate (S1P). Wnt10b et BMP6 sont également significativement induits dans les ostéoclastes matures et sont



impliqués dans la différenciation des cellules souches mésenchymateuses (MSC) en ostéoblastes. Ainsi, les ostéoclastes pourraient recruter les précurseurs ostéoblastiques au site de remodelage osseux grâce à S1P et BMP6 puis stimuler la formation osseuse en activant la voie Wnt/BMP (Pederson et al., 2008).

## **C. Les remaniements physiologiques de l'os**

### **1. La croissance osseuse**

L'ostéogenèse ou formation du tissu osseux utilise un processus de métaplasie au cours duquel un tissu conjonctif est transformé en tissu osseux. Il existe deux phases d'ossification : primaire et secondaire.

#### **a. Ossification primaire**

L'ossification primaire correspond à la formation d'un tissu osseux sur un support non osseux. Elle débute durant la vie embryonnaire ou fœtale, à des moments variables suivant les pièces osseuses. La formation de l'os peut être intraconjonctive ou réalisée sur un support cartilagineux :

- La formation intraconjonctive correspond soit à l'ossification périostique pour la diaphyse des os longs, soit à l'ossification membranaire pour les os plats.
- La formation sur un support cartilagineux est nommée ossification endochondrale, comme au niveau de la diaphyse des os longs, des épiphyses des os longs ou des os courts.

#### Ossification membranaire

L'ossification membranaire a lieu lors du développement des os plats. Le tissu osseux se développe directement par différenciation du tissu mésenchymateux embryonnaire. Le processus d'ossification débute avec l'arrivée de la vascularisation. Des cellules mésenchymateuses au niveau d'une zone vascularisée du tissu conjonctif embryonnaire prolifèrent, formant des condensations cellulaires puis les cellules se différencient directement en pré-ostéoblastes puis en ostéoblastes. Ces cellules élaborent la matrice ostéoïde sur un

support de fibres de collagène de type I, qui se minéralise dans un second temps. L'ossification progresse de proche en proche formant le réseau de travées osseuses de l'os spongieux. L'os formé au niveau de ces sites d'ossification est de l'os fibreux qui sera résorbé et remplacé par du tissu osseux lamellaire (Toppets, 2004).

### Ossification périostique

L'ossification périostique participe à la croissance des os courts et est responsable de l'augmentation de diamètre des os longs. Elle se produit autour des os, soit à partir du périchondre, c'est-à-dire du tissu conjonctif dense et vascularisé entourant la surface de la majeure partie des substances cartilagineuses, si l'ébauche osseuse initiale est formée de cartilage, soit à partir du périoste si le tissu sous-jacent est déjà de l'os. Les ostéoblastes sécrètent de l'os réticulaire sur un support de fibres de collagène provenant du périoste. Ces fibres orientées dans tous les sens permettent une continuité physique entre le tissu osseux en formation et les tissus péri-osseux. Au fur et à mesure, les travées osseuses s'épaississent par sécrétion successive de matrice osseuse par les ostéoblastes. La densification progressive de la matrice osseuse réalise des lames concentriques d'os périostique autour de la diaphyse. Cette apposition des lames de l'intérieur vers l'extérieur permet la croissance en épaisseur des diaphyses des os longs (Toppets, 2004).

### Ossification endochondrale

L'ossification endochondrale est le processus survenant au cours du développement des os longs. Elle comporte deux phases : la destruction du cartilage préexistant puis son remplacement par de l'os.

Chez l'embryon, les cellules mésenchymateuses migrent, se condensent et se différencient en chondrocytes qui sécrètent une matrice cartilagineuse, formant l'ébauche d'un membre. Dans la partie centrale des maquettes de cartilage, les chondrocytes s'hypertrophient et la matrice cartilagineuse se réduit à de fines travées. Des sels phosphocalciques précipitent sur cette matrice donnant naissance à du cartilage calcifié dans lequel les chondrocytes hypertrophiés se retrouvent prisonniers puis meurent par apoptose. Une néovascularisation permet alors l'acheminement d'ostéoclastes qui résorbent le cartilage calcifié réalisant ainsi des travées, et de cellules ostéoprogénitrices. Ces cellules, une fois fixées sur les travées se multiplient et se transforment en ostéoblastes qui sécrètent une

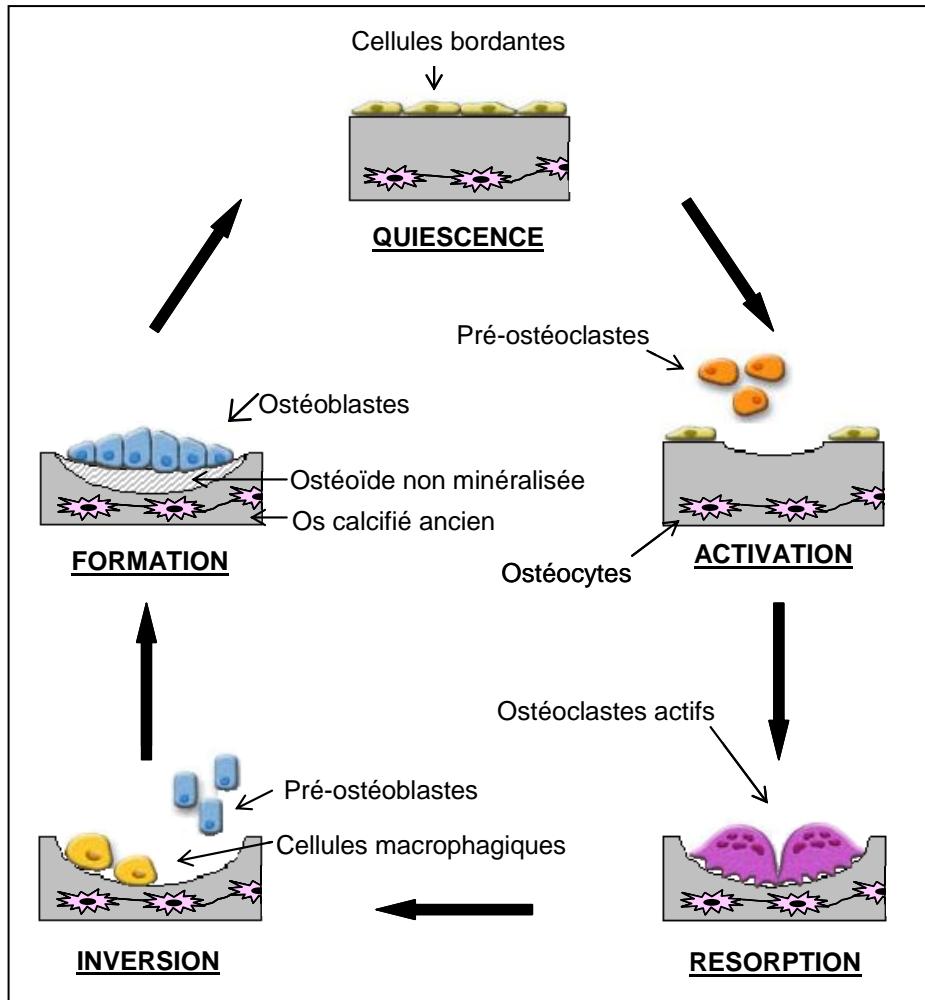
matrice ostéoïde, qu'ils minéraliseront ensuite, et qui constitue l'os primaire endochondral. Cette structure sera rapidement détruite par les ostéoclastes et, le cas échéant, remplacé par de l'os secondaire (Toppets, 2004).

#### b. Ossification secondaire

L'ossification secondaire correspond à la formation d'un tissu osseux sur un support osseux, après une phase préalable de destruction de la matrice osseuse préexistante par les ostéoclastes. Elle élabore un os plus résistant et mieux vascularisé : c'est la formation des ostéons. Elle survient principalement au niveau de la diaphyse des os longs. Au cours de ce type d'ossification, des bourgeons conjonctivo-vasculaires amenant des ostéoclastes abordent la diaphyse du côté de la cavité médullaire ainsi que du périoste. Les ostéoclastes creusent de larges canaux dans l'os lamellaire. Ces canaux sont ensuite colonisés par des cellules ostéoprogénitrices attachées à la paroi du canal et se transformant en ostéoblastes. Les ostéoblastes sécrètent de la matrice ostéoïde qui va rapidement se minéraliser. De nouvelles cellules ostéoprogénitrices se déposent sur la matrice osseuse ainsi formée, se transforment en ostéoblastes qui sécrètent à leur tour une matrice dans laquelle ils se retrouvent emmurés, et ainsi de suite jusqu'à former un ostéon. L'os haversien va entièrement se substituer à l'os lamellaire périostique (Toppets, 2004).

## **2. Le remodelage osseux**

Tout au long de la vie, l'os est le siège d'un remaniement permanent. Ce processus permet au tissu osseux de s'adapter aux différentes contraintes mécaniques, d'assurer l'homéostasie minérale et la cicatrisation des fractures. Une séquence de remodelage dure en moyenne de 4 à 6 mois et se déroule selon une chronologie bien précise : le remodelage osseux débute par une phase d'activation des ostéoclastes qui conduit à la résorption osseuse suivie d'une phase de transition qui aboutit au recrutement des cellules ostéoprogénitrices et à l'activation des ostéoblastes puis une phase d'inversion et enfin une phase de formation d'une nouvelle matrice osseuse (Hill, 1998)(figure 9). A chaque instant, environ 5% des surfaces intracorticales et 20% des surfaces trabéculaires sont le siège d'un remodelage.



*Figure 9 : Les différentes étapes du remodelage osseux.*

Phase d'activation : La séquence du remodelage débute en un point d'une surface osseuse quiescente recouverte par les cellules bordantes. Le signal qui déclenche le remodelage osseux peut être de nature mécanique (altération de l'architecture locale de l'os : fracture, prise de poids...)(Turner and Pavalko, 1998) ou hormonal (comme c'est le cas dans l'ostéoporose où une diminution du taux d'estrogènes entraîne une augmentation du nombre et de l'activité des ostéoclastes)(Pacifci, 1998). La captation de ce signal conduirait à la dégradation de la fine couche de matrice non minéralisée située sous les cellules bordantes, exposant ainsi la matrice minéralisée à l'action des ostéoclastes. En effet, à l'état quiescent, la surface de la matrice extracellulaire de l'os est recouverte par les cellules bordantes, qui empêchent l'accès de la matrice aux ostéoclastes. Ces cellules ont une activité métabolique très réduite, mais peuvent se multiplier ou se différencier à nouveau en ostéoblastes fonctionnels sous l'influence de stimuli mécaniques ou moléculaires. Lors de la phase

d'activation, sous l'action des facteurs ostéorésorbants tels que la PTH, les ostéoblastes se rétractent et laissent la place aux précurseurs mononucléés des ostéoclastes, ou pré-ostéoclastes, qui peuvent adhérer à la matrice (Toppets, 2004).

Phase de résorption : Elle débute par l'activation des précurseurs ostéoclastiques présents dans la moelle osseuse au site de remodelage et conduit à leur différenciation en ostéoclastes matures et à leur attachement à la surface osseuse. Les ostéoblastes situés à proximité des pré-ostéoclastes vont favoriser la différenciation de ceux-ci en ostéoclastes matures via la production de différentes cytokines telles que RANKL.

Les cellules ostéoclastiques vont ensuite adhérer à la surface osseuse au niveau de la zone claire avec la constitution d'une zone de scellement conduisant à la polarisation de la cellule et à la formation de la bordure en brosse. Cette adhésion est possible par la présence de membranes spécialisées, comportant des intégrines ( $\alpha 2\beta 1$  et  $\alpha V\beta 3$ ), de la taline et de la vinculine associées à des faisceaux d'actine. Une fois attachés à la matrice osseuse, les ostéoclastes créent un microenvironnement acide qui facilite la dissolution de la phase minérale de l'os, entraînant la libération de calcium et de phosphore, et favorise par différentes cascades d'activation les fonctions des enzymes protéolytiques (métalloprotéases et cathepsines) conduisant à la destruction de la matrice organique. La phase de résorption dure environ 30 jours.

Phase d'inversion : Le couplage entre résorption et formation intervient durant la phase de transition. La dégradation de la matrice entraîne une augmentation du taux de calcium intracellulaire des ostéoclastes qui va provoquer une désorganisation des podosomes et par conséquent le détachement de l'ostéoclaste. Les ostéoclastes qui se détachent de la surface osseuse meurent par apoptose vraisemblablement médiée par le système Fas/Fas ligand (Wu et al., 2003). Ces ostéoclastes sont alors remplacés par des cellules mononucléées de type macrophagique qui vont éliminer les derniers résidus de matrice présents dans le fond de la lacune. Il a été suggéré que les facteurs favorisant la formation osseuse soient intégrés dans la matrice osseuse puis relargués durant la phase de résorption. Cela concernerait en particulier les IGF, le FGF, le TGF $\beta$ , les BMP et le PDGF (platelet derived growth factor)(Sims and Gooi, 2008). La surface osseuse ainsi libérée par les ostéoclastes et correspondant au fond de la lacune de Howship est riche en éléments tels que l'ostéopontine qui activeraient les ostéoblastes. Les ostéoclastes pourraient également recruter directement

les précurseurs ostéoblastiques au site de remodelage osseux grâce à S1P et BMP6 puis stimuler la formation osseuse en activant la voie Wnt/BMP (Pederson et al., 2008).

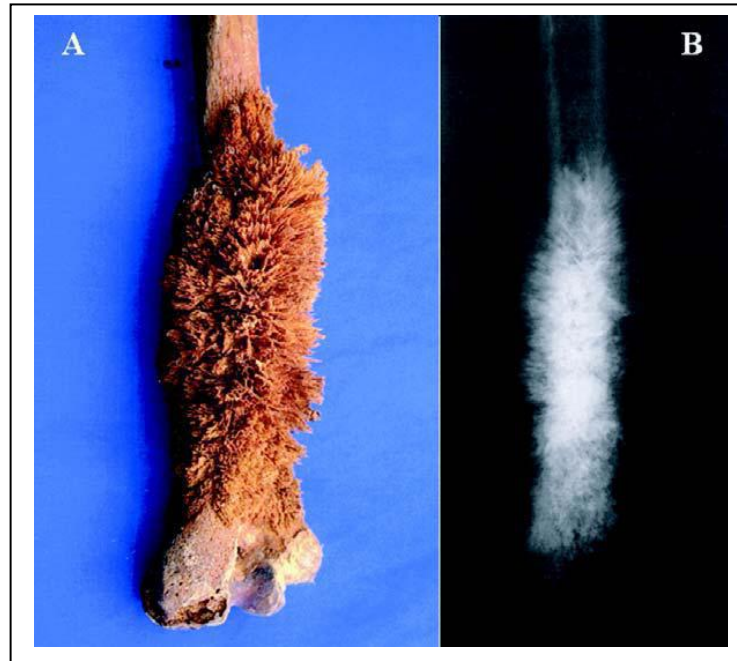
Phase de formation : Elle débute par la prolifération des cellules ostéoprogénitrices qui vont venir tapisser le fond de la lacune de Howship, au niveau de la ligne cémentante. Les ostéoblastes vont alors synthétiser les constituants de la matrice protéique osseuse. Puis, après un délai de 10 à 15 jours, le tissu ostéoïde se minéralise par l'apposition de cristaux d'hydroxyapatite dans les espaces interfibrillaires du collagène. Cette étape de minéralisation comporte une phase rapide appelée minéralisation primaire puis se poursuit plus lentement pendant une durée variable appelée minéralisation secondaire. La durée de la minéralisation secondaire est liée à la fréquence du remodelage. La phase d'ostéof ormation dure de 4 à 5 mois.

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

## **D. L'ostéosarcome : une pathologie osseuse tumorale**

Le tissu osseux est un tissu vivant en continuel remaniement grâce au processus de remodelage osseux. L'équilibre entre l'activité ostéoblastique et l'activité ostéoclastique permet le maintien de l'homéostasie phosphocalcique et de la masse osseuse au cours de la vie (Manolagas, 2000). Tout dérèglement de l'équilibre entre apposition et résorption osseuse est lié à l'apparition de pathologies ostéocondensantes (ostéopétrose, ostéosarcome) ou ostéolytiques, pouvant être tumorales (cancer du sein par exemple) ou non (ostéoporose).

Des cas d'ostéosarcomes ont été décrits sur des momies de l'Égypte ancienne datant de plus de 5000 ans (Capasso, 2005) avec la possibilité d'une intervention chirurgicale sous forme d'amputation. Un cas également bien documenté d'ostéosarcome, ayant le profil radiologique typique en « feu d'herbes », a été observé sur le fémur d'un jeune péruvien datant de 1100 après JC (figure 10).



*Figure 10 : A : Ostéosarcome du fémur chez un jeune péruvien datant de 1100 après JC (Capasso, 2005). B : profil radiologique typique en « feu d'herbes ».*

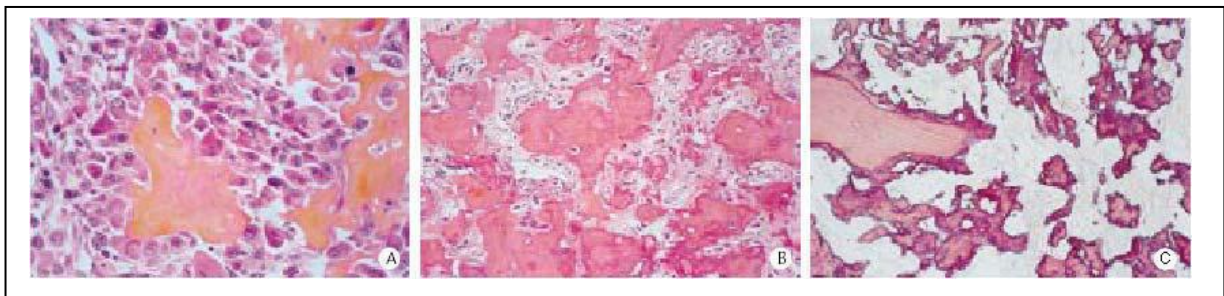
L'ostéosarcome est défini par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme une tumeur maligne caractérisée par l'élaboration d'os ou de substance ostéoïde par les cellules tumorales (Schajowicz, 1993) qui dérivent donc, de près ou de loin, de la lignée ostéoblastique. Trois groupes sont identifiés selon leur localisation : les ostéosarcomes de surface, ceux de siège intracortical et les ostéosarcomes intramédullaires ou centraux qui sont les plus fréquents. Les ostéosarcomes intracorticaux sont extrêmement rares et seules des observations isolées sont rapportées. Les ostéosarcomes développés à la surface de l'os sont généralement de bon pronostic, et les ostéosarcomes centraux regroupent différentes variantes histologiques qui, à l'exception de la forme dite «bien différenciée intramédullaire», sont toutes de haute malignité. Parmi ces variantes, on peut noter la forme commune, l'ostéosarcome télangiectasique, l'ostéosarcome à petites cellules rondes et l'ostéosarcome bien différenciée intramédullaire (Guinebretière JM, 2001) :

- La forme commune, classée par Dahlin selon le contingent cellulaire prédominant, est de loin la plus fréquente (Unni, 1996). La variante ostéoblastique représente environ 50 % des cas, les variantes chondroblastique et fibroblastique 25 % chacune.

- La fréquence de l'ostéosarcome télangiectasique varie selon les séries entre 2 et 10 % (différences liées aux critères anatomo-radiologiques retenus). Des lésions purement lytiques et expansives sur la radiographie sont à l'origine de fréquentes fractures pathologiques. Son aspect lors de la biopsie et en macroscopie est celui d'une lésion multilobée à contenu hémorragique.

- L'ostéosarcome à petites cellules rondes a un aspect radiographique hétérogène. La tumeur est constituée de petites cellules tumorales aux noyaux arrondis, au cytoplasme peu abondant et aux limites imprécises, similaire au sarcome d'Ewing.

- l'ostéosarcome bien différencié intramédullaire est caractérisé par sa localisation intramédullaire, un envahissement des parties molles absent ou limité et son aspect histologique bien différencié.



*Figure 11 : Préparations histologiques d'un ostéosarcome*

*A : Aspect typique d'un ostéosarcome, constitué d'ostéoblastes tumoraux aux anomalies cytonucléaires marquées, aux mitoses nombreuses, élaborant une substance ostéoïde formant d'épaisses travées qu'elles entourent. Coloration hémalun-éosine-safran (HES), grossissement x 400. B : Dans d'autres secteurs de la même tumeur, l'aspect diffère, associant de nombreuses travées osseuses de taille et de forme variables. Coloration HES, grossissement x 200. C : Résection après chimiothérapie d'induction. Pour ce bon répondeur, les cellules tumorales ont disparu, remplacées par un tissu fibreux hyalin et des travées osseuses de disposition irrégulière. Une travée osseuse normale résiduelle, en partie résorbée, persiste (en haut et à gauche). Coloration HES, grossissement x200. (Guinebretière JM, 2001).*



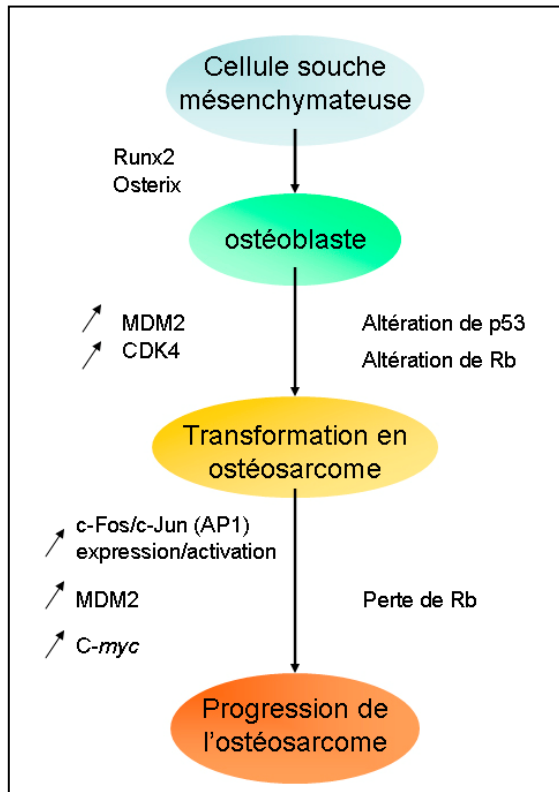
L'ostéosarcome est la plus fréquente des tumeurs malignes primitives de l'os avec une incidence annuelle d'environ 4,8 nouveaux cas par million d'enfants de moins de 20 ans aux USA (Linnet et al., 1999) et 3.6 nouveaux cas par million d'enfant de moins de 15 ans en France (Desandes et al., 2004). L'ostéosarcome survient plus généralement sur une population jeune, avec une médiane d'âge de 18 ans, et touche 1,5 à 2 fois plus fréquemment les garçons que les filles. Il est rare avant 10 ans, exceptionnel avant 5 ans, mais aussi très rare après 60 ans où il survient généralement sur terrain prédisposé.

L'âge de survenue au moment de la poussée de croissance pubertaire, la localisation souvent métaphysaire de ces tumeurs et l'incidence élevée des ostéosarcomes chez les chiens de grande taille suggèrent un lien entre la croissance osseuse et la survenue des ostéosarcomes (Guinebretière JM, 2001).

L'étiologie de l'ostéosarcome est à ce jour inconnue. Si de nombreuses théories ont été émises à partir de constatations expérimentales (origine virale, traumatique, chimique, etc.), aucune n'a été confirmée chez l'homme. Cependant, l'ostéosarcome se développe plus fréquemment chez des sujets de grande taille et à l'inverse, une plus faible incidence aurait été mise en évidence dans les populations asiatiques et latino-américaines (Guinebretière JM, 2001). L'ostéosarcome secondaire se rencontre chez l'adulte ayant préalablement développé une dysplasie fibreuse, une tumeur à cellules géantes, ou bien une maladie osseuse sous-jacente comme la maladie de Paget ou suite à une radiothérapie (Guinebretière JM, 2001). L'ostéosarcome est très rarement familial, cependant, quelques cas d'ostéosarcomes congénitaux ont été décrits (Lynch et al., 2003). Il survient dans un tableau de tumeurs multiples de différentes variétés histologiques et correspond à la présence d'un gène de prédisposition aux tumeurs (Hauben et al., 2003). On peut citer (i) le syndrome de Li-Fraumeni qui correspond à l'anomalie innée de l'un des allèles du gène p53, où l'enfant développe de multiples tumeurs aussi bien sarcomateuses (os et tissus mous) que carcinomateuses ou (ii) le rétinoblastome bilatéral, maladie caractérisée par des tumeurs oculaires bilatérales et où les ostéosarcomes s'observent 100 fois plus fréquemment que dans la population normale (Chauveinc et al., 2001).

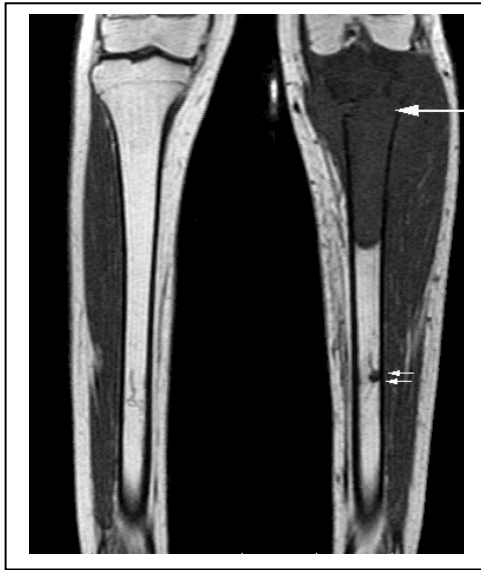
Les anomalies cytogénétiques observées dans les ostéosarcomes sont caractérisées par leur extrême fréquence et leur grande complexité (figure 12). Il n'existe pas de lésion génétique spécifique reconnue, mais une fréquente atteinte des loci des gènes p53 (environ 50% des patients)(Sandberg and Bridge, 2003) et Rb (gène du rétinoblastome)(environ 70%

des patients) a été observée (Fuchs and Pritchard, 2002; Wadayama et al., 1994). Une étude réalisée sur une cohorte réduite de 29 patients atteints d'ostéosarcome a ainsi montré que 38% d'entre eux présentent une ou plusieurs altérations génétiques touchant des molécules impliquées dans le contrôle de la transition G1-S, et donc dans l'entrée dans le cycle cellulaire (Lopez-Guerrero et al., 2004). Il s'agit principalement de mutations du gène Rb, p53, et/ou de l'amplification des gènes MDM2 (inhibiteur de p53) et CDK4 (Cycline Dependante Kinase 4, nécessaire à la transition G1-S). Une sur-expression du proto-oncogène c-myc (contrôle de la prolifération/différenciation, adhérence et apoptose)(Sandberg and Bridge, 2003) ainsi que du facteur de transcription Ap-1 (homo ou hétérodimère de c-Jun et c-Fos régulant des gènes essentiels pour la prolifération et la différenciation des ostéoblastes)(Papachristou et al., 2003) a également été observée dans des ostéosarcomes. De plus, l'analyse des caryotypes a révélé une grande complexité, avec de nombreux réarrangements chromosomiques et des variations dans le nombre de chromosomes, mais n'a conduit à l'identification d'aucune spécificité. La présence d'altérations génétiques touchant des molécules impliquées dans le contrôle de la transition G1-S a également pu être corrélée avec la survie des patients, puisque tous les patients présentant de telles altérations sont décédés durant le suivi, alors que plus de la moitié des autres patients étaient encore en vie à la fin de l'étude. De plus, un lien entre phénotype et génotype a été observé : aucune des mutations recherchées n'a été détectée dans les tumeurs de type ostéoblastique très différenciées qui sont de meilleur pronostic (Lopez-Guerrero et al., 2004). Plus récemment, une atteinte du locus du gène c-kit codant un récepteur tyrosine kinase avec un rôle central dans la régulation de la prolifération et la différenciation cellulaire, été mise en évidence dans les ostéosarcomes de haut grade. En effet, 39% des patients inclus dans cette étude présentaient une altération de ce locus en corrélation avec une sur-expression de la protéine c-kit, conduisant à un mauvais pronostic vital (Entz-Werle et al., 2005a). Une étude réalisée sur la même cohorte de patients a révélé une altération du locus du gène TWIST, impliqué dans le développement embryonnaire, dans 45,6 % des cas, se traduisant chez la majorité des patients par une délétion au niveau de ce gène. De plus, ces altérations de TWIST ont pu être corrélées à une diminution de la survie (Entz-Werle et al., 2005b).



*Figure 12 : Mécanismes moléculaires et génétiques impliqués dans le développement et la progression des ostéosarcomes.*

La principale manifestation clinique de l'ostéosarcome est la douleur au site tumoral, irradiant vers les articulations voisines. Une masse apparaît plus tardivement, sensible à la palpation et pouvant gêner la mobilité de l'articulation selon la taille. À un stade plus tardif, des signes inflammatoires cutanés et une stase veineuse sont visibles. L'ostéosarcome peut toucher tous les os mais manifeste une prédilection pour la métaphyse des os longs. Moins de 10 % surviennent à la diaphyse et les localisations épiphysaires sont encore plus rares (figure 13). Il se localise surtout au genou : extrémité inférieure du fémur (40 %) et extrémité supérieure du tibia (15 %), puis à l'extrémité supérieure du fémur et de l'humérus (14 %), sites correspondant aux segments osseux dont la croissance est la plus importante de l'organisme. Les os plats et les os courts sont plus rarement touchés. Le crâne et la face sont atteints dans moins de 10 % des cas, préférentiellement à la voûte et la base du crâne, ainsi que la mandibule. Des cas d'ostéosarcomes ont été rapportés pour tous les os du squelette, même pour les sésamoïdes (Guinebretière JM, 2001).



*Figure 13 : Ostéosarcome d'un patient âgé de 15 ans, IRM: atteinte épiphysométaphysaire du tibia (grande flèche) avec skip métastase diaphysaire (petite flèche).(IGR Villejuif)*

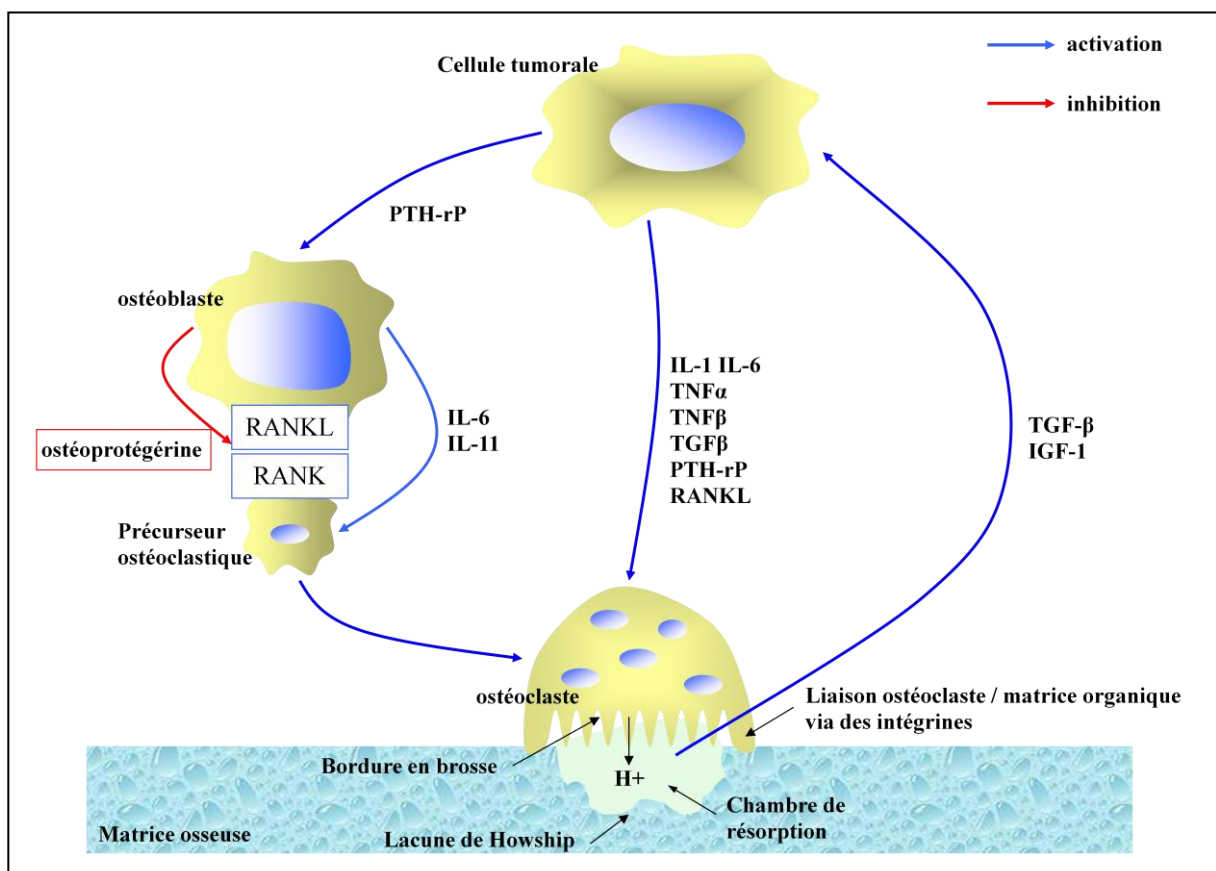
Le développement d'un ostéosarcome entraîne, comme nous l'avons vu précédemment, la formation directe d'os ou de substance ostéoïde mais également, dans un certain nombre de cas, une ostéolyse maligne (figure 14) qui résulte d'une hyperactivité ostéoclastique, consécutive à la sécrétion de cytokines d'origine tumorale, telles que l'IL-1, l'IL-6, les TNF $\alpha$  et  $\beta$ , la PTH-rP et des facteurs de croissance comme le TGF $\beta$  (Kwan Tat et al., 2004).



*Figure 14 : Ostéosarcome d'un patient âgé de 15 ans*

*Radiographies sans préparation du tibia. Ostéocondensations hétérogènes de la métaphyse et de l'épiphyse tibiale supérieure (flèches), ostéolyse corticale (tête de flèche), Ostéogenèse dans les parties molles péri-osseuses (petites flèches). (IGR Villejuif)*

L'action de ces différents facteurs est soit directe sur les ostéoclastes soit indirecte, et dans ce cas, passe par l'activation des ostéoblastes et l'augmentation de production de RANKL. La résorption osseuse libère à son tour des facteurs de croissance (TGF $\beta$  et IGF-1) piégés dans la matrice extracellulaire. Un cercle vicieux s'instaure alors entre résorption osseuse et prolifération tumorale dans lequel le TGF $\beta$  et l'IGF-1 libérés de la matrice lors de l'hyper-résorption osseuse stimulent l'activité et la prolifération des cellules tumorales, qui à leur tour produisent des facteurs, qui vont activer la résorption osseuse, directement ou via les ostéoblastes (figure 15)(Brounais et al., 2008b).



*Figure 15 : Cercle vicieux entre prolifération tumorale et hyper-résorption osseuse d'origine maligne. D'après (Brounais et al., 2008b).*

Actuellement, la survie des patients atteints d'ostéosarcome a été considérablement augmentée grâce à la polychimiothérapie, qui repose sur des cures alternées combinant différents agents pharmacologiques. Les protocoles thérapeutiques actuels correspondent à la succession d'une chimiothérapie d'induction, chirurgie et chimiothérapie adjuvante. La réduction tumorale qu'elle induit rend possible la préservation du membre au moyen de techniques de chirurgie conservatrice, tout en assurant une résection carcinologiquement satisfaisante (Philip T, 2000). La chimiothérapie postopératoire est adaptée en fonction de la qualité de la réponse histologique à la chimiothérapie préopératoire. Ce paramètre pronostique essentiel est exprimé généralement en pourcentage de cellules vivantes résiduelles au sein de la tumeur primitive, par exemple chez un bon répondeur, moins de 10% de cellules tumorales résiduelles sont retrouvées. Cette prise en charge permet aujourd'hui d'obtenir des taux de survie à 5 ans variant entre 50 et 70% selon les séries (Alapetite and Blay, 2001; Guinebretière JM, 2001). La radiothérapie, quant à elle, n'est que rarement utilisée du fait de la radiorésistance de ce type de tumeur.

L'objectif de la chimiothérapie cytotoxique administrée par voie générale est de détruire la tumeur en place mais également d'inhiber le phénomène métastatique. La majorité des tumeurs osseuses malignes sont diagnostiquées en phase localisée. La chimiothérapie en phase localisée de la maladie permet un traitement précoce de la maladie micrométastatique, qui peut être ultérieurement responsable de la rechute et du décès du patient ; une réduction de la taille de la tumeur facilitant le geste du chirurgien et par conséquent une chirurgie de conservation du membre (Alapetite and Blay, 2001). Lorsque des métastases pulmonaires surviennent d'emblée, leur traitement est identique à celui des formes localisées en matière de chimiothérapie et de chirurgie de la tumeur. Après celle-ci, une exérèse chirurgicale des lésions pulmonaires est proposée dans la mesure où elle est techniquement réalisable ; c'est la seule façon d'obtenir des rémissions à long terme dans ces formes à très mauvais pronostic, puisque le taux de survie à 5 ans n'est que de 30% lorsque des métastases pulmonaires sont détectées au moment du diagnostic.

Les quatre molécules les plus utilisées (plus de 20% de réponse en monothérapie) dans le traitement des ostéosarcomes sont le méthotrexate à haute dose, la doxorubicine, le cisplatine et l'ifosfamide (Bacci et al., 2003).

- Le méthotrexate (utilisé chez les jeunes patients) est un agent cytotoxique anti-métabolite qui agit en inhibant une enzyme-clé de la synthèse de la thymidine, la dihydrofolate réductase. Après l'injection de méthotrexate à doses élevées (supérieures à 100

mg/m<sup>2</sup>), il est nécessaire d'administrer l'antidote de ce médicament qui est l'acide folinique, afin de prévenir les principaux effets secondaires qui sont la toxicité rénale et neurologique centrale (Blackwell, 1995).

- La doxorubicine est un agent cytotoxique considéré initialement comme un agent intercalant, qui agit également en inhibant des enzymes impliquées dans le désenroulement de l'ADN, les topo-isomérase de type II. Les principaux effets secondaires immédiats de ce médicament sont la toxicité hématologique et la toxicité muqueuse, cette toxicité dépendant de la dose et du schéma d'administration (Link et al., 1986).

- Le cisplatine est un agent cytotoxique alkylant qui agit en induisant la formation de «ponts inter- et intrabrin» dans les chaînes d'ADN. Ce médicament est généralement administré sur un mode séquentiel avec une dose par cure de 80 à 120 mg/m<sup>2</sup>. Les principaux effets secondaires de ce médicament sont la toxicité hématologique, la toxicité néphrologique, une toxicité neurologique périphérique et auditive. Cette toxicité impose l'administration d'une hyperhydratation saline pendant l'administration du cisplatine (Cvitkovic E., 1993).

- L'ifosfamide est un agent cytotoxique alkylant qui agit en induisant la formation de ponts interbrins en se fixant sur le N7 des guanines. Ce médicament est généralement administré sur un mode séquentiel. Les principaux effets secondaires de ce médicament sont la toxicité hématologique, l'alopecie, la toxicité neurologique, la toxicité néphrologique et la toxicité vésicale (Cvitkovic E., 1993). Cette dernière toxicité impose l'administration conjointe de mesna, un uroprotecteur, et d'une hyperhydratation alcaline. Le cyclophosphamide a également été utilisé dans les programmes de chimiothérapie adjuvante, et de phase II pour les ostéosarcomes. Le taux de réponse en monothérapie est cependant faible et l'efficacité du protocole est discutée (Mosende et al., 1977).

Le traitement actuel, basé sur une polychimiothérapie néo-adjuvante souvent mal tolérée associée à une chirurgie conservatrice, a largement contribué à l'amélioration du taux de survie des patients dans ces dernières années. Cependant, une absence de réponse aux drogues anti-tumorales peut être observée et demeure un problème majeur conduisant au développement de métastases puis au décès du patient. De plus, les effets indésirables de la chimiothérapie comme la perte des cheveux ou la stérilité par exemple sont difficilement acceptés par les adolescents et jeunes adultes. Les hospitalisations et les interventions chirurgicales répétées (par exemple pour changement de prothèse tous les 10-15 ans) dégradent la qualité de vie du patient. C'est pourquoi, de nouvelles approches thérapeutiques sont en développement. Parmi celles-ci, l'utilisation des bisphosphonates connus pour leur

forte inhibition de la résorption osseuse est, à l'heure actuelle, une des approches les plus utilisées dans le traitement palliatif des métastases osseuses mais également envisagé dans le traitement des tumeurs osseuses primitives telles que l'ostéosarcome. En effet, un essai clinique multicentrique de phase 3 (protocole OS2006) est actuellement en cours, en collaboration avec l'institut Gustave Roussy, avec pour objectif l'association de l'acide zolédronique à des agents conventionnels de chimiothérapie utilisés dans le traitement de l'ostéosarcome chez l'enfant et l'adulte afin d'évaluer les bénéfices de cette association. Ce programme envisage l'inclusion de 470 patients sur une période de 6 ans avec un suivi de 3 ans après la dernière inclusion. L'investigateur principal est le Dr Brugières (IGR), le service d'orthopédie de Nantes ainsi que notre laboratoire sont associés à ce protocole respectivement comme centre recruteur et centre d'analyse des paramètres du remodelage osseux.

En conclusion, la découverte de nouvelles approches thérapeutiques dans l'optique de toujours améliorer l'efficacité, la survie, la qualité de vie du patient et de développer un traitement simple, non douloureux, en réduisant au maximum les effets indésirables est toujours d'actualité pour l'ostéosarcome.



## II. Généralités sur les cytokines de la famille de l'Interleukine-6

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

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

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

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

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

Les cytokines de la famille de l'Interleukine-6 (IL-6) sont aujourd'hui au nombre de dix, il s'agit de l'IL-6, l'IL-11, l'IL-27, l'IL-31, l'Oncostatine M (OSM), le leukemia inhibitory factor (LIF), le ciliary neurotrophic factor (CNTF), la cardiotrophine-1 (CT-1), la cardiotrophin-like cytokine (CLC) et la neuropoïétine (NP)(Chen and Benveniste, 2004). Toutes ces molécules ont en commun à la fois une structure protéique proche, des activités biologiques redondantes (sur l'inflammation, la réponse immunitaire, l'hématopoïèse, le développement embryonnaire etc.), mais également l'utilisation d'une chaîne réceptrice

transmembranaire commune : la gp130 (Taga, 1996), à l'exception de l'IL-31 qui utilise la gp130 like (gpl)(Dillon et al., 2004). Si le partage de cette sous-unité confère aux différentes cytokines des activités redondantes, l'utilisation d'une deuxième sous-unité spécifique associée à la gp130 permet des effets propres à chacune de ces cytokines.

Au cours de cette étude, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à deux cytokines de cette famille : l'OSM et l'IL-31. Nous avons également comparé les effets de ces deux cytokines à ceux de l'IL-6, que nous décrirons brièvement dans cette partie.

## **A. Découverte et clonage des cytokines de la famille de l'IL-6**

### **1. Découverte et clonage de l'IL-6**

En 1980, l'équipe de J. Weissenbach décrit l'IFN $\beta$ 2 comme capable de protéger des fibroblastes en culture contre une infection virale (Weissenbach et al., 1980). En 1985, une protéine nommée « B-cell stimulatory factor 2 » (BSF-2) est isolée pour sa capacité à induire la sécrétion des immunoglobulines par les lymphocytes B (Hirano et al., 1985). Le clonage et l'analyse de la séquence de la forme humaine de BSF-2 et de l'IFN $\beta$ 2, réalisés en 1986 par Hirano et ses collaborateurs (Hirano et al., 1986) et par l'équipe de A. Zilberstein (Zilberstein et al., 1986) respectivement, ont ensuite indiqués que ces deux protéines étaient identiques. Malgré les nombreux noms donnés à cette molécule en raison de ses nombreuses activités biologiques, elle est aujourd'hui connue comme l'Interleukine-6, une glycoprotéine de 21 à 28 kD.

L'IL-6 humaine code un précurseur protéique de 212 acides aminés ensuite clivé au niveau de la partie NH<sub>2</sub>-terminale pour donner une protéine de 184 acides aminés qui inclut deux sites possibles de N-glycosylations et 4 résidus cystéine. La structure secondaire de l'IL-6 est caractérisée par 4 longues hélices  $\alpha$  antiparallèles, une structure commune à toutes les cytokines de cette famille. Les gènes codant l'IL-6 humaine et l'IL-6 murine contiennent 4 exons et 4 introns et sont localisés sur le chromosome 7 et sur le chromosome 5 respectivement. La comparaison des deux séquences d'ADNc a montré 65% d'homologie au niveau de l'ADN et 42% au niveau protéique (Kishimoto, 1989; Park and Pillinger, 2007).

L'IL-6 est produite par de nombreuses cellules incluant les monocytes/macrophages, les lymphocytes T, les cellules NK, les fibroblastes, les ostéoblastes, les progéniteurs hématopoïétiques, les cellules endothéliales et certaines cellules tumorales. L'IL-6 est souvent produite sous l'effet d'autres cytokines. Ainsi, l'IL-1 et le TNF $\alpha$  induisent la production d'IL-6 par les monocytes/macrophages, les cellules endothéliales et les fibroblastes (Kishimoto, 1989).

## **2. Découverte et clonage de l'OSM**

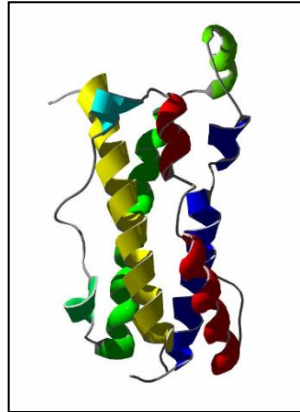
La forme humaine de l'OSM a été isolée en 1986 par l'équipe de Georges J. Todaro, à partir de surnageants de cellules U-937, une lignée monocyttaire issue d'un lymphome histiocytaire humain (Zarling et al., 1986). Ils avaient en effet observé que ces cellules, après traitement avec un ester de phorbol, le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA), se différenciaient en cellules de type macrophagique et que leur surnageant avait la capacité de ralentir la croissance des cellules de la lignée de mélanome A375. Ils ont alors isolé et caractérisé le facteur produit par ces macrophages et responsable de cette inhibition de la prolifération tumorale, identifiant une nouvelle glycoprotéine de 28 kDa: l'Oncostatine M (Zarling et al., 1986).

Le clonage et l'analyse de sa séquence réalisés en 1989 par Malik et collaborateurs ont permis de démontrer que l'ADNc de l'OSM humaine code un précurseur protéique de 252 acides aminés contenant un peptide-signal hydrophobe de 25 acides aminés à l'extrémité NH<sub>2</sub> terminale (Malik et al., 1989). Après clivage de ce peptide-signal, une forme soluble de pro-OSM de 227 acides aminés est produite. La forme active de l'OSM (196 acides aminés) sera obtenue après un second clivage de 31 acides aminés en C-terminal (Linsley et al., 1990).

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

L'OSM humaine contient 5 résidus cystéine C6, C49, C80, C127 et C167, formant deux ponts disulfure intramoléculaires : C6-C127 et C49-C167. La structure secondaire de l'OSM est, comme pour l'IL-6, caractérisée par 4 longues hélices  $\alpha$  antiparallèles (Hoffman et al., 1996) (figure 16).

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



*Figure 16 : Structure tridimensionnelle de l'OSM (Deller et al., 2000).*

Le gène codant l'OSM humaine, d'une taille de 9kb, contient 3 exons et 2 introns. Il est localisé sur le chromosome 22 en q12, à seulement 12 kb du gène codant le LIF, suggérant que ces deux gènes dérivent d'une duplication en tandem relativement récente dans l'évolution (Giovannini et al., 1993; Malik et al., 1989; Rose et al., 1993). Ils partagent de plus de nombreuses similarités de structure, au niveau de l'organisation introns/exons mais également des séquences promotrices (Rose and Bruce, 1991).

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

### 3. Découverte et clonage de l'IL-31

L'IL-31 est une cytokine récemment identifiée par Dillon et ses collaborateurs (Dillon et al., 2004). Dans un premier temps, la chaîne réceptrice IL31RA ou gpl a été découverte, par analyse bioinformatique, par trois groupes indépendants (Dillon et al., 2004; Diveu et al., 2003; Ghilardi et al., 2002) . Dillon et ses collaborateurs ont alors mis au point des lignées cellulaires BaF3 (lignée de cellules pro-B de souris) exprimant gpl humain seul ou en association avec gp130, IL-12R $\beta$ 1, IL-12R $\beta$ 2, IL-27RA, IL-23R ou OSMR. Puis, ils ont testé l'effet de cytokines connues et de milieux conditionnés de cellules activées ou non sur la prolifération de chaque lignée cellulaire. Ils ont ainsi pu mettre en évidence que seules les cellules exprimant gpl et OSMR étaient capables de proliférer en réponse aux milieux conditionnés provenant de cellules T périphériques humaines activées ou de la lignée de cellules T activées CCRFCEM. Ils ont ainsi identifié le facteur soluble responsable de cet effet qu'ils ont nommé IL-31.

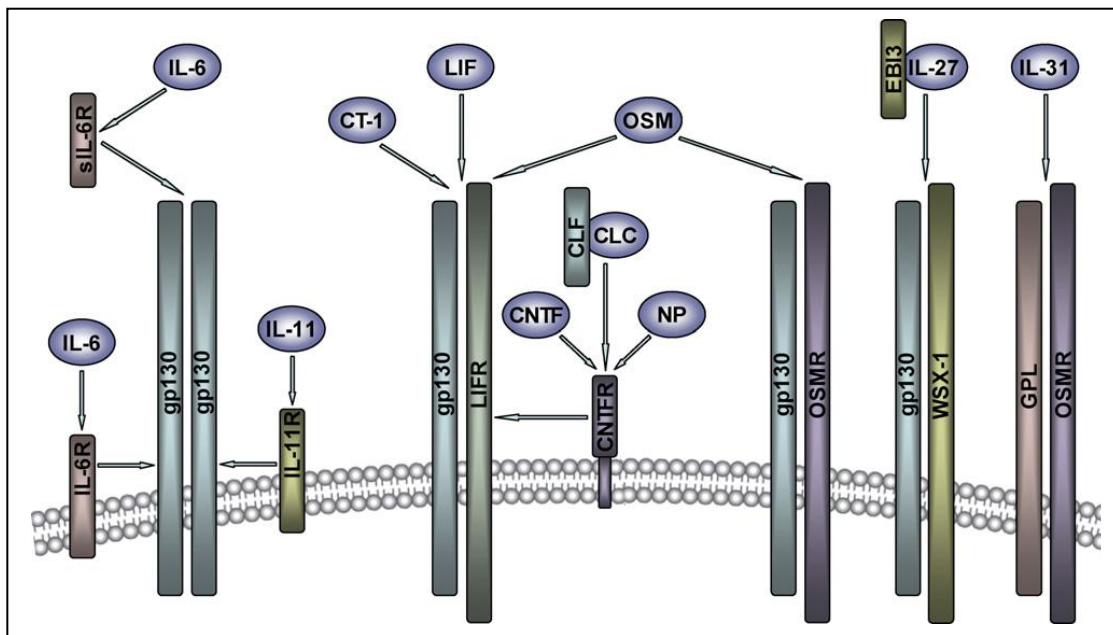
Ils ont ensuite démontré que l'ADNc de l'IL-31 humaine code un précurseur protéique de 164 acides aminés alors que la protéine mature compte 141 acides aminés et présente une structure secondaire en quatre hélices  $\alpha$ . Cette protéine a une masse moléculaire de 24kDa.

Le gène codant l'IL-31 humaine est constitué de trois exons et localisé sur le chromosome 12 en q24.31. Le gène codant l'IL-31 de souris a également été mis en évidence et est localisé sur le chromosome 5. Les formes humaine et murine ne présentent que 31% d'identité, excluant une réactivité entre les espèces (Dillon et al., 2004).

L'IL-31 est principalement produite par les lymphocytes T helper de type 2. Cependant, l'ARNm de l'IL-31 a également pu être mis en évidence, par PCR quantitative, dans les testicules, la moelle osseuse, le muscle squelettique, le rein, le colon, le thymus, l'intestin grêle et la trachée (Zhang et al., 2008).

## B. Les récepteurs des cytokines de la famille de l'IL-6

La conséquence principale d'une stimulation cytokinique est la régulation (induction ou répression) de l'expression de gènes. Les deux étapes majeures conduisant à ces effets sont tout d'abord la fixation de la cytokine à son récepteur à la surface de la cellule cible, puis l'activation d'une cascade de signalisation allant de la membrane plasmique au noyau cellulaire. De manière générale, les cytokines de la famille de l'IL-6 initient leur signalisation intra-cellulaire en se fixant à une sous-unité plus ou moins spécifique, et forment ensuite un complexe actif en s'associant avec la sous-unité réceptrice responsable de la transduction du signal et commune à cette famille de cytokines : la gp130 (Kishimoto et al., 1992)(figure 17). Cette glycoprotéine, dont le gène est localisé sur le chromosome 5 chez l'homme, a une masse moléculaire de 130 kD. Sa partie extracellulaire comporte, en N-terminal, un domaine « Ig-like » suivi d'un domaine CBD (cytokine binding domain) et de trois domaines FnIII (Fibronectin type III) dans la région proximale de la membrane plasmique. La région intracellulaire est impliquée dans la transduction du signal et contient des motifs fonctionnels conservés (Heinrich et al., 2003).



*Figure 17 : Récepteurs utilisés par les cytokines de la famille de l'IL-6 (Blanchard et al., 2009; Heinrich et al., 2003).*

## 1. Le récepteur à l'IL-6

Afin d'exercer ses activités biologiques, l'IL-6 se fixe sur la chaîne IL-6R, une glycoprotéine de 80 kD encore appelée gp80, puis induit la dimérisation de la gp130 (Heinrich et al., 2003; Yamasaki et al., 1988). La partie extracellulaire de l'IL-6R comporte, en N-terminal, un domaine « Ig-like » puis un domaine CBD et trois domaines FnIII. Le domaine transmembranaire est suivi d'une courte région intracellulaire de 82 acides aminés. Cette région intracellulaire n'est pas nécessaire à la transduction du signal induit par l'IL-6, puisqu'il existe une forme soluble du récepteur, nommé sIL-6R, capable de remplacer la chaîne membranaire (Taga et al., 1989). Cette forme soluble naturelle de l'IL-6R, obtenue par épissage alternatif du transcrit ou par clivage protéolytique de la chaîne membranaire, fixe l'IL-6 avec la même affinité que la forme membranaire. Ce complexe IL-6 / sIL-6R est capable d'induire une signalisation dans des cellules exprimant uniquement la chaîne réceptrice gp130 : ce phénomène est appelé « trans-signalisation » (Peters et al., 1998b).

Alors que la sous-unité gp130 est exprimée de façon ubiquitaire, la chaîne IL-6R est retrouvée essentiellement au niveau des lymphocytes, des monocytes et des hépatocytes ainsi que de nombreuses lignées tumorales issues par exemple de myélome, de plasmocytome ou de glioblastome (Kishimoto, 1989).

## 2. Le récepteur à l'OSM

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

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

Le récepteur de type I est utilisé également par le CNTF, la CT-1, la CLC, et bien sûr par le LIF (figure 17). Chez l'homme, l'OSM est donc capable de transduire des signaux à la fois via son récepteur spécifique (type II), mais également via le récepteur au LIF (type I). L'utilisation d'un même récepteur explique en partie que ces deux cytokines aient de

nombreux effets similaires, alors que le récepteur de type II, utilisé de façon exclusive par l'OSM, est responsable des activités spécifiques de cette cytokine (Grant and Begley, 1999).

Cloné en 1996 par Mosley et collaborateurs (Mosley et al., 1996), l'OSMR présente une structure très proche de celle de la gp130 et du LIFR, avec 23,3% et 32,2% d'homologie respectivement. La principale différence structurelle entre le LIFR et l'OSMR est la présence d'un module supplémentaire dans le LIFR contenant des cystéines conservées et situé en N-terminal (figure 18).

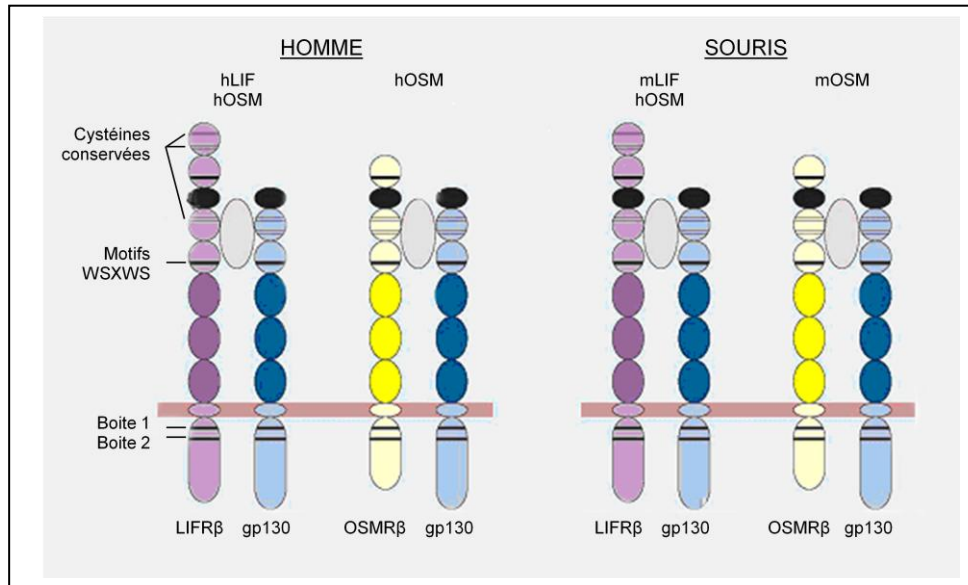
L'OSMR présente, en N-terminal, un domaine CBD tronqué, suivi d'un domaine « Ig-like », puis d'un domaine CBD complet et de trois domaines FnIII. Le domaine intracellulaire contient des motifs fonctionnels conservés.

Alors que la sous-unité gp130 est exprimée de façon ubiquitaire, la chaîne OSMR a une distribution plus restreinte. On la retrouve dans le tissu nerveux, les fibroblastes, les cellules épithéliales, certaines cellules de la moelle osseuse, et de nombreuses cellules tumorales (Mosley et al., 1996), ainsi que dans la trachée, le thymus et la peau (Dillon et al., 2004).

Il existe néanmoins des différences entre les espèces. En effet, chez la souris, l'OSM murine ne peut transduire un signal que via son récepteur propre, formé d'un hétérodimère gp130 murine / OSMR murine. Elle est incapable de se fixer au récepteur au LIF murin (mgp130/mLIFR) ou au récepteur humain de type I ou II. En revanche, l'OSM humaine peut activer le récepteur au mLIF (mgp130/mLIFR) mais pas au mOSM (mgp130/mOSMR) (Lindberg et al., 1998; Richards et al., 1997)(figure 18).

Les effets observés après stimulation par l'OSM humaine chez la souris -comme l'induction du développement de cellules lymphocytaires T- peuvent donc être attribués à l'activation du récepteur au LIF et non du récepteur à l'OSM (Grant and Begley, 1999).





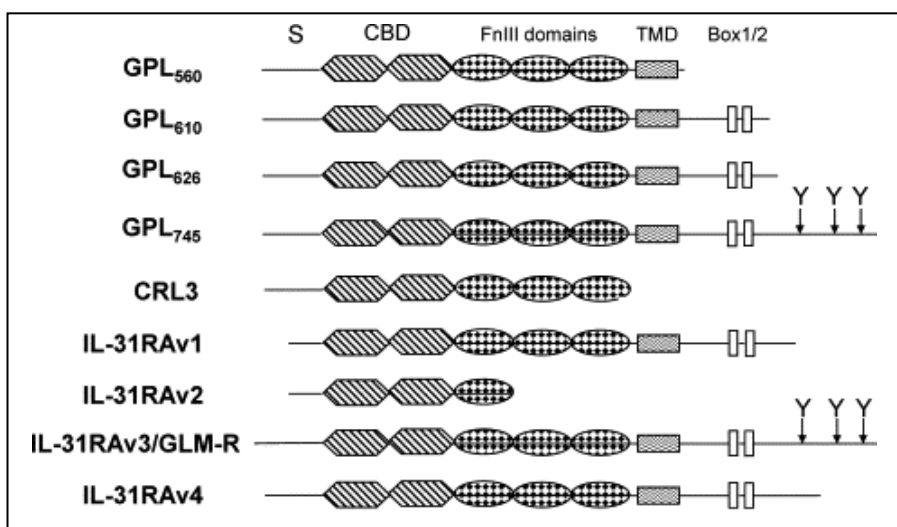
*Figure 18 : Représentation des récepteurs à l'OSM et au LIF chez l'homme et la souris. L'OSM humaine se fixe à deux récepteurs de haute affinité: le récepteur de type I (hgp130+hLIFR), et le récepteur de type II (hgp130+hOSMR). L'OSM murine ne peut se fixer qu'à son récepteur spécifique (mgp130+mOSMR). Par contre, l'OSM humaine, qui ne se fixe pas au récepteur à l'OSM murine, est capable de transduire un signal via le récepteur au LIF murin. D'après (Grant and Begley, 1999).*

### 3. Le récepteur à l'IL-31

Le récepteur de haute affinité pour l'IL-31 est composé de la sous-unité gpl associée à la sous-unité OSMR (figure 17). La chaîne réceptrice gpl partage 28,5% d'identité avec gp130 et le gène codant gpl humain est localisé sur le chromosome 5 en q11.2 à seulement 24kb du gène codant gp130 (Diveu et al., 2003).

La chaîne réceptrice gpl existe sous neuf isoformes chez l'homme : GPL<sub>560</sub>, GPL<sub>610</sub>, GPL<sub>626</sub>, GPL<sub>745</sub> formés respectivement de 560, 610, 626 et 745 acides aminés (Diveu et al., 2003), CRL3, forme soluble de gpl de 509 acides aminés, IL-31RAv1, IL-31RAv2, IL-31RAv3/GLM-R et IL-31RAv4 formés respectivement de 649, 324, 764 et 662 acides aminés (Dillon et al., 2004). Les formes les plus longues de gpl possèdent dans leur partie extracellulaire un peptide signal de longueur variable, un domaine CBD contenant 4 cystéines en positions conservées et un motif WSDWS, puis trois domaines FnIII. Par contre, gpl est

dépourvu de domaine « Ig-like ». Le domaine transmembranaire est suivi d'un domaine intracellulaire contenant les boîtes 1 et 2 de liaison aux JAKs, une région riche en prolines et des résidus tyrosine potentiellement importants pour la fixation des molécules de signalisation (figure 19). Seuls IL-31RAv3/GLM-R, IL-31RAv4 et GPL<sub>745</sub> peuvent transduire un signal intracellulaire (Zhang et al., 2008).



*Figure 19 : Isoformes humaines de gpl.*

*S : signal peptide ; CBD : cytokine binding domain ; FnIII : fibronectin type III; TMD : transmembrane domain ; box1/2 : boîtes 1 et 2 ; Y : tyrosines intra-cytoplasmiques potentiellement impliquées dans la signalisation (Zhang et al., 2008).*

L'ARNm de la sous-unité gpl humaine a été détecté, de façon constitutive, au niveau de la peau, du cerveau, des poumons, de la trachée, du muscle squelettique, des tissus liés à la reproduction (testicules, ovaires, prostate, placenta), de la rate, du thymus, de la moelle osseuse et des leucocytes. Certaines lignées cellulaires humaines telles que les lignées GO-G-UVM et U87MG dérivées de la glie, la lignée A375 issue de mélanome ou les lignées myélo-monocytaires U937 et THP-1 expriment également gpl (Zhang et al., 2008). De plus, bien qu'indétectable dans les monocytes frais issus du sang périphérique, l'ARNm humain gpl est augmenté dans ces cellules lorsqu'elles sont cultivées en présence d'IFN $\gamma$ . De même, l'expression de la chaîne OSMR peut être induite dans les monocytes après traitement aux lipopolysaccharides (LPS)(Dillon et al., 2004).

Chez la souris, les transcrits gpl ont été détectés au niveau de la peau, des testicules, de la moelle osseuse et du thymus. Les monocytes, les cellules de la ligne myéloïde et la rate ne semblent pas exprimer gpl même après stimulation (Dillon et al., 2004).

### **C. Les voies de signalisation activées par les cytokines de la famille de l'IL-6**

La fixation des cytokines de la famille de l'IL-6 sur leur récepteur va induire la phosphorylation rapide et transitoire de résidus tyrosine conservés dans le domaine intracellulaire à l'extrémité C-terminale des chaînes réceptrices. Mais contrairement à d'autres types de récepteurs, comme les récepteurs aux facteurs de croissance, les récepteurs aux cytokines de la famille de l'IL-6 ne possèdent pas d'activité tyrosine kinase intrinsèque (Darnell, 1997). Pour initier leur signalisation, ces cytokines utilisent des tyrosine kinases constitutivement associées à leur récepteur : les JAKs. Ces kinases sont associées à la partie cytoplasmique des récepteurs, au niveau de deux motifs conservés : la boîte 1, région riche en prolines, et la boîte 2 caractérisée par une suite d'acides aminés hydrophobes suivis d'acides aminés chargés positivement (figure 18). L'importance de ces deux motifs a été démontré par le fait que la délétion de la boîte 1 ou la mutation de seulement deux résidus proline de cette boîte 1 empêche totalement l'association JAK-récepteur et la transduction du signal (Murakami et al., 1991). De même, la région comprise entre les boîtes 1 et 2 est essentielle, puisque la mutation d'un acide aminé (Trp 666 dans la chaîne gp130) annule la liaison avec les JAKs et conduit à l'inactivation du récepteur (Haan et al., 2000). La liaison des cytokines de la famille de l'IL-6 à leur récepteur entraîne le rapprochement des sous-unités le constituant et donc des JAKs associées. Elles sont alors activées par phosphorylation, puis vont à leur tour phosphoryler des résidus tyrosine situés dans le domaine intra-cytoplasmique du récepteur au niveau de la boîte 3, créant ainsi des sites d'ancrage pour de nombreuses molécules contenant un domaine SH2 (Src homology 2) (Figure 19).

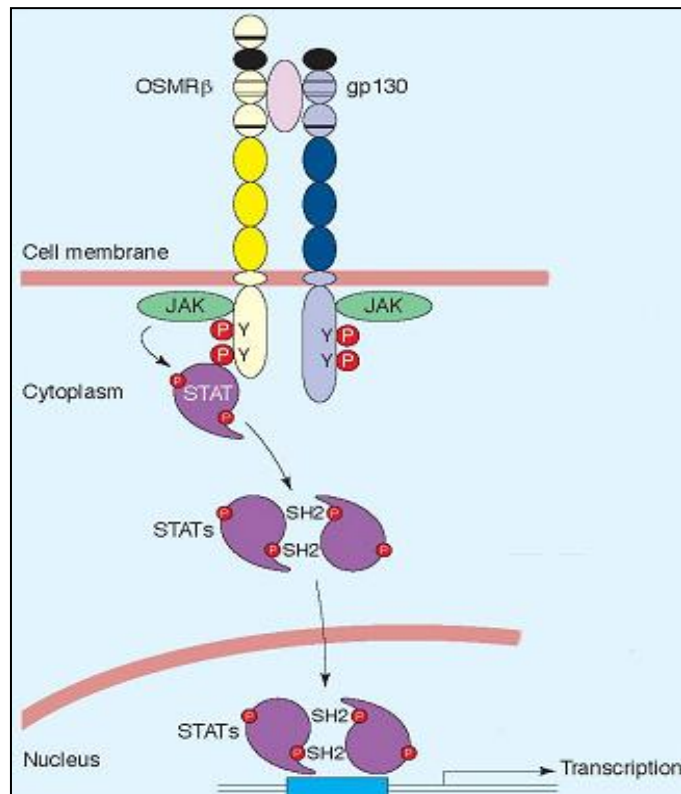
L'IL-6 et l'OSM induisent préférentiellement l'activation de la kinase JAK1, mais également de JAK2 et Tyk2 (Auguste et al., 1997; Guschin et al., 1995; Heinrich et al., 1998; Narazaki et al., 1994; Stahl et al., 1995) alors que seules JAK1 et JAK2 dans une moindre mesure ont été identifiées comme étant recrutées par gpl (Diveu et al., 2004; Dreuw et al., 2004).

## 1. La voie des « Signal Transducer and Activator of Transcription » (STAT)

Une des voies majeures activées par les cytokines de la famille de l'IL-6 est la voie des STATs. C'est une famille de facteurs de transcription composée de sept membres : STAT 1, 2, 3, 4, 5a, 5b et 6. Avant la stimulation cytokinique, ces molécules se trouvent le plus souvent dans le cytoplasme sous forme de monomères inactifs. L'existence de complexes multimériques préformés de molécules STATs, dont le rôle reste encore à déterminer, a cependant été démontrée (Haan et al., 2000; Ndubuisi et al., 1999). Les STATs, qui possèdent un domaine SH2, sont recrutés au niveau du récepteur activé, puis, à leur tour, phosphorylés par les kinases JAKs présentes à proximité. Cette phosphorylation entraîne un changement de conformation qui permet de libérer les STATs du récepteur. Ces protéines vont ensuite former des homo- ou hétérodimères par fixation du domaine SH2 d'un STAT sur la tyrosine phosphorylée de l'autre STAT et réciproquement. Ces dimères vont alors être relocalisés dans le noyau cellulaire de façon active grâce à un signal de localisation nucléaire, se lier à l'ADN et réguler l'expression de gènes cibles (figure 20)(Grant and Begley, 1999).

Après fixation sur le récepteur, les STATs peuvent également être phosphorylés plus tardivement sur des résidus sérine. La nature des sérine kinases impliquées (MAPK, PKC...) dépend du contexte cellulaire ainsi que de la voie de signalisation activée. De plus, cette phosphorylation tardive permet de réguler, au moins partiellement, l'activité du domaine de transactivation des STATs (Zhang et al., 1995).

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



*Figure 20 : Activation de la voie JAK-STAT par l'OSM (Grant and Begley, 1999).*

Les cytokines de la famille de l'IL-6 peuvent activer principalement trois membres de la famille des STATs :

- STAT1, phosphorylé sur la Tyr701
- STAT3, phosphorylé sur la Tyr705
- STAT5b phosphorylé sur la Tyr694

Concernant l'OSM, STAT1 et STAT3 sont activés rapidement par les récepteurs de type I et de type II. Par contre, il a été suggéré que STAT5b est activé de façon spécifique par le récepteur de type II et ne peut donc pas être activé par le LIF. Cette spécificité de l'OSM a pu être mise en évidence par Auguste et collaborateurs en 1997 grâce à l'utilisation de cellules exprimant uniquement le récepteur de type I (cellules JAR issues d'une lignée de choriocarcinome) ou le récepteur de type II (cellules A375 issues d'une lignée de mélanome)(Auguste et al., 1997). Elle a été confirmée ultérieurement par l'équipe de P. Heinrich (Hintzen et al., 2008).

Après stimulation par l'IL31, trois membres de la famille des STATs peuvent être activés : STAT3, STAT5 et dans une moindre mesure STAT1. Plus particulièrement, STAT3

est recruté au niveau de la phospho-Tyr721 de gp130 alors que le recrutement et l'activation de STAT5 sont dépendants de la phospho-Tyr652. L'activation des STATs est également médiée par la sous-unité OSMR et la contribution des deux sous-unités est nécessaire pour obtenir un taux d'activation des STATs maximum (Dreuw et al., 2004).

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

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

## **2. La voie des « Mitogen Activated Protein Kinase » (MAPK)**

Outre la voie des STATs, la fixation des cytokines de la famille de l'IL-6 sur leur récepteur conduit à l'activation d'une autre grande voie de signalisation : la voie des MAPKs. La cascade moléculaire utilisée par l'OSM dans cette voie est différente de celle activée par l'IL-6 ou le LIF. Dans le cas de la gp130 et du LIFR, une protéine contenant un domaine SH2, la SHP-2 (SH2-domain-containing tyrosine phosphatase), est recrutée au niveau de la phospho-Tyr759 ou de la phospho-Tyr974 respectivement (Stahl et al., 1995). Activée, elle va à son tour recruter et activer d'autres molécules, telles que le complexe Grb2/SOS (growth-factor-receptor-bound protein / Son of Sevenless), conduisant à l'activation de Ras. Cependant, contrairement à gp130 et à LIFR, l'OSMR est capable de fixer la protéine adaptatrice Shc (SH2 and collagen-homology-domain containing protein) via la phospho-Tyr861 (Hermanns et al., 2000). Il s'ensuit le recrutement et l'activation en cascade des molécules Grb2, SOS, Ras, Raf et MAPK de façon plus importante qu'après le recrutement

de SHP-2 sur la gp130 ou le LIFR (Hermanns et al., 2000). Les MAPK migrent ensuite dans le noyau et, par l'intermédiaire de facteurs de transcription, peuvent réguler la transcription de différents gènes (figure 21).

Des études ont montré que la stimulation par l'IL-31 d'une lignée cellulaire de glioblastome exprimant gp1 et OSMR induit une augmentation rapide de la phosphorylation des MAPK et en particulier de Erk 1/2 (Extra-cellular Regulated Kinase)(Diveu et al., 2004). Cependant, l'expression de la sous-unité gp1 seule ou de la sous-unité OSMR seule ne permet pas l'activation de Erk 1/2. Dans cette voie de signalisation, gp1 ne jouerait un rôle que dans la fixation de l'IL-31 et le recrutement de la sous-unité OSMR. En effet, seule OSMR semble être impliquée dans l'activation des MAPK (Dreuw et al., 2004).

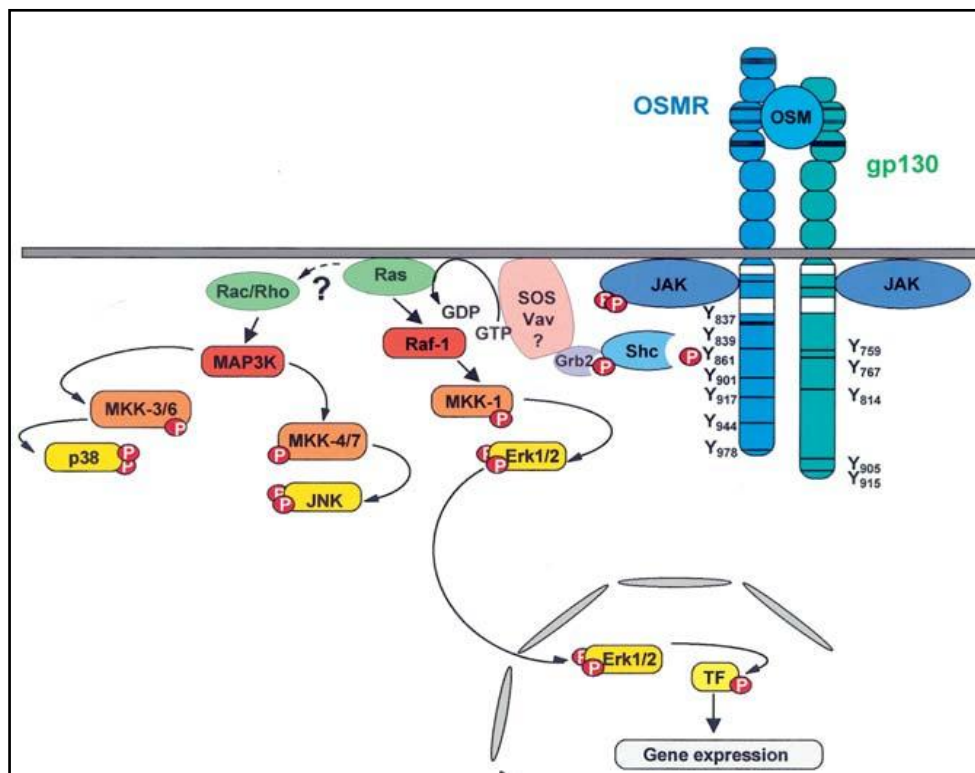


Figure 21 : Activation de la voie des MAPKs par l'OSM (Heinrich et al., 2003).

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

### **3. La voie de la « Phosphatidylinositol-3 kinase» (PI3K)**

Une troisième voie activée par les cytokines de la famille de l'IL-6 est celle de la PI3K. Le mécanisme moléculaire conduisant à l'activation de cette enzyme par la gp130 demeure mal connu. Il a cependant été montré qu'après stimulation par l'IL-6, la protéine adaptatrice Gab1 interagit avec la PI3K (Takahashi-Tezuka et al., 1998), alors qu'en réponse à l'OSM, la PI3K s'associe avec IRS-1 (insulin receptor substrate-1)(Burfoot et al., 1997). Cette enzyme est capable de phosphoryler des lipides membranaires qui vont jouer le rôle de seconds messagers. La sérine thréonine kinase Akt, est alors recrutée au niveau de la membrane plasmique où elle est activée par phosphorylation par une seconde kinase, PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase-1). Les substrats de la kinase Akt sont nombreux, avec notamment la molécule pro-apoptotique Bad (Bcl-2/Bcl-xl-antagonist, causing cell death), qui après phosphorylation par Akt est rendue inactive (Datta et al., 1997). La voie PI3K /Akt est alors associée avec la survie cellulaire et la prolifération. De même, l'activation du complexe gp130/OSMR par l'IL-31 induit la phosphorylation, faible mais significative, de la PI3K ainsi que celle d'Akt (Diveu et al., 2004).

### **4. La voie de la « protéine kinase C delta » (PKC $\delta$ )**

Parmi les molécules activées par les cytokines de type IL-6, on trouve également un membre de la famille des protéines kinases C : la protéine kinase C delta (PKC $\delta$ ). L'IL-6, comme l'OSM, induit la phosphorylation de la PKC $\delta$  sur la Thr505 (Schuringa et al., 2001). Ainsi activée, cette kinase est capable de s'associer avec le facteur de transcription STAT3 et le phosphoryle à son tour sur la Ser727, amplifiant alors son activité transcriptionnelle (Jain et al., 1999). De plus, le recrutement du complexe PKC $\delta$ -STAT3 au niveau de la sous-unité gp130 semble réguler à la fois l'activité du récepteur mais aussi de ces deux protéines (Novotny-Diermayr et al., 2002). La cascade moléculaire conduisant à l'activation de la PKC $\delta$  par l'IL-6 a été étudiée par Schuringa et collaborateurs (Schuringa et al., 2000), identifiant les protéines Rac-1, Sek (SAPK/Erk kinase 1) et MKK4 (MAP kinase kinase 4) en amont de PKC $\delta$ . Une autre voie classiquement décrite dans l'activation de la PKC $\delta$  implique la phospholipase C gamma (PLC $\gamma$ ), protéine capable de cliver le phosphatidyl inositol di-phosphate (PIP2), générant di-acyl-glycérol (DAG) et inositol tri-phosphate (IP3). Cette cascade moléculaire a notamment été décrite dans le cadre de l'IL-1  $\beta$  (Amin et al., 2003), pour laquelle elle est nécessaire à l'activation des voies Erk 1/2 et Akt. La PI3K semble quant



à elle nécessaire à l'activation de la PKC $\delta$  par l'OSM (Smyth et al., 2006). Impliquée dans de nombreux processus cellulaires, comme la prolifération ou l'apoptose, le rôle précis de la PKC $\delta$  reste néanmoins mal connu et semble dépendre du contexte physiologique, se révélant anti- ou pro-apoptotique selon le type cellulaire et le stimulus appliqué (Brodie and Blumberg, 2003).

## **5. La régulation négative de la signalisation intracellulaire**

Afin d'éviter une stimulation excessive, l'activation de toutes ces voies de signalisation est transitoire, et de nombreux mécanismes interviennent dans l'arrêt du signal. Parmi eux, on peut citer l'action de phosphatases, telles que SHP-2 (Src homology 2-containing tyrosine phosphatase), capables de déphosphoryler et donc d'inactiver le récepteur lui-même, les molécules JAKs ou les STATs (Heinrich et al., 2003). Il existe également un mécanisme de rétro-contrôle négatif impliquant les protéines SOCS (Suppressors Of Cytokine Signalling)(Starr et al., 1997). L'expression de ces molécules est induite par la cytokine elle-même via la voie JAK-STAT, comme c'est le cas pour CIS, SOCS1 et SOCS3 après stimulation par l'OSM (Blanchard et al., 2001). Les protéines SOCS empêchent la phosphorylation des STATs et la transduction du signal qui en découle. Pour cela, elles vont interagir avec le domaine catalytique des JAKs afin d'inhiber leur activité kinase (Yasukawa et al., 1999). Elles peuvent se lier directement aux JAKs avec une forte affinité, comme c'est le cas pour SOCS1 (Naka et al., 1997), ou interagir avec la sous-unité réceptrice gp130 et former un complexe avec les JAKs, comme dans le cas de SOCS3 (Nicholson et al., 2000). Enfin, la famille des PIAS (Protein Inhibitory of Activated STATs), qui compte quatre membres, intervient dans la régulation de la signalisation des STATs. Ces protéines interagissent uniquement avec les dimères de STATs, et pas avec les monomères, formés après leur phosphorylation par les protéines JAKs. Chaque membre de la famille PIAS régule négativement l'activité des STATs auxquels il se lie. Par exemple, PIAS1 et PIAS3 interagissent avec STAT1 et STAT3 respectivement et inhibe leur activité transcriptionnelle (Chung et al., 1997; Liu et al., 1998a).

## **D. Les effets biologiques des cytokines de la famille de l'IL-6**

### **1. Les effets biologiques de l'IL-6**

Les cytokines de la famille de l'IL-6 sont impliquées dans un grand nombre d'activités biologiques aussi variées que l'inflammation, le remodelage de la matrice extra-cellulaire, l'hématopoïèse ou la régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaire. Etant donné que nous n'avons utilisé l'IL-6 que comme contrôle positif et que nous n'avons pas cherché de nouvelles données concernant cette cytokine, seule une description rapide de ses fonctions biologiques sera faite dans cette partie (figure 22).

#### **a. Effets sur le système immunitaire**

L'IL-6 a été initialement identifiée par sa capacité à induire la différenciation terminale des lymphocytes B en cellules sécrétrices d'immunoglobulines (Hirano et al., 1985). Cet effet de l'IL-6 a ensuite été confirmé *in vivo* puisque son absence chez la souris entraîne une déficience de la réponse immunitaire humorale (Kopf et al., 1994). Outre ces effets sur les lymphocytes B, l'IL-6 agit sur les lymphocytes T qui expriment le récepteur à l'IL-6 lorsqu'ils sont activés mais également au repos. L'IL-6 stimule la prolifération des thymocytes et des lymphocytes T, en relation avec l'induction de l'expression du récepteur à l'IL-2 (Noma et al., 1987) et la production d'IL-2 (Garman et al., 1987) par ces cellules. Elle agit également, en synergie avec l'IL-2, pour induire la différenciation des thymocytes et des lymphocytes T en lymphocytes T cytotoxiques (Takai et al., 1988). Plus récemment, il a été montré que l'IL-6 joue également un rôle important dans la différenciation des lymphocytes Th17 (Veldhoen et al., 2006).

#### **b. Effets sur l'hématopoïèse**

L'IL-6 agit en synergie avec l'IL-3 pour induire la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques multipotents. En effet, elle stimule le passage des cellules souches hématopoïétiques de la phase G<sub>0</sub> à la phase G<sub>1</sub> du cycle cellulaire (Ikebuchi et al., 1987). *In vitro*, l'IL-6 est également impliquée dans la différenciation des macrophages et des mégacaryocytes (Kishimoto, 2006).

#### c. Effets sur le système nerveux central

Cette cytokine est active sur l'axe hypothalamo-hypophysaire puisqu'elle stimule la production d'ACTH (adreno corticotropie hormone) par l'hypophyse via l'induction de CRH (corticotropin-releasing hormone) par l'hypothalamus (Naitoh et al., 1988).

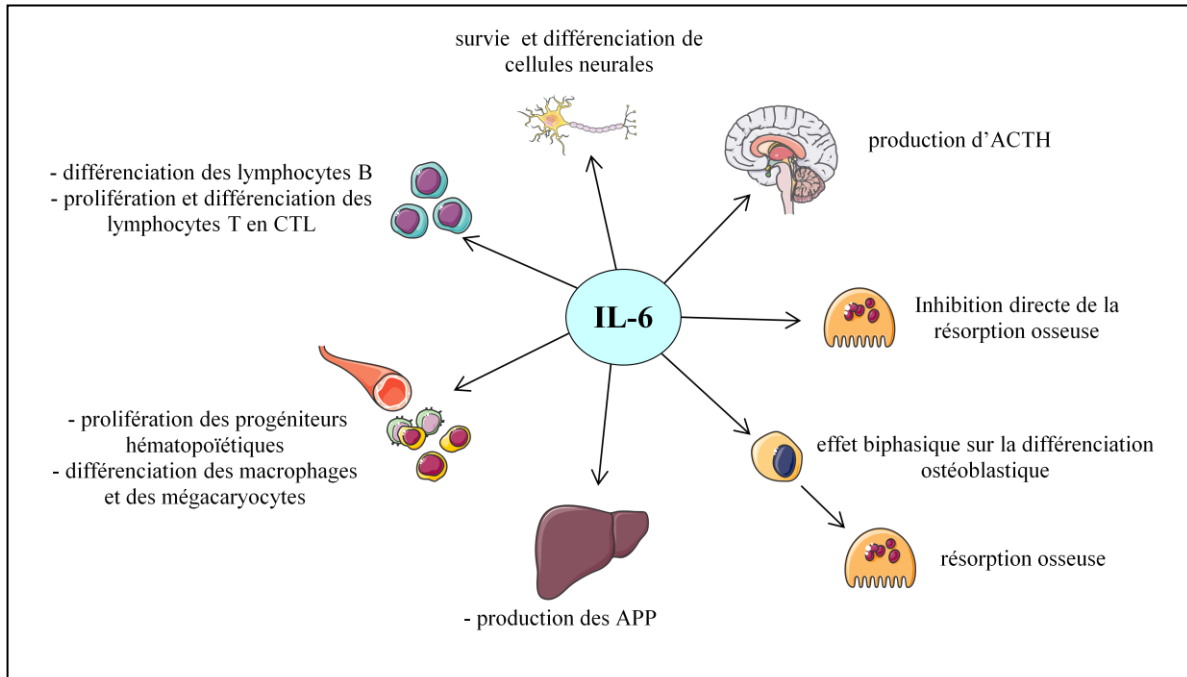
L'IL-6 induit la différenciation de neuroblastomes *in vivo* (Munoz-Fernandez et al., 1994) et favorise le survie et la prolifération des glioblastomes (Goswami et al., 1998).

#### d. Effets sur l'inflammation

L'IL-6 est une cytokine inflammatoire essentiellement libérée en réponse aux infections qui joue un rôle important dans la production des protéines de la phase aigüe de l'inflammation. En effet, une inflammation aiguë est associée à la libération rapide par le foie de plusieurs protéines plasmatiques appelées protéines de la phase aigüe de l'inflammation (APPs pour acute phase plasma proteins). Plus particulièrement, l'IL-6 augmente la synthèse de l' $\alpha$ 1 anti-chymotrypsine, de la CRP (c-reactive protein) qui augmente le taux de phagocytose des bactéries, de la SA (serum amyloid A) ainsi que du fibrinogène qui favorise la réparation tissulaire et de l'haptoglobine, protéine de transport de l'hémoglobine. Des souris déficientes pour l'IL-6 montrent en effet une production réduite des APPs (Kopf et al., 1994).

La production d'IL-6 a pu être corrélée à de nombreuses pathologies inflammatoires telles que l'arthrite rhumatoïde, l'ostéoporose ou le psoriasis. Ainsi, les patients atteints d'arthrite rhumatoïde présentent un taux élevé d'IL-6 au niveau de la synovie et du sérum, en corrélation avec la sévérité de la maladie (Houssiau et al., 1988; Madhok et al., 1993). De plus, l'IL-6 est nécessaire à l'induction expérimentale de maladies auto-immunes telles que l'encéphalomyélite allergique expérimentale, confirmant son implication dans les maladies inflammatoires chroniques (Ishihara and Hirano, 2002).

Les effets des cytokines de la famille de l'IL-6 sur le tissu osseux sont exposés dans la partie III de cette introduction.



*Figure 22 : Principaux effets biologiques de l'IL-6.*

## 2. Les effets biologiques de l'OSM

L'OSM présente de nombreux effets biologiques sur une grande variété de cellules à la fois *in vitro* et *in vivo* (figure 23).

### a. Effets sur la prolifération et la différenciation cellulaire

Initialement identifiée par sa capacité à inhiber la prolifération tumorale des cellules de la lignée de mélanome A375, l'OSM peut en fait moduler la prolifération soit positivement soit négativement selon le type cellulaire. De nombreuses études ont démontré un effet anti-prolifératif de l'OSM, notamment sur des lignées cellulaires issues de tumeurs solides comme le mélanome (Horn et al., 1990), le cancer du sein (Grant and Begley, 1999), le gliome (Halfter et al., 1998), l'hépatocarcinome (Klausen et al., 2000) ou l'ostéosarcome (Bellido et al., 1997). L'OSM peut également réduire la prolifération de cellules non-tumorales telles que les cellules épithéliales de la glande mammaire (Grant et al., 2001; Liu et al., 1998b), le facteur de transcription STAT3 étant impliqué dans ce phénomène. L'inhibition de la prolifération, observée en réponse à l'OSM, se traduit par un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et, par conséquent, une diminution du nombre de cellules en phase S. Cet arrêt du cycle

cellulaire est caractérisé par l'induction des inhibiteurs du cycle cellulaire p21<sup>WAF1</sup> ou p27 (Bellido et al., 1998; Kortylewski et al., 1999) ou de protéines telles que C/EBP $\delta$  (CCAAT/Enhancer Binding Protein delta), qui répriment la transcription et induisent un blocage du cycle cellulaire en phase G0/G1 (Halfter et al., 2006; Hutt and DeWille, 2002). Au contraire, l'OSM s'est avérée capable de stimuler la prolifération de cellules tumorales issues par exemple de myélome et de sarcome de Kaposi (Zhang et al., 1994) ainsi que de cellules non transformées comme les fibroblastes de la peau (Ihn and Tamaki, 2000) pour lesquels la voie des MAPKs semble indispensable.

Une inhibition de la prolifération est très souvent associée à une induction de la différenciation. En effet, après un traitement par l'OSM, la prolifération des cellules MCF-7 et MDA-MB-231 issues de cancer du sein est fortement réduite, l'analyse du cycle cellulaire montrant une accumulation en phase G0/G1 (Douglas et al., 1998). De nombreux changements morphologiques caractéristiques lui sont associés : plus hétérogènes, avec un noyau et un cytoplasme plus importants, les cellules ont un aspect allongé et de nombreux prolongements cytoplasmiques. S'intéressant au stade de différenciation, ils ont alors montré que le traitement à l'OSM est corrélé à une induction de la différenciation de ces cellules, visualisée par la présence de nombreuses gouttelettes lipidiques caractéristiques des cellules épithéliales mammaires matures.

#### b. Effets sur le développement du foie

Des effets similaires ont été observés sur des progéniteurs hépatiques de rat, les cellules ovales, impliquées dans la régénération du foie en réponse à un dommage. Cultivés en présence d'OSM, ces précurseurs ont une croissance très ralentie et adoptent une morphologie d'hépatocytes. De plus, des marqueurs caractéristiques des cellules hépatiques adultes – albumine, tyrosine amino transférase, tryptophane oxygénase- sont exprimés alors que les marqueurs fœtaux disparaissent, démontrant une induction de la différenciation hépatique par l'OSM (Okaya et al., 2005). Le rôle de l'OSM dans le développement du foie avait préalablement été étudié. Lors du développement embryonnaire, l'OSM stimule la maturation fonctionnelle des hépatocytes fœtaux en induisant l'expression de marqueurs hépatiques, l'accumulation de glycogène et la synthèse lipidique (Miyajima et al., 2000). Le facteur de transcription STAT3 s'est avéré essentiel pour le développement hépatique induit par l'OSM, alors que l'activation de Ras semblait réguler négativement ce processus (Ito et al., 2000). Plus récemment, l'utilisation de souris invalidées pour le gène du récepteur à

l'OSM (souris OSMR<sup>-/-</sup>) a confirmé l'importance de la voie de signalisation activée par l'OSM ou par les autres cytokines utilisant la chaîne réceptrice OSMR telles que l'IL-31 dans le phénomène de régénération hépatique. En effet, après exposition au tétrachlorure de carbone CCl<sub>4</sub>, les souris OSMR<sup>-/-</sup> ont montré une prolifération hépatique et un remodelage tissulaire lent et seulement partiel comparé aux souris sauvages (Nakamura et al., 2004).

### c. Effets sur le développement du système nerveux central

Chez la souris, les ARN messagers codant l'OSMR ont été détectés dans de nombreuses cellules du système nerveux central : les astrocytes du bulbe olfactif, les cellules épithéliales du plexus choroïde ou les cellules méningées de la pie mère (Tamura et al., 2003), toutes ces cellules étant impliquées dans la défense contre l'inflammation. Le rôle de la gp130 lors du développement du système nerveux a été étudié grâce à des souris déficientes pour cette sous-unité réceptrice. Une réduction du nombre de neurones sensitifs et moteurs, ainsi qu'une plus faible expression d'un marqueur astrocytaire, la GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) ont été observées dans ces souris, suggérant un rôle essentiel de la gp130 dans la survie de certaines sous-populations neuronales et la différenciation astrocytaire *in vivo* (Nakashima et al., 1999). L'OSM joue également un rôle neuroprotecteur important puisqu'elle réduit la mort neuronale induite par le NMDA (N-méthyl-D-aspartate) dans des cultures de neurones du cortex ainsi que le volume des lésions *in vivo* dans le striatum de souris provoquées par l'injection du même agent (Weiss et al., 2006).

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

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

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

L'OSM est capable d'induire la production des APPs et plus particulièrement de l' $\alpha 1$  antichymotrypsine et de l'haptoglobine par les hépatocytes de rat et les hépatocarcinomes HepG2 (Richards et al., 1992). Outre cet effet direct, l'OSM régule l'inflammation de manière indirecte via la production d'autres cytokines et de leurs récepteurs. En effet, l'OSM stimule la production d'IL-6 dans les cellules endothéliales (Brown et al., 1991) et de son récepteur dans les cellules HepG2 (Cichy et al., 1997). Etant donné que l'IL-6 joue un rôle pro-inflammatoire et que des souris déficientes pour l'IL-6 montrent une production réduite des APPs (Kopf et al., 1994), l'OSM pourrait médier une partie de ses effets via l'IL-6. Mais il existe également des effets propres à l'OSM, que n'exercent pas les autres membres de la famille de l'IL-6. Ainsi, Richards et collaborateurs ont montré que l'OSM peut inhiber l'expression de l'IL-8 et du granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) induits par l'IL-1 dans des cultures de fibroblastes, régulant alors négativement le processus inflammatoire (Richards et al., 1996). De plus, l'OSM induit l'expression de nombreuses molécules d'adhésion par les cellules endothéliales telles que l'intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) ou la vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) (Modur et al., 1997), favorisant ainsi le recrutement et l'adhésion des leucocytes au site inflammatoire. Enfin, l'OSM peut stimuler l'expression de chémokines telles que l'eotaxine-1 *in vitro* dans des fibroblastes murins et *in vivo* au niveau pulmonaire, augmentant ainsi l'infiltration de polynucléaires éosinophiles au site inflammatoire (Langdon et al., 2003).

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

dans les chondrocytes humains via la voie JAK-STAT, et participe alors à la destruction du cartilage (Li et al., 2001).

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

Des études cliniques ont également mis en évidence des concentrations d'OSM plus élevées dans les surnageants de culture de biopsies de lésions cutanées psoriasiques comparées à des peaux non lésées ou saines (Bonifati et al., 1998). De même, l'expression de l'OSM ainsi que de son récepteur de type II est augmentée dans les lésions de psoriasis et de dermatite atopique. L'OSM alors produite par les lymphocytes T infiltrant la peau est capable de moduler, en recrutant STAT3, un grand nombre de gènes impliqués dans les fonctions des kératinocytes et en particulier dans leur différenciation, leur activation et leur migration ainsi que dans le recrutement de leucocytes au site inflammatoire. Cette cytokine pourrait donc participer au remodelage tissulaire et à l'exacerbation de la réponse inflammatoire observée dans les pathologies cutanées comme le psoriasis ou la dermatite atopique (Boniface et al., 2007).

#### e. Effets sur l'hématopoïèse et la lymphopoïèse

Exprimée de façon abondante dans les tissus hématopoïétiques comme la moelle osseuse, le thymus et la rate (Yoshimura et al., 1996), l'OSM est impliquée dans l'hématopoïèse. Ainsi, exprimée dans la région aortique lors du développement embryonnaire de la souris, l'OSM s'est avérée indispensable à la prolifération des progéniteurs



hématopoïétiques multipotents, stimulant également la formation de cellules endothéliales (Mukoyama et al., 1998). Mais l'OSM intervient également au stade adulte. Afin d'étudier plus précisément ses effets sur l'hématopoïèse, des souris déficientes pour son récepteur ont été générées. Alors que ces souris sont viables et se développent normalement, l'analyse hématologique montre des résultats anormaux. En effet, le nombre d'érythrocytes et de plaquettes est diminué comparé aux souris sauvages. De plus, les progéniteurs des lignées érythroïdes et mégakariocytaires produits par la moelle osseuse sont également en nombre réduit, indiquant que l'OSM, en agissant sur le micro-environnement médullaire (vraisemblablement les cellules stromales de la moelle osseuse), est nécessaire au maintien d'un pool de cellules progénitrices de ces lignées (Tanaka et al., 2003). Il est cependant possible que ces observations ne soient pas dues uniquement à l'action de l'OSM mais également à celle de l'IL-31 qui utilise la même chaîne réceptrice OSMR que l'OSM.

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

#### f. Effets sur les processus liés au développement tumoral

L'OSM a d'abord été identifiée pour sa capacité à inhiber la prolifération de nombreuses cellules tumorales. Son rôle dans les processus métastatiques a donc logiquement été étudié dans différents modèles, conduisant à des conclusions diverses. Dans des

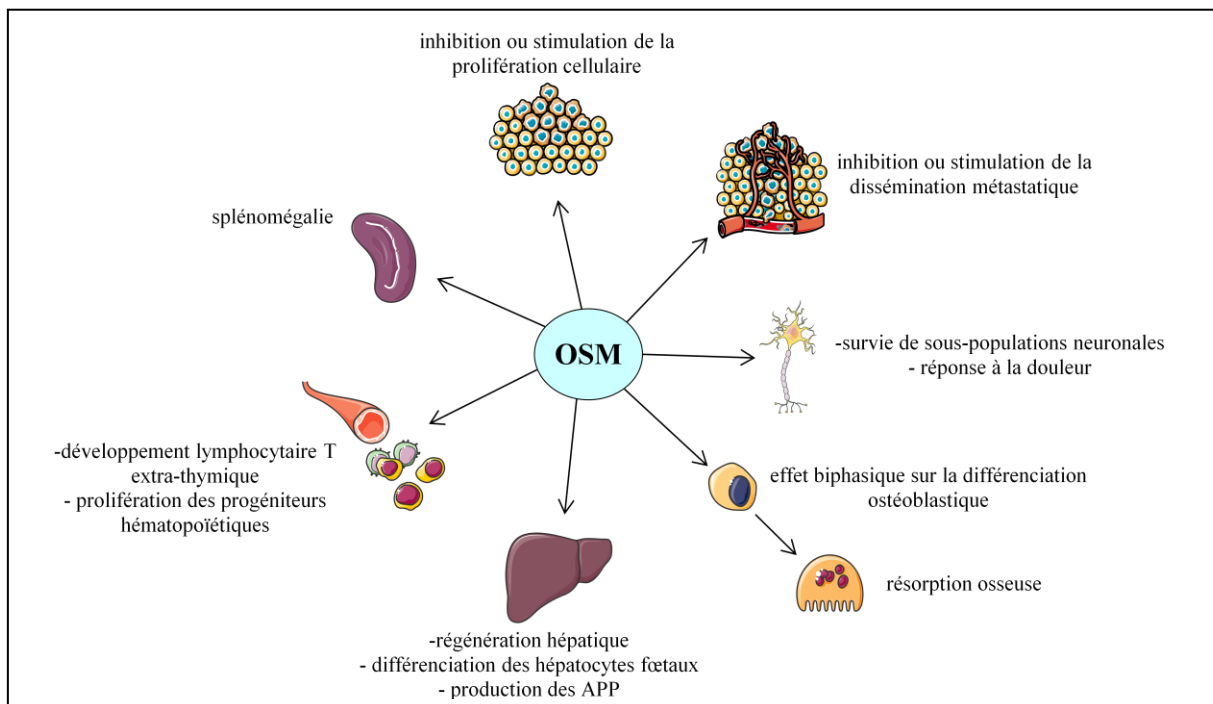
expériences de co-cultures neutrophiles / cellules tumorales, l'OSM produit par les neutrophiles augmente la sécrétion de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), un facteur pro-angiogénique impliqué dans l'invasion tumorale, par des cellules issues de cancer du sein (MDA-MB-231 et T47D). De plus, l'OSM stimule le détachement de ces cellules et leur capacité invasive (Queen et al., 2005). Une seconde étude sur la lignée T47D a montré des résultats similaires : perte d'adhérence au substrat, changements morphologiques, augmentation de la capacité invasive, mais également sécrétion de protéases lysosomales telles que la cathepsine D et L (Jorcyk et al., 2006), suggérant un rôle positif de l'OSM sur la dissémination métastatique. Sur le plan de l'angiogénèse, il a été montré que l'OSM stimule la formation de nouveaux vaisseaux via la production de VEGF *in vivo*, dans un modèle de cellules cornéennes de lapin (Vasse et al., 1999). Cependant cet effet semble restreint à ce modèle, puisqu'aucune stimulation n'a pu être observée dans un modèle de cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine ni dans des cellules endothéliales de l'artère pulmonaire de veau. L'effet positif de l'OSM sur la migration des cellules endothéliales a par ailleurs été corrélé à une activation de la plasmine, protéase capable d'hydrolyser la fibrine et de dissoudre les caillots sanguins, via une induction de l'activateur du plasminogène (Strand et al., 2000).

En revanche, des études menées sur la lignée 95-D, issue d'un carcinome pulmonaire humain très métastatique, ont révélé un effet totalement opposé. *In vitro*, l'OSM réduit la formation de colonies, la migration et la capacité invasive de ces cellules, avec une inhibition de la production des protéases MMP2 et MMP9. Testée *in vivo* sur un modèle murin de mélanome conduisant au développement de métastases pulmonaires, une diminution significative du nombre de foyers métastatiques a pu être observée chez les souris traitées par l'OSM comparé au groupe contrôle (Ouyang et al., 2006), faisant de l'OSM un potentiel agent thérapeutique. Lacreusette et ses collaborateurs ont ensuite confirmé que l'OSM est plus active que l'IL-6 pour inhiber la prolifération de cellules métastatiques issues de mélanome. Ce rôle clé de l'OSM sur la croissance des mélanomes a été appuyé par un pourcentage relativement important de lignées cellulaires métastatiques résistantes à cette cytokine par perte de l'expression de la chaîne réceptrice OSMR (Lacreusette et al., 2007). De plus, une corrélation a pu être établie entre la sensibilité des cellules de mélanomes à l'OSM et l'IL-6, deux cytokines produites par les lymphocytes infiltrant la tumeur (TILs) et la survie sans rechute de patients atteints de mélanome de grade III et traités avec des TILs. Cette corrélation est vraisemblablement due à une inhibition directe de la prolifération des cellules de mélanomes par l'OSM et/ou l'IL-6 (Lacreusette et al., 2008).

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

g. Autres effets biologiques

De nombreux autres effets de l'OSM, plus éloignés de notre thématique, ont été décrits. On peut citer entre autres un rôle dans le phénomène de décidualisation, essentiel à l'implantation de l'embryon dans l'utérus et caractérisé par une infiltration de leucocytes et un remaniement de la matrice extracellulaire endométriale. Tout comme le LIF, l'OSM augmente le nombre de cellules stromales viables de l'endomètre. Par contre, elle joue un rôle inhibiteur dans le processus de décidualisation et le relargage de prolactine par ces cellules, effet non observé avec le LIF (Tanaka and Umesaki, 2003). L'OSM est également active au niveau du rein. En effet, les endotoxines induisent une réaction inflammatoire aigüe au niveau du rein caractérisée notamment par une diminution de l'expression de rénine via l'OSM (Baumann et al., 2000).



*Figure 23 : Principaux effets biologiques de l'OSM.*

### 3. Les activités biologiques de l'IL-31

#### a. Régulation de la prolifération cellulaire

Les effets de l'IL-31 sur la prolifération cellulaire *in vitro* dépendent du type et de la densité cellulaire ainsi que de la concentration en cytokine. Bien que l'IL-31 ait été identifiée par sa capacité à stimuler la prolifération de cellules BaF3, une récente étude a montré que cette cytokine est également capable d'inhiber la prolifération de cellules épithéliales pulmonaires. L'inhibition de la prolifération, observée en réponse à l'IL-31 se traduit par une accumulation des cellules en phase G1, le facteur de transcription STAT3 étant impliqué dans ce phénomène. Cet arrêt du cycle cellulaire est caractérisé par l'induction de l'inhibiteur du cycle cellulaire p27 associé à l'inhibition de la cycline B1 ainsi que de CDK1, CDK6 et Rb (Rétinoblastome) (Chattopadhyay et al., 2007).

Dans les cellules issues d'un carcinome colique humain HCT116, l'IL-31 à haute dose inhibe de façon significative la prolifération cellulaire lorsque la densité cellulaire est faible. Cependant, elle perd son activité anti-proliférative et même stimule la prolifération de ces cellules lorsque la densité est plus élevée (Dambacher et al., 2007).

#### b. Implication dans l'hématopoïèse

L'IL-31 joue également un rôle important dans la régulation de l'hématopoïèse. En effet, les souris déficientes pour gpl présentent une diminution du nombre de progéniteurs hématopoïétiques dans la moelle osseuse et la rate (érythrocytes, granulocytes, macrophages, mégacaryocytes), indiquant que cette cytokine régule positivement l'homéostasie de ces cellules (Broxmeyer et al., 2007)(figure 24).

#### c. Implication dans la réponse immunitaire et l'inflammation

L'activité biologique de l'IL-31 la mieux décrite est son implication dans la dermatite atopique. Il est maintenant établi que l'inflammation dépendante des cellules T joue un rôle majeur dans le développement de la plupart des pathologies de la peau telles que la dermatite atopique, la dermatite allergique de contact et le psoriasis.

Des souris transgéniques surexprimant l'IL-31 développent un prurit, une kératinose, une alopécie ainsi que des lésions cutanées caractérisées par une infiltration de cellules

inflammatoires et de mastocytes (Dillon et al., 2004). Un phénotype similaire est observé chez des patients atteints de dermatite atopique. Il s'agit d'une pathologie cutanée inflammatoire chronique qui affecte 10 à 20 % des enfants dans le monde. Cette pathologie est caractérisée par l'infiltration d'un type cellulaire particulier : les lymphocytes Th2 mémoires exprimant CLA (Cutaneous Lymphocyte Antigen). Or, l'IL-31 est produite par ces cellules et les lymphocytes T mémoires CLA+ circulants de patients atteints de dermatite atopique semblent produire plus de d'IL-31 que ceux atteints de psoriasis ou ceux de sujets sains (Bilsborough et al., 2006). D'autres études confirment l'implication de l'IL-31 dans la dermatite atopique chez la souris mais aussi chez l'homme. En effet, une surexpression d'IL-31 est retrouvée au niveau de la peau des souris NC/Nga, un modèle de dermatite atopique, lorsqu'elle développent la maladie (Takaoka et al., 2006; Takaoka et al., 2005). L'IL-31 est également décrite comme un nouveau lien entre les cellules T et le prurit au niveau de l'inflammation cutanée atopique. En effet, l'IL-31 est significativement augmentée chez des patients présentant une inflammation cutanée pruritique comparés à des patients atteints d'une inflammation cutanée non pruritique (Sonkoly et al., 2006). Ainsi, l'IL-31 serait à l'origine des sensations de démangeaisons dans cette pathologie. Cela a été confirmé par Grimstad et ses collaborateurs qui ont montré que des anticorps anti-IL-31 sont capables de limiter la sensation de démangeaison dans un modèle de dermatite murin (Grimstad et al., 2009). Cette expression d'IL-31 est également corrélée à la production d'IL-4 et d'IL-13, deux cytokines de type Th2 impliquées dans de nombreuses maladies inflammatoires (Neis et al., 2006). Plus récemment, une étude génétique a permis la mise en évidence d'un haplotype particulier de l'IL-31 associé à l'eczéma de type non atopique (Schulz et al., 2007). De plus, de manière similaire à l'OSM, l'IL-31 pourrait être impliquée dans le lichen amyloïde (Arita et al., 2008). En effet, des mutations observées sur l'OSMR entraînent une inhibition de la signalisation cellulaire induite par l'OSM mais également par l'IL-31. Ces études mettent donc en évidence l'implication de l'IL-31 et/ou de l'OSM dans les pathologies inflammatoires cutanées (figure 24).

L'asthme est une pathologie inflammatoire chronique qui affecte les bronches. Elle est caractérisée par une infiltration de polynucléaires éosinophiles, une concentration plasmatique élevée en IgE (Immunoglobulines) et en cytokines de type Th2, une obstruction bronchique réversible et une hyper-sécrétion de mucus. La production de médiateurs inflammatoires par les cellules épithéliales bronchiques contribue à l'inflammation et au remodelage des voies aériennes. Les cellules épithéliales bronchiques humaines sont une des cibles de l'IL-31

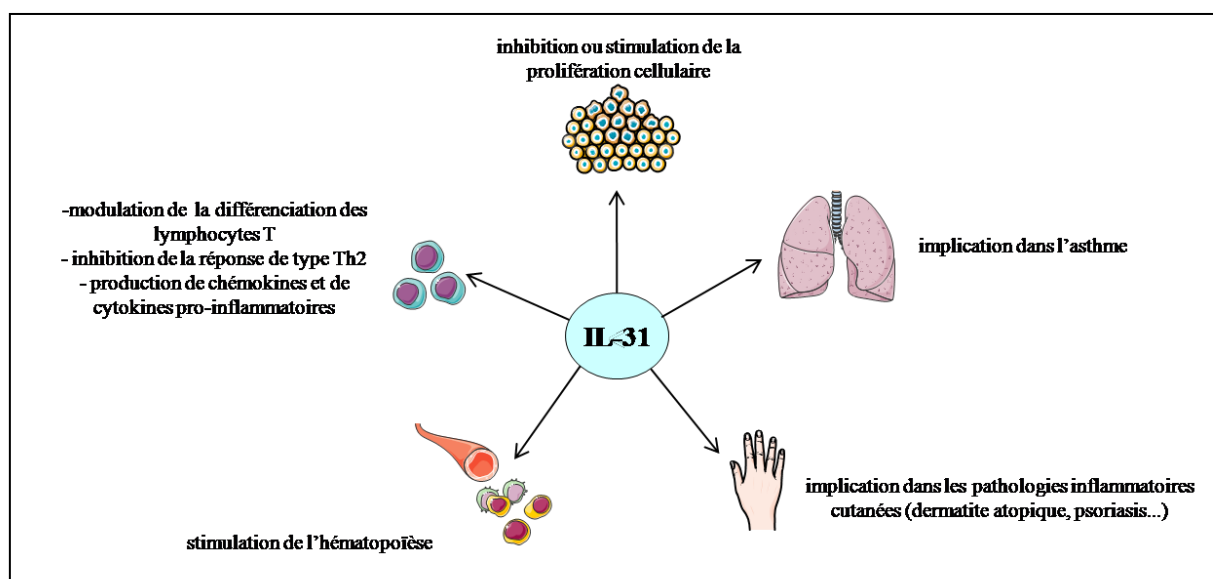
puisqu'elles expriment, de façon constitutive gp1 et OSMR (Jawa et al., 2008). L'IL-31 augmente de façon significative l'expression, dans ces cellules, de la chémokine MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1 ; CCL2), ainsi que des facteurs de croissance VEGF et EGF (Epidermal Growth Factor). Ces médiateurs pourraient alors contribuer au recrutement de cellules inflammatoires et donc être des régulateurs importants de l'inflammation et du remodelage des voies aériennes observés dans l'asthme allergique (Ip et al., 2007). De plus, la concentration sérique en IL-31 est augmentée chez les patients atteints d'asthme allergique, suggérant un rôle important de cette cytokine dans cette pathologie (Lei et al., 2008)(figure 24).

En fait, plusieurs contingents cellulaires impliqués directement ou indirectement dans l'inflammation et la réponse immunitaire sont régulés par l'IL-31. Les sous-unités réceptrices de l'IL-31 sont exprimées dans les monocytes humains activés par l'IFN $\gamma$  et les LPS (Dillon et al., 2004). De plus, Zhang et ses collaborateurs ont suggéré que l'IL-31 peut moduler positivement ou négativement la différenciation Th1 et Th17 dans un système *in vitro* dépourvu de cellules présentatrices d'antigènes (Zhang et al., 2008). Ces résultats suggèrent que l'IL-31 pourrait réguler les réponses immunitaires en modulant l'activité des cellules présentatrices d'antigènes dérivés des monocytes ou directement des cellules T.

Des études réalisées sur des kératinocytes humains montrent que l'expression de plusieurs chémokines est directement induite par l'IL-31 dans ces cellules. C'est le cas notamment de GRO1-a (Growth Regulated Oncogene 1 ; CXCL1) impliquée dans le recrutement des polynucléaires neutrophiles, de TARC (Thymus and Activation Regulated Chemokine ; CCL17) ayant une activité chémo-attractante sur les cellules T ou de MDC (Macrophage-Derived Chemokine ; CCL22) capable de recruter les monocytes, les cellules dendritiques, les cellules NK (Natural Killer) et les lymphocytes T activés de façon chronique (Dillon et al., 2004). L'IL-31 simule également la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-8 par les cellules HCT116, de chémokines et de MMPs par des myofibroblastes sub-épithéliaux humains et par des cellules épithéliales bronchiques (Dambacher et al., 2007; Ip et al., 2007; Yagi et al., 2007). Ces données indiquent que l'IL-31 pourrait fonctionner comme une cytokine pro-inflammatoire impliquée dans le recrutement de cellules polynucléaires, de monocytes et de cellules T au site inflammatoire *in vivo*.

Cependant, il a été montré plus récemment que l'injection intra-veineuse d'œufs *Schistosoma mansoni* chez des souris déficientes pour gp1 induit une inflammation

pulmonaire plus sévère que chez les souris sauvages, caractérisée par de larges zones d'inflammation granulomateuse et une augmentation des dépôts de collagène. De plus, les cellules T CD4+ naïves purifiées de souris gpl-/- ont une prolifération accrue et produisent significativement plus de cytokines de type Th2 telles que l'IL-4 ou l'IL-13 que celles issues de souris sauvages. Au contraire, la réponse Th1 médiée par les cellules T CD4+ issus de souris déficientes pour gpl est normale. Ces résultats suggèrent donc que l'IL-31 est capable de limiter spécifiquement les réponses inflammatoires de type Th2 (Perrigou et al., 2007). Cet effet de l'IL-31 a également été retrouvé dans un modèle d'inflammation intestinale (Perrigou et al., 2009)(figure 24).



*Figure 24 : Principaux effets de l'IL-31.*

En conclusion, les cytokines de la famille de l'IL-6 présentent une grande variété de fonctions, redondantes ou non. Parmi les activités biologiques redondantes, on peut citer leur rôle dans l'inflammation et notamment dans l'induction des protéines de la phase aigüe de l'inflammation par le foie (Baumann and Gauldie, 1994). Dans des lésions inflammatoires cutanées, de type psoriasis ou dermatite atopique, il a été mis en évidence une surexpression d'IL-6 (Neuner et al., 1991), d'IL-11 (Ameglio et al., 1997), d'IL-31 (Dillon et al., 2004) et d'OSM (Boniface et al., 2007). Ces cytokines jouent également un rôle dans le développement des pathologies inflammatoires intestinales et du cancer colorectal (Atreya and Neurath, 2008; Dambacher et al., 2007; Ernst et al., 2008). Enfin, le ciblage de ces cytokines par des anticorps pourrait être une solution thérapeutique pour des pathologies

inflammatoires chroniques telles que la polyarthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn ou l'asthme (Ding et al., 2008; O'Hara et al., 2003; Richards, 2004). Les cytokines de la famille de l'IL-6 joue également un rôle central dans l'hématopoïèse fœtale et adulte, par action directe sur les cellules hématopoïétiques ou indirecte sur les cellules stromales. En effet, elles peuvent favoriser la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques, la production de globules rouges, de plaquettes ou de neutrophiles (Broxmeyer et al., 2007; Hirano, 1998).



### **III. Implication des cytokines de la famille de l'IL-6 dans la physiopathologie osseuse**

Le tissu osseux est un tissu conjonctif complexe en perpétuel remaniement, reposant sur l'équilibre entre deux mécanismes: la formation et la résorption osseuse. Ce remodelage osseux, qui permet de préserver les propriétés biomécaniques du squelette et d'assurer l'homéostasie minérale, fait intervenir deux types cellulaires : les ostéoclastes et les ostéoblastes.

Les ostéoblastes sont des cellules ostéoformatrices, responsables de la synthèse des constituants de la matrice organique osseuse et de sa minéralisation. D'origine mésodermique, les progéniteurs ostéoblastiques sont des cellules mésenchymateuses (Owen, 1988). Responsable de la résorption osseuse, l'ostéoclaste est une grosse cellule multinucléée dérivant de la lignée hématopoïétique monocyttaire (Suda et al., 1992). Ces deux types cellulaires communiquent entre eux via des interactions cellulaires ou des facteurs solubles, et contrôlent ainsi leur différenciation et leurs fonctions permettant de maintenir un remodelage osseux adapté. De nombreuses pathologies ostéo-articulaires telles que l'ostéoporose, l'arthrite rhumatoïde et les tumeurs osseuses, sont associées à une dérégulation des interactions entre les cellules osseuses, conduisant à une perte osseuse, des douleurs, des fractures pathologiques et une hypercalcémie.

Les cytokines de la famille de l'IL-6 sont très actives sur le tissu osseux puisqu'elles sont capables de contrôler la différenciation et l'activité des ostéoblastes et des ostéoclastes grâce à une variété de mécanismes complexes, parfois contradictoires. Cette revue décrit l'effet de ces cytokines sur le remodelage osseux. Elle est utilisée ici comme support afin de présenter les grandes généralités sur l'implication de ces cytokines dans la physiopathologie osseuse, dans le développement de pathologies ostéolytiques et les tumeurs osseuses.

## Article 1

### « Le rôle dual des cytokines de la famille de l'Interleukine-6 sur le remodelage osseux et les tumeurs osseuses »

Blanchard F, Duplomb L, Baud'huin M, **Brounais B**. Cytokine Growth Factor Rev.  
2009 Feb;20(1):19-28.

#### Résumé :

De nombreux facteurs tels que les vitamines, les hormones et les cytokines contrôlent le métabolisme et le remodelage osseux. Les cytokines de la famille de l'IL-6, en agissant sur les cellules osseuses, jouent un rôle important sur le tissu osseux mais leur action semble être à double tranchant. En effet, elles soutiennent la formation osseuse mais peuvent aussi induire une perte osseuse dans de nombreuses pathologies ostéolytiques. De même, le développement de tumeurs osseuses peut être soit inhibé soit induit par ces cytokines, en fonction du type cellulaire, du grade de la tumeur et de l'environnement osseux. Cet effet dual semble être lié à l'activation soit des STATs soit des MAPKs, ces deux voies de signalisation induisant des effets opposés sur les cellules osseuses.

#### Généralités sur les cytokines de la famille de l'IL-6 et la physiopathologie osseuse :

##### Effets sur les cellules osseuses

Les cytokines de la famille de l'IL-6 sont capables de contrôler la différenciation et l'activité des ostéoblastes et des ostéoclastes grâce à une variété de mécanismes complexes, parfois contradictoires (figure 25). L'IL-6 associée à son récepteur soluble, l'IL-11, le LIF, le CNTF, la CT-1 et l'OSM stimulent la différenciation ostéoblastique *in vitro* (Bellido et al., 1997; Erices et al., 2002; Walker et al., 2008), par un mécanisme dépendant de l'activation de STAT3 (Itoh et al., 2006). Ainsi, des études réalisées sur les cellules MG63, issues d'un

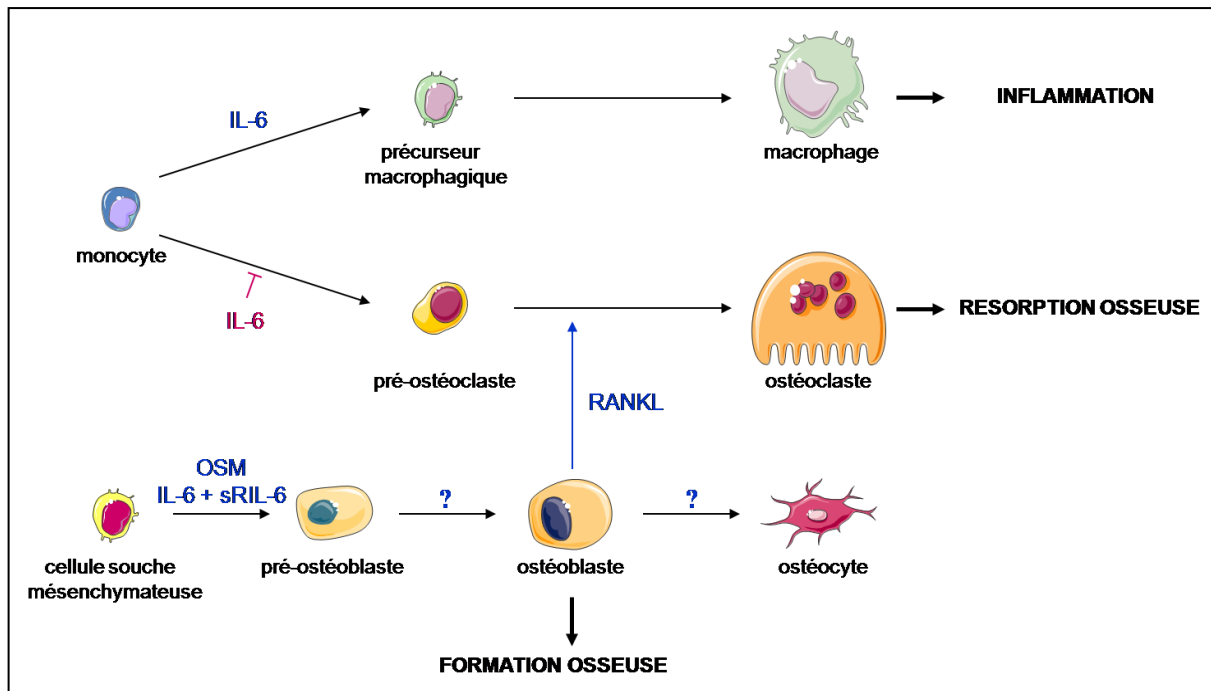
ostéosarcome humain de type fibroblastique, ont montré que ces cellules prolifèrent de façon moins importante après stimulation par l'OSM humaine, avec un blocage du cycle en phase G1. De plus, elles acquièrent un phénotype ostéoblastique plus marqué caractérisé par une induction de la phosphatase alcaline. Cet effet pro-différenciation met en jeu la voie JAK-STAT et la protéine p21<sup>WAF1</sup>, un inhibiteur des CDKs induit par l'OSM (Bellido et al., 1997; Bellido et al., 1998). De même, dans un modèle de calvaria de souris, l'OSM stimule l'activité phosphatase alcaline ainsi que l'expression d'un autre marqueur ostéoblastique, l'ostéocalcine (Bellido et al., 1997).

Cependant, d'autres auteurs ont mis en évidence un effet inhibiteur de l'IL-6 associée à son récepteur soluble, de l'IL-11, du LIF et de l'OSM sur la formation osseuse *in vitro* (Chipoy et al., 2004; Malaval and Aubin, 2001; Malaval et al., 2005), impliquant la PKC $\delta$  et Erk1/2 (Chipoy et al., 2004). Ces cytokines semblent donc avoir un effet biphasique en fonction du stade de différenciation des cellules ostéoblastiques, stimulant les premières étapes de l'ostéogénèse mais inhibant l'expression des marqueurs ostéoblastiques et la formation osseuse à des étapes plus tardives. Etant donné que la différenciation terminale des ostéoblastes en ostéocytes est caractérisée par une diminution de l'expression des marqueurs ostéoblastiques, il est possible que ces cytokines induisent une différenciation de type ostéocytaire.

De plus, les cytokines de la famille de l'IL-6 agissent sur la différenciation ostéoclastique et donc sur la résorption osseuse par un mécanisme indirect, en augmentant les interactions entre les ostéoblastes et les ostéoclastes. Ainsi, l'IL-6 associée à son récepteur soluble, l'IL-11, le LIF, la CT-1 et l'OSM stimulent la formation d'ostéoclastes en induisant la production de facteurs pro-résorptifs tels que RANKL par les cellules ostéoblastiques (Palmqvist et al., 2002; Richards et al., 2000). Cependant, l'IL-6 et l'IL-27 peuvent également directement inhiber la différenciation ostéoclastique induite par RANKL (Duplomb et al., 2008; Kamiya et al., 2007).

De nombreuses souris knockout et transgéniques ont permis d'étudier l'implication des cytokines de la famille de l'IL-6 sur le remodelage osseux. En particulier, différentes études ont été réalisées sur des souris dont le gène de la gp130 a été modifié génétiquement. Les souris dont le gène codant la gp130 a été invalidé (gp130<sup>-/-</sup>) ne sont pas viables et présentent de nombreuses anomalies du squelette. L'analyse des ostéoblastes a révélé des défauts dans la fonction de ces cellules, comme une réduction du niveau d'expression de la phosphatase alcaline, et une incapacité à stimuler les ostéoclastes (Shin et al., 2004). En

généralisant des sous-unités gp130 mutantes, pour lesquelles la voie des STATs ou la voie des MAPKs est activée de façon sélective, Sims et collaborateurs (Sims et al., 2004) ont observé que l'activation des STATs par la gp130 est essentielle à la croissance osseuse, à l'activation des ostéoblastes, ainsi qu'à la production de RANKL et donc la formation des ostéoclastes. Les MAPKs sont quant à elles impliquées dans l'inhibition de l'ostéoclastogénèse. Le rôle majeur des STATs dans l'activation des ostéoblastes a par ailleurs été confirmé par des travaux plus récents (Itoh et al., 2006). Les souris présentant une sur-activation de STAT3 ont montré une augmentation du volume osseux, un remodelage plus intense, et une activité de la phosphatase alcaline élevée. Au contraire, lorsque STAT3 était inactivé, le volume osseux était réduit et la minéralisation absente. L'ensemble de ces résultats tendent à montrer que la gp130, via STAT3, stimule la différenciation et l'activité ostéoblastique ainsi que le remodelage osseux. Cependant, les effets de ces cytokines et en particulier de l'OSM, *in vivo* restent complexes et mal compris. La production d'OSM, suite à l'injection d'un adénovirus codant l'OSM murine au niveau du genou de souris induit une inflammation localisée avec destruction du cartilage et de l'os sous-chondral mais également une formation osseuse périostée associée à la présence de plusieurs couches de cellules de type ostéoblastique (de Hooge et al., 2002). Plus récemment, le rôle de l'OSM sur le tissu osseux a été analysé chez des souris adultes déficientes pour OSMR. Ces dernières présentent une diminution de la résorption osseuse par les ostéoclastes ainsi que de la formation osseuse par les ostéoblastes. Ces souris développent un phénotype ostéopétrotique, indiquant que l'OSM ou les autres cytokines utilisant cette chaîne réceptrice telle que l'IL-31 joue un rôle important dans le maintien d'un remodelage osseux normal (Walker, 2009).



*Figure 25 : Activités biologiques de l'IL-6 et de l'OSM sur les cellules osseuses.*

*L'IL-6 associée à son récepteur soluble et l'OSM semblent avoir un effet biphasique sur la différenciation ostéoblastique, stimulant les premières étapes de l'ostéogenèse mais altérant la formation osseuse à des étapes plus tardives par des mécanismes inconnus . L'IL-6 et l'OSM induisent la production de RANKL par les cellules ostéoblastiques et ainsi stimulent la résorption osseuse. Seule l'IL-6 inhibe directement la différenciation ostéoclastique induite par RANKL au profit d'une différenciation macrophagique.*

### Implication dans les tumeurs osseuses

Des tumeurs osseuses primitives dérivant des cellules osseuses, telles que l'ostéosarcome, le chondrosarcome ou le sarcome d'Ewing, ainsi que des métastases osseuses dérivant principalement de cancers de la prostate ou du sein, se développent au niveau du tissu osseux. La prolifération des cellules tumorales au niveau des os est associée à une inflammation, une augmentation de la production de RANKL, une ostéolyse et une formation osseuse ectopique. De plus, un cercle vicieux s'installe entre prolifération tumorale et résorption osseuse maligne.

Les cytokines de la famille de l'IL-6 sont connues pour avoir des effets inhibiteurs ou stimulateurs sur la croissance tumorale en fonction du type cellulaire. Par exemple, l'IL-6

associée à son récepteur soluble, l'OSM et, dans une moindre mesure, le LIF et l'IL-11 inhibent la prolifération de nombreuses cellules tumorales en culture issues de mélanomes (Kortylewski et al., 1999), de cancer du sein (Grant and Begley, 1999) ou d'ostéosarcome (Bellido et al., 1997), toutes ces cellules ayant une prédisposition à former des lésions ostéolytiques. De même, l'IL-6, l'OSM et l'IL-27 ont une action anti-tumorale directe possible chez les rongeurs ou chez l'homme (Lacrouette et al., 2008; Mule et al., 1990; Ouyang et al., 2006; Yoshimoto et al., 2008), suggérant une utilisation potentielle comme traitement anti-cancéreux adjuvant. Par contre, les cytokines de la famille de l'IL-6 sont également capables de soutenir ou de stimuler la prolifération *in vitro* de cellules issues de mélanome (Lu et al., 1996), de myélome (Treon and Anderson, 1998) ou de cancer de la prostate (Lu et al., 2004) pour lesquels l'ostéolyse participe au développement tumoral et à la formation de métastases. De plus, une élévation du taux sérique de certaines cytokines de la famille de l'IL-6, et en particulier d'IL-6, a pu être mise en évidence chez les patients atteints de différents cancers osseux tels que l'ostéosarcome, le chondrosarcome ou le sarcome d'Ewing, en relation avec un mauvais pronostic vital (Rutkowski et al., 2003).

Enfin, malgré leur rôle inhibiteur potentiel direct sur la prolifération tumorale, les cytokines de la famille de l'IL-6 produites dans l'environnement tumoral osseux, principalement, l'IL-6, l'IL-11 et le LIF, participent à la résorption osseuse (Akatsu et al., 1998; Morgan et al., 2004; Palmqvist et al., 2002) et donc à la prolifération tumorale. En effet, il a été montré que les cellules cancéreuses, en produisant notamment de l'IL-6, favorisent la résorption osseuse (de la Mata et al., 1995; Nagai et al., 1998). Etant donné que cette perte osseuse entraîne la libération de facteurs de croissance, l'IL-6 pourrait avoir un effet non négligeable dans le cercle vicieux qui s'instaure entre prolifération tumorale et résorption osseuse. De même, l'OSM est capable d'induire la production de RANKL par les ostéoblastes et ainsi de stimuler la dégradation osseuse (Palmqvist et al., 2002). Elle pourrait ainsi favoriser l'ostéolyse liée aux tumeurs osseuses, et donc le cercle vicieux, comme montré pour l'IL-6, l'IL-11 et le LIF.

Les cytokines de la famille de l'IL-6 sont donc des régulateurs importants de la physiopathologie osseuse. Cependant, leur rôle semble être à double tranchant. En effet, elles sont capables de stimuler ou d'inhiber les différenciations ostéoblastique et ostéoclastique et peuvent avoir des effets inhibiteurs ou stimulateurs, directs ou indirects, sur la prolifération tumorale. De plus, bien qu'elles soient redondantes, les cytokines de la famille de l'IL-6 ont également des activités spécifiques sur les cellules osseuses. Il semble donc nécessaire de

préciser le rôle de chacune de ces cytokines sur la physiopathologie osseuse et en particulier de l'IL-31, une cytokine de la même famille récemment décrite et dont l'effet sur le tissu osseux n'a jamais été étudié.

## Survey

# The dual role of IL-6-type cytokines on bone remodeling and bone tumors

Frédéric Blanchard<sup>a,b,\*</sup>, Laurence Duplomb<sup>a,b</sup>, Marc Baud'huin<sup>a,b</sup>, Bénédicte Brounais<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>INSERM, ERI 7, Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, EA3822, 1 rue Gaston Veil, 44035 Nantes cedex 1, France

<sup>b</sup>Université de Nantes, Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, EA3822, 1 rue Gaston Veil, 44035 Nantes cedex 1, France

Available online 26 November 2008

## Abstract

Many factors such as vitamins, hormones and cytokines, control bone metabolism and remodeling. Cytokines of the interleukin-6 family, by acting on bone cells (i.e. osteoblasts and osteoclasts), have an important role in the bone tissue but they recently appeared as double-edged swords. They sustain bone formation but they can also drive bone loss in various osteolytic pathologies. Similarly, development of bone cancers can be either prevented or enhanced by these cytokines, depending on the cell type, the stage of the tumor and the bone environment. This dual effect is also apparent at the level of the signal transducer and activator of transcription and the mitogen-activated protein kinases, the two main signaling pathways that mediate opposite effects in bone cells.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** IL-6; Bone; Cancer; STAT; MAPK

## Contents

1. Introduction	19
2. Members of the IL-6 family	20
3. Effects on bone cells	21
3.1. Bone formation	22
3.2. Bone resorption	22
3.3. Genetic and other in vivo data in human and rodents	22
4. Implication in bone-tumor development	23
4.1. The vicious cycle between tumor proliferation and associated osteolysis	23
4.2. Direct effect on tumor cells	24
4.3. Indirect effect on the bone-tumor environment	24
5. Conclusion	25
Acknowledgement	26
References	26

## 1. Introduction

Bone, a specialized connective tissue, is continually remodeled according to the coordinated activities of osteoclasts, osteoblasts and osteocytes. Osteoblasts, of mesenchymal origin, are the “bone-forming” cells which are progressively imprisoned in the bone matrix to give rise

\* Corresponding author. Tel.: +33 240 412 846; fax: +33 240 412 860.  
E-mail addresses: [frederic.blanchard@univ-nantes.fr](mailto:frederic.blanchard@univ-nantes.fr) (F. Blanchard),  
[laurence.duplomb@univ-nantes.fr](mailto:laurence.duplomb@univ-nantes.fr) (L. Duplomb),  
[marc.baudhuin@univ-nantes.fr](mailto:marc.baudhuin@univ-nantes.fr) (M. Baud'huin),  
[benedicte.brounais@univ-nantes.fr](mailto:benedicte.brounais@univ-nantes.fr) (B. Brounais).



the osteocyte, whereas osteoclasts are the multinucleated cells of hematopoietic origin that are uniquely capable of bone resorption [1–5]. Interactions between these cells, through cell–cell contacts or soluble factors, control their differentiation and functions and therefore dictate an adequate bone remodeling process. Numerous osteoarticular pathologies, such as osteoporosis, rheumatoid arthritis (RA) and bone cancers, are associated with dysregulated bone cells interactions, leading to bone loss, bone pains, pathological fractures and hypercalcemia [1–5]. In general, we are to deal effectively with the increase in osteolytic pathologies that is projected as our population ages.

Since its discovery 25 years ago, the list of interleukin (IL)-6 effects is still growing. Originally described as a differentiation factor for macrophages, a hepatocyte stimulating factor and a B cell stimulatory factor, this cytokine is now perceived as a highly pleiotropic factor influencing many biological events in several organs, especially the immune and the central nervous systems as well as bone [1–5]. Indeed, early reports described the elevated production of IL-6 in RA, and indicated a causative role for IL-6 in disease activity [6]. Soon, IL-6 appeared to be produced by stromal/osteoblastic cells and to enhance osteoclast formation in various culture systems [1–5]. Other IL-6 family members, such as Leukemia Inhibitory Factor (LIF), IL-11 or Oncostatin M (OSM), proved to have similar activities on osteoclasts cultures but discrepancies arose as they can also induce osteoblast differentiation/bone formation and even inhibit bone resorption in particular cell systems [1–5]. Moreover, these cytokines are also implicated in the development of various bone cancers but clinical trials were performed either to use these cytokines as anti-cancer adjuvants [7] or to neutralize their unwanted effects on tumor growth and osteolysis [8]. This review will describe the dual effects of IL-6-type cytokines on bone

remodeling and their implications in the development of osteolytic pathologies and bone cancers.

## 2. Members of the IL-6 family

The IL-6 family of cytokines actually comprise 10 members: the founding member IL-6 as well as IL-11, IL-27, IL-31, LIF, OSM, ciliary neurotrophic factor (CNTF), cardiotrophin-1 (CT-1), cardiotrophin-like cytokine (CLC) and neuropoietin (NP) [1–4]. They are produced by numerous cell types such as T lymphocytes, monocytes, epithelial cells, fibroblasts, osteoblasts/stromal cells, synovial cells and various cancer cells [1,5]. In addition to their redundancy, these cytokines have a plethora of functions in various, apparently unrelated tissues or situations. They are implicated in embryonic development, organogenesis, differentiation, inflammation and regeneration of the liver, bone, cartilage, kidney, intestine, skin, heart and the central nervous and hematopoietic systems [1,9]. However, several *in vivo* studies indicated that some effects are specific to individual IL-6-type cytokines and that each of these cytokines could have a predominant role in a particular pathophysiological situation. In principle, this specificity is given by the restricted production of the cytokine or its receptor and/or by the particular signaling pathways that are activated.

All IL-6-type cytokines utilize the transducing receptor  $\beta$ -subunit gp130 as part of a multimeric receptor complex, except IL-31 which uses the gp130-like (GPL) subunit [9,10] (Fig. 1). Ligand-induced oligomerization of receptor subunits activates Janus protein-tyrosine kinases (JAKs), which in turn allows the activation of the signal transducer and activator of transcription (STATs; mainly STAT1, STAT3 and STAT5a/b, the predominant one being STAT3)

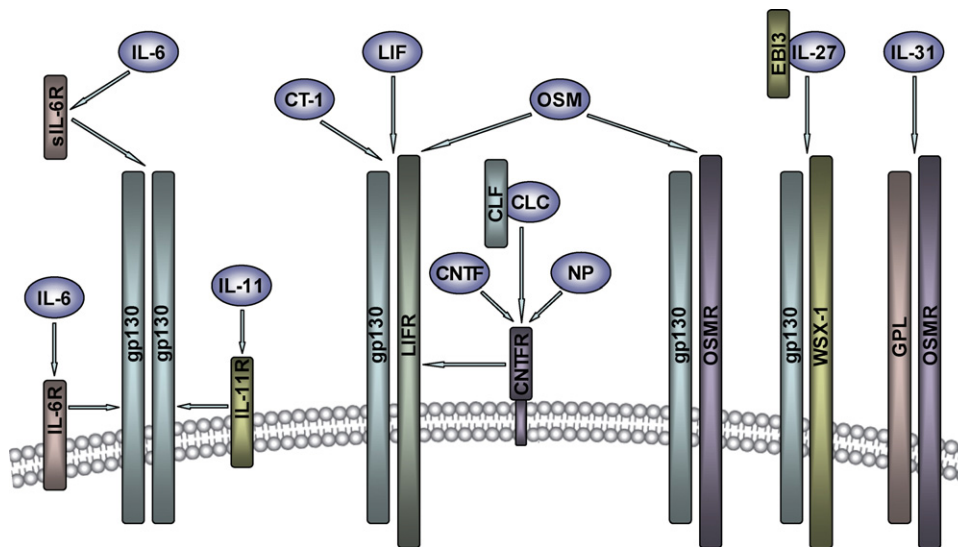


Fig. 1. Signaling-competent receptors. Cytokines first bind “specific” receptor chains (IL-6R, IL-11R, CNTFR, CLF, EBI3) which are either membrane-associated or soluble (e.g. sIL-6R). Then, they induce homo- or hetero-dimerization of the signaling-competent receptor chains gp130, LIFR, OSMR, WSX-1 or GPL.

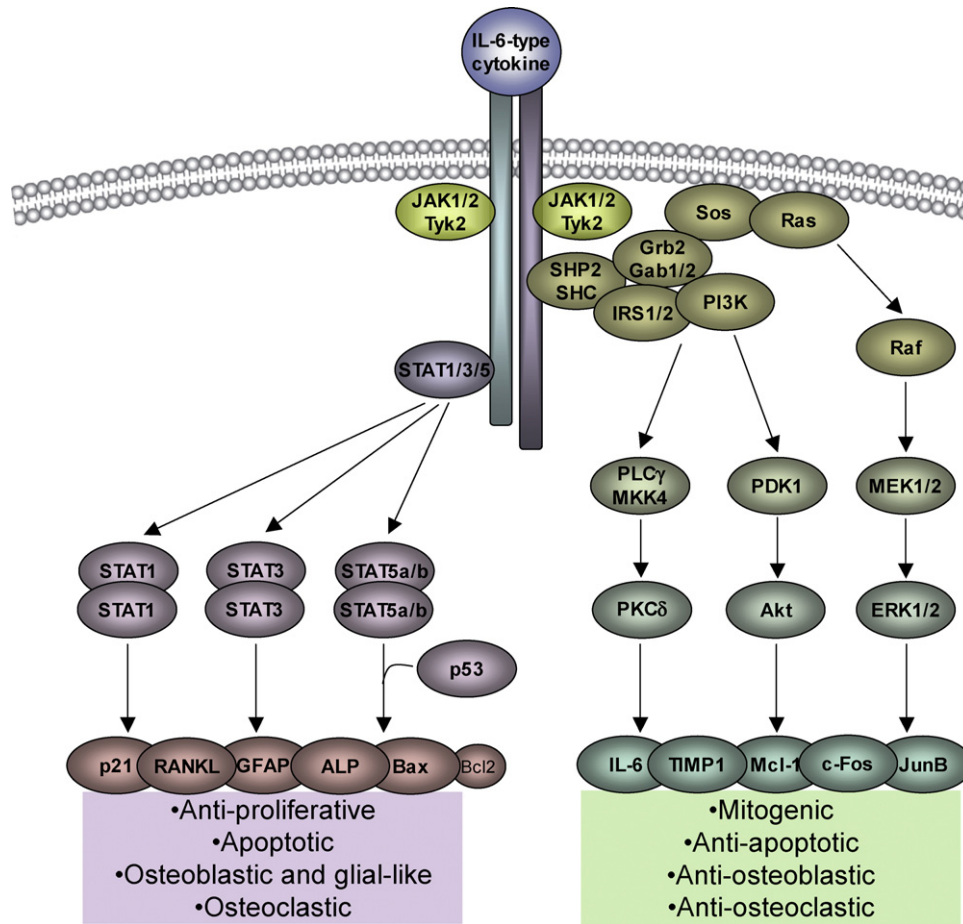


Fig. 2. Signal transduction pathways. Dimeric receptors activate Jaks which then induce activation of STATs and the kinases ERK1/2, Akt and PKCδ. STATs induce expression of genes implicated in growth inhibition, apoptosis and differentiation, whereas kinases counterbalance these signals.

or of the MAPKs [mainly ERK1/2 (extracellular regulated kinase 1/2), p38 and JNK (c-jun N-terminal kinase)] [9,10] (Fig. 2). Other signaling cascades known to be activated by IL-6-type cytokines comprise the phosphoinositide-3-kinase (PI3K)/AKT, and PKCδ pathways [9,10,11] (Fig. 2). Specificity in the signal transduction pathways can be given by the particular signaling-competent receptor complex which is activated by each IL-6-type cytokine. For example with the OSMR, the adaptor molecule Shc is recruited rather than SHP2, and mediates a higher MAPKs activation than with gp130 or LIFR [10].

### 3. Effects on bone cells

Bone remodeling is a balance between bone resorption and apposition controlled by two distinct cell types, osteoclasts and osteoblasts [12]. Osteoblasts, derived from mesenchymal stem cells, are responsible for bone apposition whereas osteoclasts are specialized in bone resorption. Osteoclasts are multinucleated cells which differentiate from hematopoietic precursors and are closely related to macrophages [12] (Fig. 3). Osteoclastic precursors differentiate into mature osteoclasts thanks to a tight interaction

with osteoblastic/stromal cells: cell–cell interactions are necessary as well as the production of soluble factors by osteoblasts. Recently, receptor activator of NF-κB ligand (RANKL) has been identified as the major cytokine

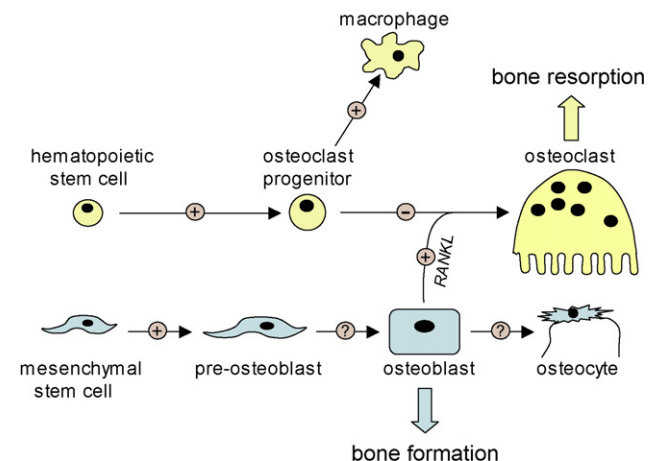


Fig. 3. Bone cells differentiation. Cytokines induce the first stage of osteoblast differentiation but have still controversial effect on the later stages. They indirectly stimulate osteoclast formation through RANKL but concomitantly directly inhibit osteoclastogenesis in favor of macrophage differentiation.

implicated in osteoblast/osteoclast communications. RANKL is expressed on stromal cells/osteoblasts and its interaction with the receptor RANK, present on osteoclast precursors and mature osteoclasts induces their differentiation and activation [12]. IL-6-type cytokines influence both osteoblasts and osteoclasts differentiation and activities through a variety of complex, often contradictory mechanisms.

### 3.1. Bone formation

Osteoblasts express low levels of IL-6R and therefore presence of sIL-6R is required for maximum IL-6's effects on these cells [4,5,13,14]. Thus, numerous reports indicated that IL-6 + sIL-6R, IL-11, LIF, CNTF and OSM enhance in vitro differentiation on osteoblasts or osteoblast precursors isolated from the calvaria or bone marrow (Fig. 3) [1–4,14–18]. These cytokines are able to increase osteoblast markers expression such as alkaline phosphatase (ALP), osteocalcin or bone sialoprotein and to enhance bone nodule formation and extracellular matrix mineralization. Activation of STAT3 is necessary for osteoblast differentiation and bone formation induced by IL-6-type cytokines (Fig. 2) [16,18]. Similarly, they can reduce proliferation of various osteoblastic cells through activation of STAT3 and enhanced expression of the cell cycle inhibitor p21<sup>WAF1</sup>, this protein being also necessary for induction of ALP by IL-6-type cytokines (Fig. 2) [18]. Finally, these cytokines can protect certain osteoblastic cells from apoptosis induced by serum depletion or TNF $\alpha$  [19].

However, other reports have shown an inhibitory effect of IL-6-type cytokines, especially IL-6 + sIL-6R, IL-11, LIF and OSM, on bone formation and marker expression in vitro, as well as a potent pro-apoptotic effects [11,20–22]. We showed that kinases such as PKC $\delta$  and ERK1/2 are implicated in these inhibitory effects on bone formation [11] whereas the transcription factors STAT5a/b and p53 act in concert to enhance the Bax/Bcl2 ratio and thus sensitize osteoblastic cells to the mitochondrial apoptotic pathway (Fig. 2) [23,24]. It is possible that these dual effects depend on the differentiation stage of the osteoblast: on precursor cells, IL-6-type cytokines would stimulate the first stages of differentiation but on more mature cells, they would prevent further stimulation (Fig. 3) [20–22]. However, considering that the terminal differentiation of osteoblasts into osteocytes is characterized by reduced osteoblastic marker expression/bone formation/proliferation and enhanced apoptosis, these cytokines could in fact induced an osteocytic phenotype (Fig. 3) [11]. Indeed, OSM can induce a star-like osteocytic morphology on transformed osteoblastic cells, as well as expression of several glial and osteocytic markers such as glial fibrillary acidic protein (GFAP) [11], sclerostin and E11 (data not shown). Further experiments are needed to determine whether induction of osteocytic differentiation is also observed in other cell systems and with other IL-6-type cytokines.

### 3.2. Bone resorption

IL-6-type cytokines can stimulate osteoclasts differentiation and bone resorption by an indirect mechanism, increasing interactions between osteoblasts and osteoclasts (Fig. 3). In co-cultures containing both osteoblasts/stromal cells and osteoclasts precursors, IL-6 + sIL-6R, IL-11, LIF, CT-1 and OSM clearly stimulate osteoclast differentiation and activity [25–27]. In fact, these cytokines induce osteoblastic production of various downstream effectors that activate osteoclast differentiation or activity, such as RANKL, IL-1, PTHrP and prostaglandin E2 (PGE2) [2,5,25–27]. Inversely TNF $\alpha$ , IL-1, PTH/PTHrP and PGE2 stimulate IL-6, IL-11 and LIF production by osteoblasts to further amplify the production of factors that activate osteoclasts [1–3,5]. Recent data indicated that induction of RANKL in osteoblasts by IL-6-type cytokines is the key event leading to their pro-resorption action, and that STAT3 was implicated in RANKL induction (Fig. 2) [25–27].

In sharp contrast, we and other groups described that IL-6, IL-27 and OSM have an inhibitory role on osteoclast formation and bone resorption. IL-6 and IL-27 reduced the RANKL-induced osteoclast formation and bone resorption obtained from purified osteoclast precursors, such as mouse bone marrow CD11b<sup>+</sup> monocytes, human circulating CD14<sup>+</sup> monocytes or the macrophage cell line RAW264.7 (Fig. 3) [28–30]. This direct inhibitory effect is associated with reduced expression of several osteoclastic markers [TRAP (acid phosphatase 5, tartrate resistant), cathepsin K, calcitonin receptor] and inhibition of RANKL signaling pathways such as activation of NF- $\kappa$ B and the MAPKs JNK and p38 [28,29]. On RAW264.7 cells, we observed that IL-6 inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis by diverting cells into the macrophage lineage (Fig. 3) [28]. Moreover, STAT3, and its relative phosphorylation on tyrosine or serine residues, appeared to be necessary for macrophage and osteoclast differentiation, respectively [28].

### 3.3. Genetic and other in vivo data in human and rodents

Various transgenic and knockout mice have been developed to determine the involvement of IL-6-type cytokines in bone remodeling in vivo. IL-6 deficient mice showed an increase bone formation whereas transgenic mice over-expressing IL-6 showed a decrease in osteoblast and osteoid, as well as a decrease in osteoclast and bone resorption [reviewed in 1, 3, 4]. Therefore, IL-6 appears to have a suppressive role on bone turnover in vivo. In contrast, IL-11 transgenic mice have increase osteoblasts and bone formation, whereas osteoclastogenesis and bone resorption were not modified. However, deletion of IL-11R suppressed osteoclast differentiation, resulting in high trabecular bone volume and reduced bone formation, suggesting that endogenous IL-11 has an important role in physiological osteoclastogenesis [31]. Transgenic mice for OSM have also impressive

osteopetrotic bones due to the stimulation of bone formation and inhibition of bone resorption [1]. Gp130 or LIFR knockout mice have a decreased trabecular bone volume and increased osteoclast number [1,3,4]. OSMR $\beta^{-/-}$  mice have normal bones but bone marrow stromal cells do not support hematopoiesis as their wild type counterparts [32].

Additional studies then established that IL-6 has a major role in various osteoarticular pathologies. IL-6 $^{-/-}$  mice were significantly protected from joint inflammation and destruction in mouse models of arthritis and were also protected from bone loss caused by oestrogen depletion, as observed in postmenopausal osteoporosis [reviewed in 2–4]. Moreover, clinical trials indicated that inhibition of IL-6 or IL-6R improves the clinical response of patients with rheumatoid arthritis [2–4,7,8]. However, IL-6 stimulates fracture healing and bone mechanical resistance [33] and systemic administration of IL-11 reduced joint inflammation and destruction in murine arthritis [3]. Over-expression of OSM induces trabecular bone loss in rats [24], induces inflammation and destruction in mouse joints, but leads also to periosteal bone apposition [34,35]. Null mutations in the LIFR gene lead to the Stüve-Wiedemann syndrome, characterized by bowing of long bones, cortical thickening and altered trabecular pattern [36]. Altogether these results indicated that IL-6-type cytokines, in spite of their use of the common receptor subunit gp130, have opposite and unexpected effects on bone formation and resorption. Moreover, a given cytokine can drive bone formation or bone loss depending on its expression levels (endogenous versus over-expression) and the pathophysiologic context.

More recently, a genetic approach for gp130 (knock-in mutations in mice) confirmed the ying/yang effects of the STATs versus MAPK pathways. These reports indicated that the gp130/STAT pathway is important to sustain osteoblast formation, RANKL production and thus osteoclast formation whereas the gp130/MAPK pathway has an inhibitory role on osteoclastogenesis (Fig. 2) [3,4,37]. Similarly, specific disruption of STAT3 in osteoblasts leads to altered osteoblast differentiation and bone loss [17]. However, hematopoietic cell-specific STAT3-deficient mice also display an osteoporotic phenotype due to the augmentation of osteoclast differentiation [38]. Therefore, the STAT signaling pathway mediates anti-proliferative, apoptotic, osteoblastic (or osteocytic) and osteoclastic signals that are counterbalanced by the MAPK signaling pathway which mediated mitogenic, anti-apoptotic, anti-osteoblastic and anti-osteoclastic signals (Fig. 2). Still there is controversy about the exact role of STAT3 in osteoclasts because it appears as a positive or negative factor depending on the experimental design. Because this transcription factor is constitutively active in monocytes/osteoclasts [28], it is possible that constitutive versus induced activation of STAT3 will dictate contradictory outcome on osteoclastogenesis (see above 3.2). In other words, it appears that (i) the activity of a given receptor complex is the result of the antagonistic role of the STAT versus MAPK pathways and

(ii) IL-6-type cytokines have non redundant role on bone remodeling in a particular pathophysiologic context presumably because they are not produced at the same site and time and because their receptor complex does not induce the same level of activated STAT versus activated MAPK.

## 4. Implication in bone-tumor development

### 4.1. The vicious cycle between tumor proliferation and associated osteolysis

Bones are the sites of various primary cancers arising from bone cells, as well as a privileged environment for metastatic development. Whereas primary bone cancers such as osteosarcoma, chondrosarcoma and Ewing sarcoma are rare malignancies, bone metastases are a frequent complication of more common cancers, occurring in up to 70% of patients with advanced breast or prostate cancer and in 15–30% of patients with various other carcinoma or sarcoma [5,39–42]. The consequences of cancer development in bone are often devastating, with severe pain, pathologic fractures, hypercalcemia, nerve compression and thus significantly impact overall quality of life and expected survival. Indeed, proliferation of cancer cells in bones is coupled to inflammation, enhanced RANKL expression, osteolysis and abnormal new bone formation. Because bone is a large soil containing various immobilized growth factors such as transforming growth factor, insulin-like growth factors, fibroblast growth factors and calcium, these agents are released during bone resorption and stimulate cancer growth. Therefore, a vicious cycle is established between

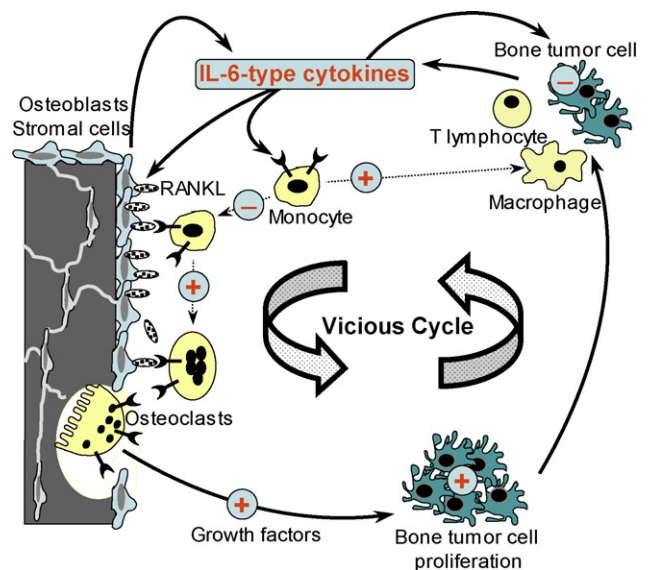


Fig. 4. The bone-tumor vicious cycle. Cytokines produced in the bone-tumor environment can stimulate (i) tumor growth inhibition (ii) immunosuppressive macrophage expansion and (iii) osteoclast formation through RANKL production. Osteolysis leads to the release of growth factors, stimulating tumor proliferation.



tumor proliferation and bone resorption (Fig. 4) [5,39–42]. Consequently, antiresorption agents such as bisphosphonates or OPG are particularly active in not only the management of cancer-associated bone resorption but also in inhibition of tumor growth in bones [5,39–42]. As observed on normal bone cells, IL-6-type cytokines have both pro- or anti-tumoral effects on cancer cells growing in the bone environment.

#### 4.2. Direct effect on tumor cells

From the beginning, IL-6-type cytokines were known as potent growth inhibitors or stimulators depending on the cancer cell type. For example, IL-6 + sIL-6R, OSM and to a lesser extent LIF and IL-11, inhibit the proliferation and block in the G1 phase of the cell cycle various cell lines obtained from melanoma [43–45], breast cancer [9], and osteosarcoma [11,15,18]. All these cancer cells have a propensity to form osteolytic bone lesions. This growth suppression and cytostatic effect is believed to occur through STATs activation and induction of cell cycle inhibitors such as p21<sup>WAF1</sup> and/or p27<sup>KIP1</sup> (Fig. 2) [15,18,44]. Alone, IL-6-type cytokines do not induce cancer cell death, but they can sensitize wild type p53 osteosarcoma, breast and colon cancer cells to apoptosis induced by various death inducers such as kinases inhibitors, UV, TNF $\alpha$  or chemotherapeutic agents (doxorubicin and cisplatin) [23,24]. This proapoptotic effect is mediated by p53 and STAT5 which induces Bax and reduces Bcl2, respectively, thus sensitizing the cells to the mitochondrial apoptotic pathway (Fig. 2) [23]. A recent study also described that IL-27 has a direct antiproliferative effect on melanoma cells, inducing alone significant apoptosis through STAT1 and IRF1 (IFN regulatory factor 1) [45].

In rodents, recombinant IL-6 and OSM also mediates tumor regression of various sarcomas and carcinoma that form lung or liver metastases [46,47] and OSM reduces melanoma growth through a direct inhibitory effect on tumor cell proliferation rather than apoptosis (data not shown). The IL-6 trans-signaling-mediated attenuation of cell proliferation is also effective in vivo, since an improved colon tumor cure was demonstrated with Hyper-IL-6 (IL-6R-IL-6 complex) combined with photodynamic therapy [48]. Similarly in IL-27 transgenic mice, the direct antiproliferative effect of this cytokine contributes to its antitumor activity [45]. In a rat model of osteosarcoma engrafted on the bone surface, we described that OSM alone does not modify the tumor burden, but in association with the kinases inhibitor Midostaurin this cytokine induces tumor apoptosis and necrosis, thus reducing the primary bone-tumor development and the incidence of lung metastasis [24]. Finally, we could demonstrate that patients whose melanoma cells are sensitive to growth inhibition by OSM and/or IL-6 have a significantly higher relapse-free survival than patients with resistant tumor cells (data not shown). Therefore, IL-6-type cytokines, especially OSM, IL-6 and

IL-27, have potent direct anti-tumor effects in vitro, in rodents and in humans, suggesting that they could be used as anti-cancer adjuvants. These findings stimulated phase I trials of intravenous interleukin-6 in solid tumor patients [7].

In contrast, IL-6-type cytokines are able to induced or sustain proliferation in vitro of various myeloma [49], melanoma [50] and prostate cancer [51] cell lines for which osteolysis participates to tumor development and metastasis. Moreover, myeloma [49], giant cell tumors of bone [52], squamous carcinoma [53,54] as well as breast [55] and prostate [56] cancer can produce IL-6, IL-11 and LIF but not OSM [1,5]. Patients with osteosarcoma, chondrosarcoma, Ewing's sarcoma, giant cell tumor of bone [57], melanoma [58] and breast cancer [55] have significant elevated levels of serum IL-6, in correlation with a poor overall survival.

For melanoma, it is clear that primary cancer cells are growth inhibited by IL-6-type cytokines but that during the metastatic process, these cells become resistant or even growth stimulated by these cytokines [43,50]. They can loose expression of OSMR $\beta$  [43], produce IL-6 as an autocrine growth factor [50] and modify the transduction pathways in such a way that growth inhibition mediated by STATs is shifted to growth promotion [59,60]. Thus, constitutively active STATs have been observed in numerous cancers and targeting this pathway appears as a potent new anti-cancer therapy [60]. For example, constitutive hyperactivation of STAT3 and STAT1 in gp130 mutant mice leads to chronic gastric inflammation with excessive IL-11 production and spontaneous development of gastric tumors [61]. STATs targets are genes involved in the cell cycle (c-myc, cyclin D1) and survival (survivin, Bcl-xl)[61]. Moreover, the PI3K/Akt signaling pathway is known to mediate the survival, and proliferative effects of IL-6 in myeloma and prostate cancer [62,63], through induced expression of cyclin A1, cyclin D1 and the anti-apoptotic protein Mcl-1 (Fig. 2) [63,64]. Similarly, activation of the Ras/ERK1/2 pathway by IL-6 sustains cancer cell proliferation, presumably through induction of immediate-early response genes such as c-fos, c-jun, and egr-1 (Fig. 2) [65]. In summary, transient STATs activation by IL-6-type cytokines is normally strong enough over the proliferative and survival signals mediated by Akt and ERK1/2 to obtain growth suppression of various cancer cells (Fig. 2), but in other cell types or when STATs are constitutively activated, all the signals can converge to induce tumor expansion.

#### 4.3. Indirect effect on the bone-tumor environment

The protumoral effects of IL-6-type cytokines are related to their ability to enhance tumor cell proliferation (see above), but also cell motility, invasion and angiogenesis (through VEGF production) [24,55,60]. Moreover, several lines of evidences indicated that these cytokines could also be implicated in tumor growth in bone. First, it was demonstrated that cancer cells producing high amount of IL-6 induce bone resorption. Considering that bone resorption leads to the

release of several bone-associated growth factors, this effect is presumably relevant to refill the vicious cycle between bone resorption and tumor proliferation (Fig. 4). Thus, IL-6 enhances hypercalcemia mediated by PTHrP in mice engrafted with CHO cells engineered to produce these proresorption agents [66]. Similarly, a neutralizing antibody against IL-6 prevents bone loss in a model of squamous carcinoma associated with hypercalcemia [53,54]. Second, various cancer cells induce production of IL-6, IL-11 and LIF by osteoblasts or bone marrow stromal cells and these cytokines then induced bone resorption (Fig. 4). For example, breast cancer cells induce osteoclast formation by stimulating IL-11 production by osteoblasts [67]. Similarly, metastatic A375 melanoma cells induce osteolysis by activating TGF $\beta$ , which leads IL-11 production by osteoblasts to promote bone resorption [68]. For myeloma in the bone marrow micro-environment, the tumor cells induce IL-6 secretion from stromal cells through both cytokine-mediated paracrine mechanisms and cellular adhesion [49,69]. A similar situation occurs with metastatic neuroblastoma or mammary tumors which produce or induce the production of IL-6/LIF by bone marrow stromal cells to sustain bone resorption and tumor growth [70,71]. In all these cases, a synergy exists between the IL-6-type cytokines and other proresorption agents such as PTHrP, PGE2, IL-1 and RANKL. Therefore, despite their potent direct growth inhibitory effect, IL-6-type cytokines that are produced in the bone-tumor environment, mainly IL-6, IL-11 and LIF, participate in bone resorption and thus in tumor proliferation in bone (Fig. 4).

However, the effect of IL-6-type cytokines on bone formation and resorption is dual, and they can either induce bone loss or bone formation (see Section 3 above). For example, we have to consider that IL-6-type cytokines directly inhibit osteoclast formation and potently induce macrophage differentiation [28–30]. In line with this observation, IL-6 and LIF have recently been implicated in the expansion of tumor-associated macrophages (TAMs), a key component of the tumor immunosuppressive and angiogenic environment (Fig. 4) [72], suggesting that a balance exists between IL-6-type cytokines (inducing macrophages) versus TNF $\alpha$ -type cytokines (inducing osteoclasts). This balance will presumably dictate important feature of the bone tumors, such as inflammation, immunosuppression and osteolysis.

So what about the other IL-6-type cytokines? OSM is the major growth inhibitor in the IL-6 family, especially for osteosarcoma, breast cancer and melanoma, and is not produced by cancer cells or osteoblasts [1,9,11]. In a model of rats engrafted with osteosarcoma fragments at the surface of the tibia, systemic over-expression of OSM by gene transfer directly sensitizes the bone-tumor cells to apoptosis/necrosis induced by the kinase inhibitor Midostaurin, and therefore limits pulmonary metastasis and enhances survival [24]. However, OSM also induces severe side effects such as bone loss, generalized inflammation and cachexia, leading to death if the doses are too high [24]. This feature is not

specific, as IL-6 and LIF also induce significant weight loss, together with fever and flu-like symptoms [7,66]. Bone loss induced by OSM is associated with reduction in both serum osteoblastic markers (alkaline phosphatase, osteocalcin) and osteoclastic markers [TRAP, C-terminal telopeptides of type I collagen (CTX)], suggesting that OSM reduces both bone formation and resorption in vivo [24]. Thus, it is possible that OSM directly limits bone-tumor development through tumor cell apoptosis but also inhibits osteolysis and therefore indirectly reduces the release of growth factors important for tumor proliferation in bone. Inversely, it is also possible that OSM will locally and/or transiently induce RANKL expression by osteoblasts as described in vitro [25–27], thus inducing osteoclast formation and bone resorption. Future experiments will certainly help discriminate between these possibilities and will describe more precisely the OSM effects on osteolysis associated with bone tumors.

Interestingly, IL-27 is also able to limit cancer progression and pulmonary metastasis by activating the antitumor immune response (CD8+ T lymphocytes and NK cells), by inhibiting angiogenesis and through direct anti-proliferative and pro-apoptotic effects on the tumor cells [45]. This cytokine can inhibit osteoclast formation in vitro [30] but its effect on tumor cells in the bone environment is unknown. In vitro, CNTF induces differentiation of various neuroblastoma cell lines [73] whereas CLC is a growth factor for myeloma [74]. IL-31 is able to inhibit proliferation of some epithelial cancer cells [75]. No data are available regarding CT-1 and NP effects on cancer cells. In general, our knowledge on these cytokines' effect in tumor-associated osteolysis is very poor and any prediction based on their in vitro effects is very difficult.

## 5. Conclusion

Nowadays, there is no doubt that IL-6-type cytokines are important regulators of bone pathophysiology. However, their exact role is still an enigma because they appear as double-edged swords. They have both positive and negative effects on osteoblast and osteoclast differentiation, they can drive encouraging anti-cancer effects but in the bone environment, they appear to participate in bone resorption and tumor growth. Moreover, IL-6-type cytokines are not redundant and can have opposite effects. Thus, IL-6 has a key destructive role in rheumatoid arthritis, osteoporosis and bone cancers, whereas IL-11 possesses striking anti-inflammatory effects in arthritis and Bowel/Crohn's disease. We have to admit that our knowledge of the role of other IL-6-type cytokines on bone and cancer is limited and future experiments will certainly reveal important new clues, especially with OSM and IL-27 that possess intriguing anticancer properties. Similarly, a better comprehension of the dual signaling pathways activated by IL-6-type cytokines will allow the design of new reagents that block the unwanted effect but keep the best side of these cytokines.

## Acknowledgments

This work was supported by Inserm, the French Ministère de la Recherche, La Ligue Contre le Cancer (comité Grand Ouest) and the Région Pays de la Loire (project CIMATH: Ciblage Moléculaire et Applications Thérapeutiques). BB is a recipient from a fellowship from the French Ministère de la Recherche, MB from the Région Pays de la Loire.

## References

- [1] Heymann D, Rousselle AV. gp130 Cytokine family and bone cells. *Cytokine* 2000;12:1455–68.
- [2] Liu XH, Kirschenbaum A, Yao S, Levine AC. The role of the interleukin-6/gp130 signaling pathway in bone metabolism. *Vitam Horm* 2006;74:341–55.
- [3] Wong PK, Campbell IK, Egan PJ, Ernst M, Wicks IP. The role of the interleukin-6 family of cytokines in inflammatory arthritis and bone turnover. *Arthritis Rheum* 2003;48:1177–89.
- [4] Franchimont N, Wertz S, Malaise M. Interleukin-6: an osteotropic factor influencing bone formation? *Bone* 2005;37:601–6.
- [5] Kwan Tat S, Padrines M, Theoleyre S, Heymann D, Fortun Y. IL-6, RANKL, TNF- $\alpha$ /IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;15:49–60.
- [6] Houssiau FA, Devogelaer JP, Van Damme J, de Deuchaisnes CN, Van Snick J. Interleukin-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides. *Arthritis Rheum* 1988;31:784–8.
- [7] Sosman JA, Aronson FR, Sznol M, Atkins MB, Dutcher JP, Weiss GR, et al. Concurrent phase I trials of intravenous interleukin 6 in solid tumor patients: reversible dose-limiting neurological toxicity. *Clin Cancer Res* 1997;3:39–46.
- [8] Ding C, Jones G. Technology evaluation: MRA, Chugai. *Curr Opin Mol Ther* 2003;5:64–9.
- [9] Grant SL, Begley CG. The oncostatin M signalling pathway: reversing the neoplastic phenotype? *Mol Med Today* 1999;5:406–12.
- [10] Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 2003;374(Pt 1):1–20.
- [11] Chipoy C, Berreur M, Couillaud S, Pradal G, Vallette F, Colombeix C, et al. Downregulation of osteoblast markers and induction of the glial fibrillary acidic protein by oncostatin M in osteosarcoma cells require PKC $\delta$  and STAT3. *J Bone Miner Res* 2004;19:1850–61.
- [12] Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK, Fortun Y, Redini F, Heymann D. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;15:457–75.
- [13] Taguchi Y, Yamamoto M, Yamate T, Lin SC, Mocharla H, DeTogni P, et al. Interleukin-6-type cytokines stimulate mesenchymal progenitor differentiation toward the osteoblastic lineage. *Proc Assoc Am Phys* 1998;110:559–74.
- [14] Erices A, Conget P, Rojas C, Minguell JJ. Gp130 activation by soluble interleukin-6 receptor/interleukin-6 enhances osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 2002;280:24–32.
- [15] Bellido T, Borba VZ, Roberson P, Manolagas SC. Activation of the Janus kinase/STAT (signal transducer and activator of transcription) signal transduction pathway by interleukin-6-type cytokines promotes osteoblast differentiation. *Endocrinology* 1997;138:3666–76.
- [16] Takeuchi Y, Watanabe S, Ishii G, Takeda S, Nakayama K, Fukumoto S, et al. Interleukin-11 as a stimulatory factor for bone formation prevents bone loss with advancing age in mice. *J Biol Chem* 2002;277:49011–8.
- [17] Itoh S, Udagawa N, Takahashi N, Yoshitake F, Narita H, Ebisu S, et al. A critical role for interleukin-6 family-mediated Stat3 activation in osteoblast differentiation and bone formation. *Bone* 2006;39:505–12.
- [18] Bellido T, O'Brien CA, Roberson PK, Manolagas SC. Transcriptional activation of the p21 (WAF1, CIP1, SDI1) gene by interleukin-6 type cytokines. A prerequisite for their pro-differentiating and anti-apoptotic effects on human osteoblastic cells. *J Biol Chem* 1998;273:21137–44.
- [19] Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Parfitt AM, Manolagas SC. Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. *J Bone Miner Res* 1998;13:793–802.
- [20] Malaval L, Aubin JE. Biphasic effects of leukemia inhibitory factor on osteoblastic differentiation. *J Cell Biochem* 2001;81:63–70.
- [21] Malaval L, Liu F, Vernallis AB, Aubin JE. GP130/OSMR is the only LIF/IL-6 family receptor complex to promote osteoblast differentiation of calvaria progenitors. *J Cell Physiol* 2005;204:585–93.
- [22] Falconi D, Aubin JE. LIF inhibits osteoblast differentiation at least in part by regulation of HAS2 and its product hyaluronan. *J Bone Miner Res* 2007;22:1289–300.
- [23] Chipoy C, Brounais B, Trichet V, Battaglia S, Berreur M, Oliver L, et al. Sensitization of osteosarcoma cells to apoptosis by Oncostatin M depends on STAT5 and p53. *Oncogene* 2007;26:6653–64.
- [24] Brounais B, Chipoy C, Mori K, Charrier C, Battaglia S, Richards CD, et al. Oncostatin M induces bone loss and sensitizes rat osteosarcoma to the anti-tumor effect of Midostaurin in vivo. *Clin Cancer Res* 2008;14:5400–9.
- [25] Palmqvist P, Persson E, Conaway HH, Lerner UH. IL-6, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M stimulate bone resorption and regulate the expression of receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF- $\kappa$ B in mouse calvaria. *J Immunol* 2002;169:3353–62.
- [26] O'Brien CA, Gubrij I, Lin SC, Saylor RL, Manolagas SC. STAT3 activation in stromal/osteoblastic cells is required for induction of the receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand and stimulation of osteoclastogenesis by gp130-utilizing cytokines or interleukin-1 but not 1,25-dihydroxyvitamin D3 or parathyroid hormone. *J Biol Chem* 1999;274:19301–8.
- [27] Kim S, Yamazaki M, Shevde NK, Pike JW. Transcriptional control of receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand by the protein kinase A activator forskolin and the transmembrane glycoprotein 130-activating cytokine, oncostatin M, is exerted through multiple distal enhancers. *Mol Endocrinol* 2007;21:197–214.
- [28] Duplomb L, Baud'huin M, Charrier C, Berreur M, Trichet V, Blanchard F, et al. IL-6 inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis by diverting cells into the macrophage lineage: key role of Serine727 phosphorylation of STAT3. *Endocrinology* 2008;149:3688–97.
- [29] Yoshitake F, Itoh S, Narita H, Ishihara K, Ebisu S. IL-6 directly inhibits osteoclast differentiation by suppressing rank signaling pathways. *J Biol Chem* 2008;283:11535–40.
- [30] Kamiya S, Nakamura C, Fukawa T, Ono K, Ohwaki T, Yoshimoto T, et al. Effects of IL-23 and IL-27 on osteoblasts and osteoclasts: inhibitory effects on osteoclast differentiation. *J Bone Miner Metab* 2007;25:277–85.
- [31] Sims NA, Jenkins BJ, Nakamura A, Quinn JM, Li R, Gillespie MT, et al. Interleukin-11 receptor signaling is required for normal bone remodeling. *J Bone Miner Res* 2005;20:1093–102.
- [32] Tanaka M, Hirabayashi Y, Sekiguchi T, Inoue T, Katsuki M, Miyajima A. Targeted disruption of oncostatin M receptor results in altered hematopoiesis. *Blood* 2003;102:3154–62.
- [33] Rozen N, Lewinson D, Bick T, Jacob ZC, Stein H, Soudry M. Fracture repair: modulation of fracture-callus and mechanical properties by sequential application of IL-6 following PTH 1-34 or PTH 28-48. *Bone* 2007;41:437–45.
- [34] Richards CD. Matrix catabolism in arthritis: priming the guns with oncostatin M. *J Rheumatol* 2004;31:2326–8.
- [35] de Hooge AS, van de Loo FA, Bennink MB, de Jong DS, Arntz OJ, Lubberts E, et al. Adenoviral transfer of murine oncostatin M elicits

- periosteal bone apposition in knee joints of mice, despite synovial inflammation and up-regulated expression of interleukin-6 and receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand. *Am J Pathol* 2002;160:1733–43.
- [36] Dagonneau N, Scheffer D, Huber C, Al-Gazali LI, Di Rocco M, Godard A, et al. Null leukemia inhibitory factor receptor (LIFR) mutations in Stuve-Wiedemann/Schwartz-Jampel type 2 syndrome. *Am J Hum Genet* 2004;74:298–305.
- [37] Sims NA, Jenkins BJ, Quinn JM, Nakamura A, Glatt M, Gillespie MT, et al. Glycoprotein 130 regulates bone turnover and bone size by distinct downstream signaling pathways. *J Clin Invest* 2004;113:379–89.
- [38] Zhang Z, Welte T, Troiano N, Maher SE, Fu XY, Bothwell AL. Osteoporosis with increased osteoclastogenesis in hematopoietic cell-specific STAT3-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;328:800–7.
- [39] Roodman GD. Mechanisms of bone metastasis. *N Engl J Med* 2004;350:1655–64.
- [40] Wittrant Y, Théoleyre S, Chipoy C, Padrines M, Blanchard F, Heymann D, et al. RANKL/RANK/OPG: new therapeutic targets in bone tumours and associated osteolysis. *Biochim Biophys Acta* 2004;1704:49–57.
- [41] Jones DH, Nakashima T, Sanchez OH, Kozieradzki I, Komarova SV, Sarosi I, et al. Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. *Nature* 2006;440:692–6.
- [42] Lamoureux F, Richard P, Wittrant Y, Battaglia S, Pilet P, Trichet V, et al. Therapeutic relevance of osteoprotegerin gene therapy in osteosarcoma: blockade of the vicious cycle between tumor cell proliferation and bone resorption. *Cancer Res* 2007;67:7308–18.
- [43] Lacreusette A, Nguyen JM, Pandolfino MC, Khammari A, Dreno B, Jacques Y, et al. Loss of oncostatin M receptor beta in metastatic melanoma cells. *Oncogene* 2007;26:881–92.
- [44] Kortylewski M, Heinrich PC, Mackiewicz A, Schniertshauer U, Klingmuller U, Nakajima K, et al. Interleukin-6 and oncostatin M-induced growth inhibition of human A375 melanoma cells is STAT-dependent and involves upregulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27/Kip1. *Oncogene* 1999;18:3742–53.
- [45] Yoshimoto T, Morishima N, Mizoguchi I, Shimizu M, Nagai H, Oniki S, et al. Antiproliferative activity of IL-27 on melanoma. *J Immunol* 2008;180:6527–35.
- [46] Mule JJ, McIntosh JK, Jablons DM, Rosenberg SA. Antitumor activity of recombinant interleukin 6 in mice. *J Exp Med* 1990;171:629–36.
- [47] Ouyang L, Shen LY, Li T, Liu J. Inhibition effect of Oncostatin M on metastatic human lung cancer cells 95-D in vitro and on murine melanoma cells B16BL6 in vivo. *Biomed Res* 2006;27:197–202.
- [48] Wei LH, Baumann H, Tracy E, Wang Y, Hutson A, Rose-John S, et al. Interleukin-6 trans signalling enhances photodynamic therapy by modulating cell cycling. *Br J Cancer* 2007;97:1513–22.
- [49] Treon SP, Anderson KC. Interleukin-6 in multiple myeloma and related plasma cell dyscrasias. *Curr Opin Hematol* 1998;5:42–8.
- [50] Lu C, Sheehan C, Rak JW, Chambers CA, Hozumi N, Kerbel RS. Endogenous interleukin 6 can function as an in vivo growth-stimulatory factor for advanced-stage human melanoma cells. *Clin Cancer Res* 1996;2:1417–25.
- [51] Lu Y, Zhang J, Dai J, Dehne LA, Mizokami A, Yao Z, et al. Osteoblasts induce prostate cancer proliferation and PSA expression through interleukin-6-mediated activation of the androgen receptor. *Clin Exp Metastasis* 2004;21:399–408.
- [52] Ohsaki Y, Takahashi S, Scarcez T, Demulder A, Nishihara T, Williams R, et al. Evidence for an autocrine/paracrine role for interleukin-6 in bone resorption by giant cells from giant cell tumors of bone. *Endocrinology* 1992;131:2229–34.
- [53] Yoneda T, Nakai M, Moriyama K, Scott L, Ida N, Kunitomo T, et al. Neutralizing antibodies to human interleukin 6 reverse hypercalcemia associated with a human squamous carcinoma. *Cancer Res* 1993;53:737–40.
- [54] Nagai Y, Yamato H, Akaogi K, Hirose K, Ueyama Y, Ikeda K, et al. Role of interleukin-6 in uncoupling of bone in vivo in a human squamous carcinoma coproducing parathyroid hormone-related peptide and interleukin-6. *J Bone Miner Res* 1998;13:664–72.
- [55] Knupfer H, Preiss R. Significance of interleukin-6 (IL-6) in breast cancer (review). *Breast Cancer Res Treat* 2007;102:129–35.
- [56] Smith PC, Hobisch A, Lin DL, Culig Z, Keller ET. Interleukin-6 and prostate cancer progression. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001;12:33–40.
- [57] Rutkowski P, Kaminska J, Kowalska M, Ruka W, Steffen J. Cytokine and cytokine receptor serum levels in adult bone sarcoma patients: correlations with local tumor extent and prognosis. *J Surg Oncol* 2003;84:151–9.
- [58] Soubrane C, Rixe O, Meric JB, Khayat D, Mouawad R. Pretreatment serum interleukin-6 concentration as a prognostic factor of overall survival in metastatic malignant melanoma patients treated with biochemotherapy: a retrospective study. *Melanoma Res* 2005;15:199–204.
- [59] Florenes VA, Lu C, Bhattacharya N, Rak J, Sheehan C, Slingerland JM, et al. Interleukin-6 dependent induction of the cyclin dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 is lost during progression of human malignant melanoma. *Oncogene* 1999;18:1023–32.
- [60] Kortylewski M, Jove R, Yu H. Targeting STAT3 affects melanoma on multiple fronts. *Cancer Metastasis Rev* 2005;24:315–27.
- [61] Ernst M, Najdovska M, Grail D, Lundgren-May T, Buchert M, Tye H, et al. STAT3 and STAT1 mediate IL-11-dependent and inflammation-associated gastric tumorigenesis in gp130 receptor mutant mice. *J Clin Invest* 2008;118(May 5):1727–38.
- [62] Hideshima T, Nakamura N, Chauhan D, Anderson KC. Biologic sequelae of interleukin-6 induced PI3-K/Akt signaling in multiple myeloma. *Oncogene* 2001;20:5991–6000.
- [63] Wegiel B, Bjartell A, Culig Z, Persson JL. Interleukin-6 activates PI3K/Akt pathway and regulates cyclin A1 to promote prostate cancer cell survival. *Int J Cancer* 2008;122:1521–9.
- [64] Kuo ML, Chuang SE, Lin MT, Yang SY. The involvement of PI 3-K/Akt-dependent up-regulation of Mcl-1 in the prevention of apoptosis of Hep3B cells by interleukin-6. *Oncogene* 2001;20:677–85.
- [65] Kim H, Baumann H. Dual signaling role of the protein tyrosine phosphatase SHP-2 in regulating expression of acute-phase plasma proteins by interleukin-6 cytokine receptors in hepatic cells. *Mol Cell Biol* 1999;19:5326–38.
- [66] de la Mata J, Uy HL, Guise TA, Story B, Boyce BF, Mundy GR, et al. Interleukin-6 enhances hypercalcemia and bone resorption mediated by parathyroid hormone-related protein in vivo. *J Clin Invest* 1995;95:2846–52.
- [67] Morgan H, Tumber A, Hill PA. Breast cancer cells induce osteoclast formation by stimulating host IL-11 production and downregulating granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *Int J Cancer* 2004;109:653–60.
- [68] Morinaga Y, Fujita N, Ohishi K, Tsuruo T. Stimulation of interleukin-11 production from osteoblast-like cells by transforming growth factor-beta and tumor cell factors. *Int J Cancer* 1997;71:422–8.
- [69] Bataille R, Chappard D, Klein B. The critical role of interleukin-6, interleukin-1B and macrophage colony-stimulating factor in the pathogenesis of bone lesions in multiple myeloma. *Int J Clin Lab Res* 1992;21:283–7.
- [70] Sohara Y, Shimada H, Minkin C, Erdreich-Epstein A, Nolte JA, DeClerck YA. Bone marrow mesenchymal stem cells provide an alternate pathway of osteoclast activation and bone destruction by cancer cells. *Cancer Res* 2005;65:1129–35.
- [71] Akatsu T, Ono K, Katayama Y, Tamura T, Nishikawa M, Kugai N, et al. The mouse mammary tumor cell line, MMT060562, produces prostaglandin E2 and leukemia inhibitory factor and supports osteoclast formation in vitro via a stromal cell-dependent pathway. *J Bone Miner Res* 1998;13:400–8.
- [72] Duluc D, Delneste Y, Tan F, Moles MP, Grimaud L, Lenoir J, et al. Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. *Blood* 2007;110:4319–30.



- [73] Sleeman MW, Anderson KD, Lambert PD, Yancopoulos GD, Wiegand SJ. The ciliary neurotrophic factor and its receptor CNTFR alpha. *Pharm Acta Helv* 2000;74:265–72.
- [74] Burger R, Bakker F, Guenther A, Baum W, Schmidt-Arras D, Hideshima T, et al. Functional significance of novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3 (cardiotrophin-like cytokine) for human myeloma cell growth and survival. *Br J Haematol* 2003;123:869–78.
- [75] Chattopadhyay S, Tracy E, Liang P, Robledo O, Rose-John S, Baumann H. Interleukin-31 and oncostatin-M mediate distinct signaling reactions and response patterns in lung epithelial cells. *J Biol Chem* 2007;282:3014–26.

International Bone and Mineral Society (IBMS). His research interests include IL-6-type cytokines, their function in osteolytic pathologies as well as in the development of solid tumors in bone.

**Bénédicte Brounais** is a PhD student in the laboratory INSERM, ERI 7. She received her master degree in biotechnology and therapeutic research at the Nantes University in France. She is currently an associate teacher in histology at the Nantes University. Her research interests include the role of Oncostatin M and IL-31 in osteoblast and osteoclast differentiation and transformation.



**Frédéric Blanchard** is an associate professor in the laboratory INSERM, ERI 7 entitled “Pathophysiology of bone resorption” at the Nantes University (EA3822) in France and is co-director of the team “Cellular and molecular mechanisms involved in osteolysis” in this laboratory. Dr. Blanchard received his PhD degree in cytokine and cancer from the Nantes University and completed post-doctoral training at the Roswell Park Cancer Institute in Buffalo, New York. He is currently employed by the French National Institute for Health and Medical Research (INSERM) as a full time researcher. Dr. Blanchard is member of several societies implicated in bone biology, such as the European Calcified Tissue Society (ECTS) and the

**Laurence Duplomb** is an engineer in the laboratory INSERM, ERI 7. She received her PhD degree from the Nantes University and completed post-doctoral training at the Center for Diabetes Research, University of Texas Southwestern Medical center in Dallas. Her research interests include the identification of new modulators of osteoclast differentiation.

**Marc Baud’huin** is a PhD student in the laboratory INSERM, ERI 7. He received his PharmD degree in cytokine and osteoclastogenesis from the Nantes University. His research interests include the identification of new modulators of osteoclast differentiation.

## IV. Les objectifs de la thèse

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

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

La première partie de cette étude a consisté à étudier les effets de l'OSM sur la biologie de l'os et des ostéosarcomes. Pour cela, nous avons tout d'abord analysé les effets de cette cytokine sur la prolifération mais également sur la viabilité cellulaire. En effet, bien connaître l'impact obtenu sur la survie des cellules tumorales et des cellules saines est essentiel dans le cadre d'un traitement anti-cancéreux. Or, le rôle de l'OSM dans la viabilité cellulaire a été peu étudié et reste méconnu. Généralement, cette cytokine est considérée comme cytostatique (elle bloque la prolifération mais sans induire de mort cellulaire). Cependant, elle semble induire l'apoptose dans la lignée tumorale Y-1 (Auernhammer et al., 2004) et elle protégerait au contraire les cellules d'ostéosarcome MG63 de cette mort cellulaire programmée (Auernhammer et al., 2004; Jilka et al., 1998). C'est pourquoi nous avons souhaité étudier la viabilité de différentes lignées d'ostéosarcomes mais aussi d'ostéoblastes non transformés en présence d'OSM, et les mécanismes moléculaires impliqués dans ses effets.

Avant d'envisager l'OSM comme potentiel agent thérapeutique dans le cadre de l'ostéosarcome, il était également nécessaire de préciser son rôle sur le remodelage osseux et plus particulièrement sur la différenciation ostéoblastique. En effet, l'OSM a des activités complexes et mal comprises sur la différenciation ostéoblastique, stimulant les premières étapes de l'ostéogenèse mais inhibant l'expression des marqueurs ostéoblastiques et la formation osseuse à des étapes plus tardives. De plus, elle est capable d'induire l'expression de la GFAP dans des cellules issues d'ostéosarcome de rat, suggérant une différenciation de type glial ou ostéocytaire (Chipoy et al., 2004). Il était donc nécessaire de préciser son action sur l'ostéogenèse, en particulier, après un traitement à long terme.

Enfin, dans le but de confirmer les études réalisées *in vitro*, une étude *in vivo* a pu être menée. Celle-ci a porté sur le modèle d'ostéosarcome de rat OSRGA, traité par de l'OSM administré grâce à un adénovirus et combiné ou non à d'autres agents thérapeutiques (anti-cancéreux, anti-résorption). L'objectif de cette étude, au-delà de la démonstration d'un effet anti-tumoral potentiel de l'OSM, était d'analyser l'effet de cette cytokine sur le tissu osseux sain ou pathologique. L'OSM peut-elle favoriser la résorption osseuse et donc indirectement la prolifération tumorale en site osseux ? L'OSM favorise-t-elle la dissémination métastatique des ostéosarcomes ?

La seconde partie de ce travail a consisté à étudier les effets des autres cytokines de la famille de l'IL-6 sur la physiopathologie osseuse. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'IL-31, une cytokine récemment identifiée produite par les lymphocytes T helper de type 2. L'IL-31 est impliquée dans les pathologies inflammatoires telles que la dermatite atopique. Bien que les autres cytokines de la famille de l'IL-6 soient très actives sur les cellules osseuses, à ce jour, aucune étude n'a décrit d'effet de l'IL-31 sur le tissu osseux. Il était donc important de déterminer son action potentielle sur le remodelage osseux et plus particulièrement sur la différenciation ostéoblastique et ostéoclastique *in vitro* puis *in vivo*. De façon plus générale, cette étude a comparé les effets des cytokines de la famille de l'IL-6 sur les cellules osseuses afin de préciser leur redondance ou leur spécificité d'action.

De façon générale, ce travail de thèse avait donc pour objectif :

- d'apporter des preuves de concept sur l'utilisation de l'OSM comme agent adjuvant dans le traitement de l'ostéosarcome
- d'initier des études sur l'implication potentielle de l'IL-31 dans le remodelage osseux physiopathologique.

## **PARTIE I**

# **Effets de l'Oncostatine M sur la biologie de l'os et des ostéosarcomes**

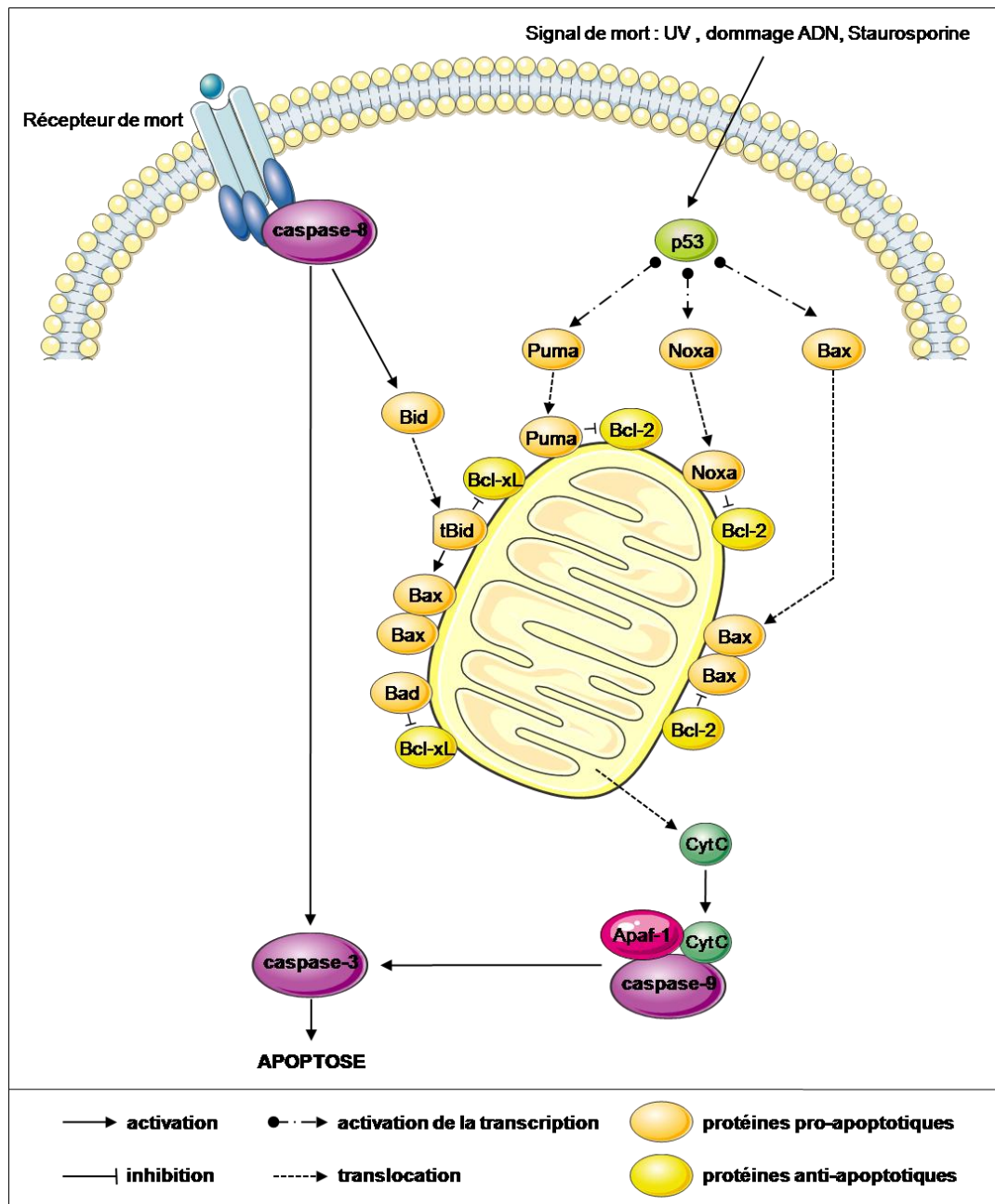
# I. OSM et viabilité cellulaire

## Introduction

Le développement d'un cancer met en jeu de nombreuses altérations moléculaires, et plus particulièrement des mutations de gènes impliqués dans le contrôle de la prolifération et de la survie de la cellule. L'exemple le plus fréquemment décrit est la mutation du gène codant la protéine p53, protéine suppresseur de tumeur appelée "gardienne du génome". Dans des cellules saines, p53 est responsable de l'arrêt du cycle cellulaire en réponse à un stress ou à un dommage à l'ADN, permettant la réparation de la lésion avant la reprise du cycle cellulaire. Dans le cas où le dommage est trop important, p53 peut orienter la cellule vers une mort par apoptose, éliminant ainsi les cellules ayant un ADN endommagé. Plus de la moitié des cancers humains (dont les ostéosarcomes) présentent une protéine p53 mutée, ce qui permet à ces cellules d'échapper au processus d'apoptose et de proliférer, contribuant à la formation tumorale. Une voie de recherche consiste donc à rétablir cette mort programmée dans les cellules tumorales (Bossi and Sacchi, 2007).

Deux voies d'induction de l'apoptose sont classiquement décrites : la voie des récepteurs de mort et la voie mitochondriale (Cory and Adams, 2002; Fleischer et al., 2006; Schneider and Tschopp, 2000). La première voie est activée par la fixation sur son récepteur membranaire d'un ligand de la famille du TNF et se caractérise par l'activation de la caspase-8 puis de la caspase-3 (Walczak and Krammer, 2000). La seconde met en jeu la protéine p53 et les protéines de la famille Bcl-2, qui peuvent être pro-apoptotiques (comme Bax, Bad, Noxa, Puma) ou anti-apoptotiques (comme Bcl-2, Bcl-xl). Le rôle pro-apoptotique de p53 repose sur le fait qu'elle peut à la fois neutraliser des molécules anti-apoptotiques telles que Bcl-2 et Bcl-xl, mais aussi induire la transcription de Bax, Noxa ou Puma (Mihara et al., 2003; Thornborrow and Manfredi, 1999). Le ratio entre ces différentes molécules et leurs nombreuses interactions détermineront le devenir de la cellule. En cas de signal apoptotique, les membres pro-apoptotiques déclencheront le relargage de cytochrome c de la mitochondrie vers le cytosol, la formation de l'apoptosome et enfin l'activation de la caspase-3, effectrice de cette mort cellulaire (Adams and Cory, 1998; Green and Evan, 2002; Kelekar and Thompson, 1998)(figure 26). L'apoptose se caractérise alors par la destruction des

membranes, la condensation de la chromatine, la fragmentation de l'ADN et la formation de corps apoptotiques.



*Figure 26 : Schéma des deux voies de signalisation de l'apoptose :*

- la voie des récepteurs de mort faisant intervenir la caspase-8 qui peut cliver directement la caspase-3, effectrice de l'apoptose mais également activer par clivage une protéine de la famille Bcl-2, appelée Bid (tBid : Bid tronquée)
- la voie apoptotique mitochondriale impliquant les protéines anti- et pro-apoptotiques de la famille Bcl-2. Cette voie est associée au relargage dans le cytosol de cytochrome c qui s'associe avec Apaf-1 et la caspase-9 pour former l'apoptosome qui va ensuite activer par clivage la caspase-3.

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

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

## Article 2

### « La sensibilisation à l'apoptose des cellules d'ostéosarcome par l'Oncostatine M dépend de STAT5 et p53 »

Chipoy C, **Brounais B**, Trichet V, Battaglia S, Berreur M, Oliver L, Juin P, Rédini F, Heymann D, Blanchard F. *Oncogene*. 2007 Oct 11;26(46):6653-64.

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

Les résultats obtenus montrent que l'OSM seule inhibe la prolifération des ostéoblastes et ostéosarcomes sans induire de mort cellulaire. Cependant, elle sensibilise les cellules tumorales à l'apoptose déclenchée par différents inducteurs de mort, tels que la Staurosporine (Sts), les UV ou le TNF $\alpha$ . Cette apoptose est médiée par la voie mitochondriale, caractérisée par l'activation des caspases-3 et -9. L'analyse des protéines impliquées dans cette cascade apoptotique a révélé la modulation de nombre d'entre elles, et notamment l'activation par phosphorylation de la protéine suppresseur de tumeur p53, l'induction de la protéine pro-apoptotique Bax et la réduction de la protéine anti-apoptotique Bcl-2. Une étude des mécanismes liés à l'augmentation du ratio Bax/Bcl2 a par la suite permis de démontrer que les molécules p53 et STAT5, toutes deux activées par l'OSM, sont responsables de l'induction de Bax et de la réduction de Bcl-2 respectivement.

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



## ORIGINAL ARTICLE

**Sensitization of osteosarcoma cells to apoptosis by oncostatin M depends on STAT5 and p53**C Chipoy<sup>1,2</sup>, B Brounais<sup>1,2</sup>, V Trichet<sup>1,2</sup>, S Battaglia<sup>1,2</sup>, M Berreur<sup>1,2</sup>, L Oliver<sup>3</sup>, P Juin<sup>3</sup>, F Rédini<sup>1,2</sup>, D Heymann<sup>1,2</sup> and F Blanchard<sup>1,2</sup><sup>1</sup>INSERM, ERI 7, Nantes, France; <sup>2</sup>Université de Nantes, Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, EA3822, Nantes, France and <sup>3</sup>INSERM, U601, Nantes, France

**Oncostatin M (OSM), a cytokine of the interleukin-6 family, induces growth arrest and differentiation of osteoblastic cells into glial-like/osteocytic cells. Here, we asked whether OSM regulates apoptosis of normal or transformed (osteosarcoma) osteoblasts. We show that OSM sensitizes cells to apoptosis induced by various death inducers such as staurosporine, ultraviolet or tumor necrosis factor- $\alpha$ . Apoptosis is mediated by the mitochondrial pathway, with release of cytochrome *c* from the mitochondria to the cytosol and activation of caspases-9 and -3. DNA micro-arrays revealed that OSM modulates the expression of Bax, Bad, Bnip3, Bcl-2 and Mcl-1. Pharmacological inhibitors, dominant-negative signal transducer and activator of transcriptions (STATs), stable RNA interference and knockout cells indicated that the transcription factors p53 and STAT5, which are activated by OSM, are implicated in the sensitization to apoptosis, being responsible for Bax induction and Bcl-2 reduction, respectively. These results indicate that, in addition to growth arrest and induced differentiation, OSM also sensitizes normal and transformed osteoblasts to apoptosis by a mechanism implicating (i) activation and nuclear translocation of STAT5 and p53 and (ii) an increased Bax/Bcl-2 ratio. Therefore, association of OSM with kinase inhibitors such as Sts represents new therapeutic opportunities for wild-type p53 osteosarcoma.**

*Oncogene* (2007) 26, 6653–6664; doi:10.1038/sj.onc.1210492; published online 30 April 2007

**Keywords:** osteosarcoma; osteoblast; oncostatin M; STAT5; p53; apoptosis

**Introduction**

Apoptosis, or programmed cell death, plays an important role in embryonic development and in the

control of cell number during the life. Deregulation of apoptosis occurs in a lot of diseases, and more particularly in the tumorigenesis process. The tumor suppressor p53 plays a central role in the control of genomic integrity by inducing cell-cycle arrest or apoptosis in damaged cells, and its inactivation is implicated in half of all human tumors (Haupt *et al.*, 2003; Oren, 2003). Osteosarcomas are rare primitive bone tumors arising from osteoblasts, the cells responsible for bone apposition. The molecular etiology of osteosarcoma is still controversial but it could be related to the loss of function of Rb and/or p53 (Wadayama *et al.*, 1994; Fuchs and Pritchard, 2002). Patient survival is closely related to the response of the tumor cells to chemotherapy, reaching 60–70% at 5 years in the best series and only 30% when pulmonary metastases are detected at the time of diagnosis. Thus, a better understanding of osteoblast/osteosarcoma biology is needed to develop alternative or adjuvant therapeutic strategies.

Oncostatin M (OSM) is a cytokine of the interleukin-6 (IL-6) family. Binding of OSM to its receptor complex (gp130-OSMR $\beta$ ) triggers the activation of two main pathways: the JAK-signal transducer and activator of transcription (STAT) (with STAT1, STAT3 and STAT5) and the mitogen-activated protein kinase (with extracellular signal-regulated kinase (ERK)  $\frac{1}{2}$ ) signaling pathways (Auguste *et al.*, 1997; Chen and Benveniste, 2004). Like other IL-6 type cytokines, OSM plays a crucial role in inflammation, immune response, hematopoiesis, liver and neuronal regeneration (Kamiya *et al.*, 1999; Chen and Benveniste, 2004). Specific effects of OSM include the renal inflammatory response (Baumann *et al.*, 2000) and differentiation of fetal hepatocytes (Kamiya *et al.*, 1999). Moreover, OSM is the most active IL-6 type cytokine to inhibit, via STAT3 and p21<sup>WAF1</sup>, the proliferation of various solid tumor cell lines such as osteosarcoma (Bellido *et al.*, 1997, 1998), melanoma, hepatoma and breast cancer (Grant and Begley, 1999).

The inhibitory effect of OSM on osteosarcoma cell proliferation is tightly coupled to the induced differentiation. We have previously showed that OSM has opposing effects on osteosarcoma or non-transformed osteoblasts, depending on the stage of differentiation (Chipoy *et al.*, 2004). On poorly differentiated cells,

Correspondence: Dr C Chipoy or Dr F Blanchard, Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, Faculté de Médecine, 1 rue Gaston Veil, F-44035 Nantes cedex 1, France.

E-mails: celine.chipoy@univ-nantes.fr or frederic.blanchard@univnantes.fr

Received 22 May 2006; revised 7 March 2007; accepted 28 March 2007; published online 30 April 2007

OSM enhances osteoblastic markers expression, and their capacity to form mineralized bone nodules. On the contrary, OSM reduces these markers on mature osteoblasts and osteosarcoma with an osteoblastic phenotype. Moreover, OSM induces glial fibrillary acidic protein expression, indicating a glial-like or osteocytic terminal differentiation. The kinase PKC $\delta$  and the transcription factor STAT3 are implicated in these effects of OSM (Chipoy *et al.*, 2004).

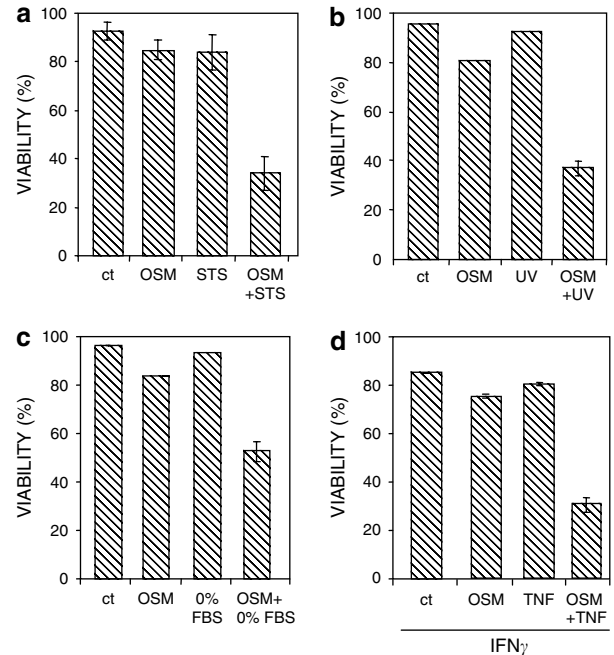
In human bone, 50–70% of osteoblasts undergo apoptosis and only a minority becomes osteocytes or lining cells (Jilka *et al.*, 1998). Hormones, growth factors and cytokines (estrogen, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Fas ligand and transforming growth factor- $\beta$ ) in the bone environment control osteoblast apoptosis, thus influencing bone formation in diseases such as osteoporosis (Jilka *et al.*, 1998). Given the strong interaction between proliferation, differentiation and apoptosis, and their key role in regulating osteoblast/osteocyte functions, we asked here whether OSM could also regulate apoptosis of normal or transformed osteoblasts. Few studies focused on the effects of OSM on apoptosis, and the conclusions were opposite according to the model. A recent study has shown that OSM induces apoptosis in adrenocortical Y-1 tumor cell line, implicating the JAK-STAT pathway and caspase-3 activation (Auernhammer *et al.*, 2004). On the other hand, OSM was able to protect MG63 osteosarcoma cells from apoptosis induced by an anti-Fas antibody by preventing the loss of Bcl-2 protein (Jilka *et al.*, 1998).

Here, we show that OSM sensitizes various osteosarcoma cell lines or osteoblastic cells to apoptosis induced by Staurosporine (Sts) or other death inducers. Apoptosis induced by OSM+Sts is mediated by the mitochondrial pathway, with an increased Bax/Bcl-2 ratio, cyt *c* release from the mitochondria and activation of caspases-9 and -3. The transcription factors STAT5 and p53 are implicated in this sensitization, being responsible for Bcl-2 reduction and Bax induction respectively.

## Results

### OSM enhances cell death in association with different death inducers

To test whether OSM could regulate apoptosis in osteosarcoma cells, we examined the effects of OSM pretreatment on cell death induced by different death inducers. First, OSRGA rat osteosarcoma cells were pretreated with OSM (100 ng/ml) for 3 days, and then a low dose of Sts (100 nM), a protein kinase inhibitor known to induce apoptosis, was added overnight. While neither OSM nor Sts alone induced significant cell death, pretreatment with OSM sensitized OSRGA cells to Sts-induced cell death (viability reduced by more than 60%; Figure 1a). A minimum of 24–48 h of OSM pretreatment was needed to observe the sensitization effect of OSM (data not shown). Higher concentrations of Sts (1  $\mu$ M) induced cell death in OSRGA cells



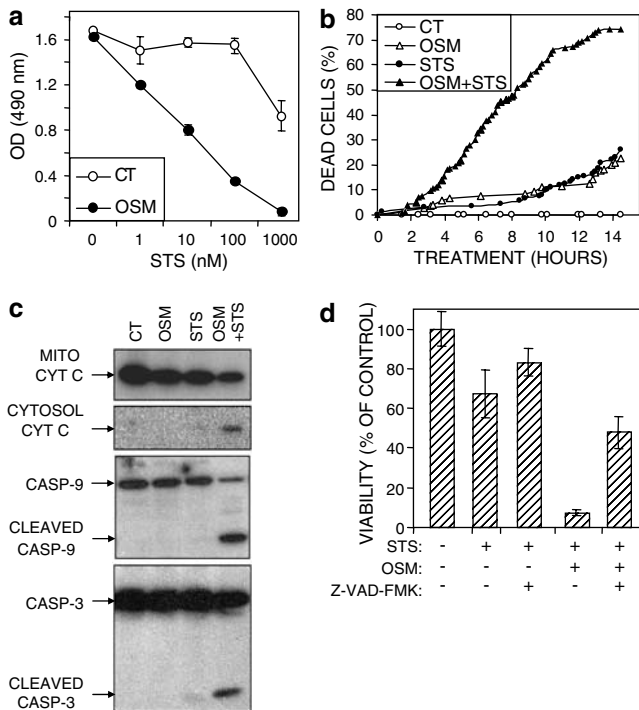
**Figure 1** OSM induces cell death in association with different death inducers. (a–c) OSRGA cells were pretreated with OSM (100 ng/ml) for 3 days. Then cells were treated with (a) Sts 100 nM, (b) UV 500 J/m<sup>2</sup>, (c) FBS starvation. After 24 h cell viability was quantified by Trypan blue staining. (d) Cells were pretreated with INF- $\gamma$  (100 ng/ml) with or without OSM (100 ng/ml) for 3 days. Then cells were treated with OSM and/or TNF- $\alpha$  (100 ng/ml) for three additional days. Viability was quantified by Trypan blue staining. Bars represent the mean  $\pm$  s.d. FBS, fetal bovine serum; INF, interferon; OSM, oncostatin M; UV, ultraviolet.

pretreated or not with OSM (data not shown and Figure 2a).

Next, we examined the effects of other death inducers like ultraviolet (UV), serum starvation and TNF- $\alpha$  treatment (Figure 1b–d). Because OSRGA cells were resistant to cell death induced by TNF- $\alpha$ , we also made a pretreatment with interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) which is known to enhance cell death most presumably by inducing death receptors expression (Jilka *et al.*, 1998). Thus, OSRGA cells were pretreated with OSM (and/or IFN- $\gamma$ ) for 3 days, and then death signals were applied: 500 J/m<sup>2</sup> for UV radiation (followed by 24 h of culture), 24 h for serum starvation and 3 days for TNF- $\alpha$ . With this three death inducers, OSM-treated cells underwent cell death (50–60% of dead cells), whereas the death inducers alone were far less effective. Thus, these results indicated that OSM can sensitize OSRGA cells to cell death induced by different death inducers, whatever their mechanism of proapoptotic action.

### Apoptosis induced by OSM + Sts is caspase dependent

To characterize better the sensitization effect of OSM, we focused on the combination OSM + Sts. OSRGA cells were treated with or without OSM for 3 days, and increasing concentrations of Sts were added overnight.



**Figure 2** Cell death induced by OSM + Sts is associated with caspases-3 and -9 activation. OSRGA cells were pretreated or not with OSM (100 ng/ml for 3 days), then Sts (100 nM, except for **a**) was added as indicated. **(a)** Cell viability was assessed by an XTT assay with increasing concentrations of Sts (1–1000 nM) added overnight. **(b)** The percentage of dead cells was determined by a time lapse experiment. **(c)** Sts was added for 5 h and whole cell lysates were analysed by western blotting for caspases-3 and -9. For cyt *c*, mitochondria or cytosol fractions were analysed. **(d)** Sts was added overnight and cell viability was assessed by an XTT assay in the presence or not of the caspase inhibitor Z-VAD-FMK. In all cases, similar results were observed in three independent experiments. OSM, oncostatin M; Sts, staurosporine. CT, control; OD, optical density.

As shown in Figure 2a, viability of OSM-treated cells was strongly reduced compared to non-treated cells. The IC<sub>50</sub> were around 10 nM of Sts on OSM-treated cells and more than 1 μM of Sts on non-treated cells.

Through time-lapse experiments, cell death (Figure 2b and Supplementary movies 1–4) was analysed in a time-dependent manner. With the combination OSM + Sts, 50% of the cells died within 8 h versus 5–7% with OSM or Sts alone. At the end of the experiments (14 h), more than 70% of the cells died when treated with OSM + Sts. Typical apoptotic figures were observed with membrane blebbing and nuclear condensation (Supplementary movies 1–4). Apoptosis was confirmed by Hoechst staining showing extensive nuclear fragmentation (data not shown).

To investigate the apoptotic pathway implicated, localization of cyt *c* and activation of several caspases were studied by western blot analysis (Figure 2c). While treatment of these cells with OSM or Sts alone did not induce cleavage of caspases-3 or -9, these proteases were effectively cleaved and activated with the combination OSM + Sts. Similarly, release of cyt *c* from the

mitochondria to the cytosol was observed only with OSM + Sts. Treatment of OSRGA cells with OSM and UV also induced activation of caspases-3 and -9 (Supplementary Figure 1). Moreover, the use of the pan-caspase inhibitor (Z-Val-Ala-Asp(OMe)-CH<sub>2</sub>F) (Z-VAD-FMK) prevented apoptosis induced by OSM + Sts, although this prevention was not total (Figure 2d). All these results suggested that OSM pretreatment followed by Sts or other death stimuli-induced apoptosis in OSRGA cells by a mechanism mainly dependent on caspase activation and implicating the mitochondrial caspase-9 specific pathway.

### OSM modulates expression of proapoptotic and anti-apoptotic Bcl-2 family proteins

As the mitochondrial apoptotic pathway is regulated by the Bcl-2 family of proteins, we examined the effects of OSM on their mRNA and protein expression levels in OSRGA cells. We performed similar analyses on MG63 human osteosarcoma cells that are effectively growth inhibited by OSM (Table 1; Bellido *et al.*, 1997) but are resistant to cell death induced by OSM + Sts (Table 1 and Supplementary Figure 2e). DNA micro-array experiments showed that 3 days of OSM treatment on OSRGA cells were able to increase the mRNA level of proapoptotic molecules, such as Bax, Bad, Bim, Bnip3, Bok and Bcl-xs (Table 2). Conversely, the anti-apoptotic member Bcl-2 was reduced by OSM, whereas Mcl-1 and Bcl-xl were increased. Several of these results were confirmed at the protein level by western blot experiments (Figure 3a and Table 2). Indeed, Bad and Bax proteins were upregulated more than twofold in OSRGA cells after OSM-treatment whereas Bcl-xl was increased only 1.5-fold. On the contrary, Bcl-2 and the phosphorylated inactive form of Bad were downregulated. All these modulations occurred after 24–48 h of OSM treatment (Figure 3b). We did not observe modulation in Bim or Bcl-xs protein levels despite the OSM-induced expression of their mRNA. At the concentration used (100 nM), Sts had no effect on expression of these proteins (Figure 3a).

In MG63 cells, OSM did not induced Bax or Bad expression but was still able to reduce Bcl-2 mRNA or protein levels (Table 2 and Supplementary Figure 2f). An increased Bnip-3 and Mcl-1 level, as well as a decreased Bak level, was also observed. Because MG63 cells have a rearrangement mutation of the p53 gene, which results in disruption of p53 protein function (Chandar *et al.*, 1992), we then asked whether OSM could modulate the expression/activation of this transcription factor known to regulate expression of several Bcl-2 members. In OSRGA cells (Figure 3a and b) but not in MG63 cells (Supplementary Figure 2f), we observed an induced phosphorylation of p53 after 24–48 h of OSM treatment, in correlation with an accumulation of total p53. The cellular localization of p53 was then studied by immunocytochemistry (Figure 3c). After 15 min of OSM treatment, we observed a translocation of p53 in the nucleus and after 24 h, p53 could be detected in the nucleus and cytosol.

**Table 1** Correlation between the sensitivity to apoptosis induced by OSM + Sts, the p53 status and activation of STAT5

Cells	Apoptosis <sup>a</sup>	p53 status <sup>b</sup>	STAT5 activation <sup>c</sup>	Growth inhibition <sup>d</sup>
<i>Osteosarcoma</i>				
OSRGA (rat)	+++	wt	+	+
ROS (rat)	+	wt	+	+
POS (mouse)	++	wt	+	
UMR106 (rat)	-	wt	-	-
MG63 (human)	-	Mutated	+	+
SaOS2 (human)	-	Null	+	+
U2OS (human)	-	Inactivated	-	
MNNG-HOS (human)	-	Mutated		
<i>Non-tumoral osteoblasts or precursors</i>				
ST2 (mouse)	+++	wt		
MC3T3 (mouse)	+	wt	+	
BMSC (mouse)	++	wt		
OB (mouse)	-	wt	+	+
OB (human)	-	wt	+	+
<i>Others</i>				
MEF (mouse)	+	wt		
MCF-7 (human)	++	wt	+	+
HeLa (human)	-	Inactivated	+	

Abbreviations: BMSC, bone marrow mesenchymal stem cells; MEF, mouse embryonic fibroblasts; OB, normal osteoblasts; STAT, signal transducer and activator of transcription; Sts, staurosporine. <sup>a</sup>Cells were treated with OSM for 3 days and Sts was added overnight. The percentage of dead cell (apoptosis) was determined by trypan blue exclusion and ranked as follow: +++ (>80%), ++ (between 60 and 80%), + (<60%) and - (no apoptosis). <sup>b</sup>OSRGA, POS and UMR106: p53 status was defined by immunocytochemistry using a p53 antibody specific for the wild-type (wt) protein. For other cell lines, the p53 status was already defined in the literature (Diller *et al.*, 1990; Casey *et al.*, 1991; Chandar *et al.*, 1992; Florenes *et al.*, 1994; Wei, 2005). <sup>c</sup>STAT5 activation was studied after 15 min of OSM treatment by western blotting experiment using a P-STAT5 antibody. Empty cases, not done. <sup>d</sup>Cells were treated with OSM for 3 days and growth inhibition was determined by [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation.

#### Growth inhibition by OSM is not always associated with sensitization to apoptosis

As indicated before, OSM inhibited [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation in OSRGA and MG63 cells (Table 1; Bellido *et al.*, 1997; Chipoy *et al.*, 2004). Similarly, in both OSRGA (Figure 3b) and MG63 cells (data not shown; Bellido *et al.*, 1998), p21<sup>WAF1</sup> was transiently induced within 6–24 h of OSM treatment, whereas transient phosphorylation of Rb was observed early after 15 min of cytokine treatment. SaOS2 cells were also found resistant to cell death induced by OSM + Sts, but sensitive to growth inhibition induced by OSM (Table 1). Altogether, these results indicated that the cytostatic effect of OSM is not associated with cell death in all osteosarcoma cell lines, pointing to a specific signaling pathway for apoptosis, distinct from the one used for growth arrest.

#### OSM induces cell death in association with specific kinases inhibitors

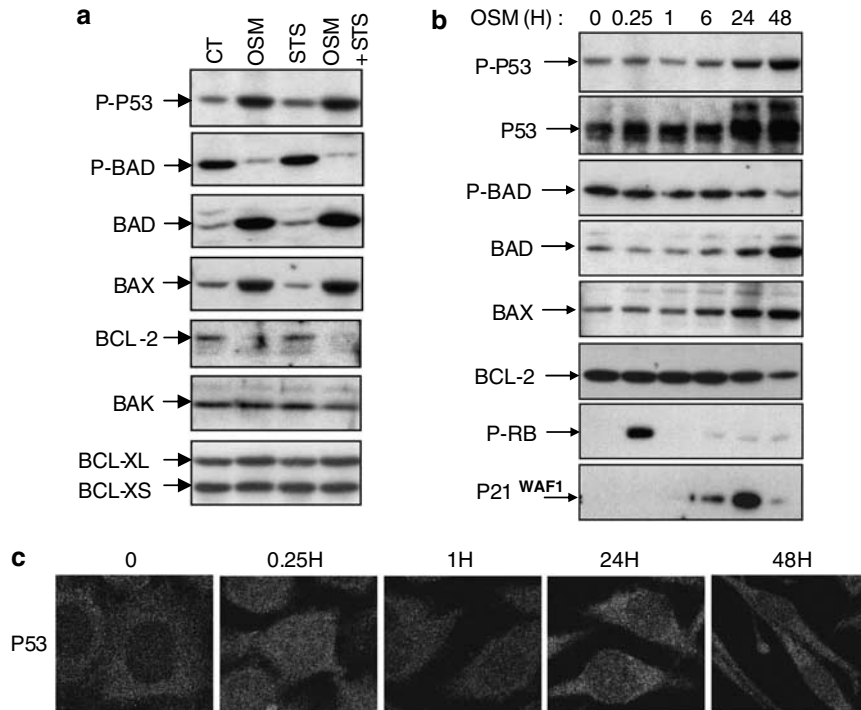
Sts is a well-known kinase inhibitor and we observed that it prevented phosphorylation/activation of ERK1/2, protein kinase C $\delta$  (PKC $\delta$ ) and Akt by OSM (Figure 4a). Thus, we tested whether specific kinase inhibitors could also induce apoptosis in association with OSM. Activity and specificity of these kinase inhibitors on signal transduction pathways activated by OSM were described previously (Chipoy *et al.*, 2004). OSRGA cells were pretreated with inhibitors for 1 h and OSM was added or not for 3 days. Figure 4b shows that PI3K, Akt and PKC $\delta$  inhibitors (respectively LY, AktI

**Table 2** Regulation of Bcl-2 family members by OSM

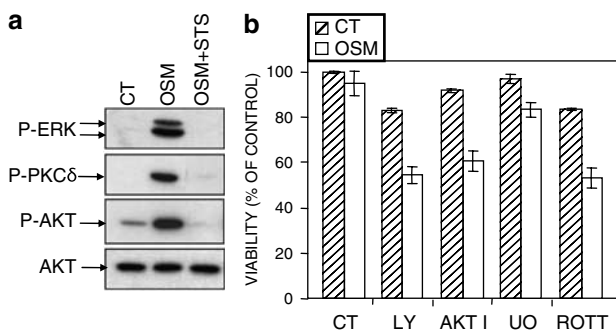
	OSRGA		MG63	
	mRNA <sup>a</sup>	Protein <sup>b</sup>	mRNA <sup>a</sup>	Protein <sup>b</sup>
<i>Proapoptotic</i>				
Bax	+	++	-	0
Bad	++	++	0	0
Bim	++	0	0	0
Bnip3	++		++	
Bok	+		0	
Bcl-xs	+	0	0	0
Bak	0	0	-	--
BID	0		0	
PUMA		0	0	
Diva	0			
<i>Anti-apoptotic</i>				
Bcl-2	-	--	-	--
Bcl-w	0		0	
A1 (Bfl-1)	0		0	
Mcl-1	++		+	++
Bcl-xl	++	+		0

Abbreviations: OSM, oncostatin M. The relative fold changes in transcript or protein expression between OSM treated and control samples were ranked as follows: -- (<0.5), - (between 0.5 and 0.8), 0 (between 0.8 and 1.25), + (between 1.25 and 2) and ++ (>2). Empty cases: not available or not done. OSRGA or MG63 cells were treated for 3 days with or without OSM. <sup>a</sup>mRNA expression levels were determined using the micro-array technique. <sup>b</sup>Expression of the indicated protein was determined by western blotting and quantitated by densitometry.

and Rottlerin), when associated with OSM, induced a reduction of at least 40% of the cell viability, while the ERK $\frac{1}{2}$  inhibitor (UO) had little effect. Kinase



**Figure 3** OSM modulates expression of proapoptotic and anti-apoptotic proteins. **(a)** OSRGA cells were treated with OSM (100 ng/ml) for 3 days and Sts (100 nM) for 5 additional hours. Whole cell lysates were analysed by western blotting for pro- phospho-p53 (ser15), Bad, Bax, Bak and Bcl-xs, and anti-apoptotic proteins: phospho-Bad (ser136), Bcl-2 and Bcl-xl. **(b)** OSRGA cells were treated with OSM for indicated times and lysates were analysed by western blotting for phospho-p53 (ser15), p53, phospho-Bad (ser136), Bad, Bax, Bcl-2, phospho-Rb (Ser795) and p21<sup>WAF1</sup>. **(c)** OSRGA cells were treated with OSM (100 ng/ml) for indicated times, fixed and immunostained with antibodies to p53. In all cases, similar results were observed in three independent experiments. OSM, oncostatin M; Sts, staurosporine.

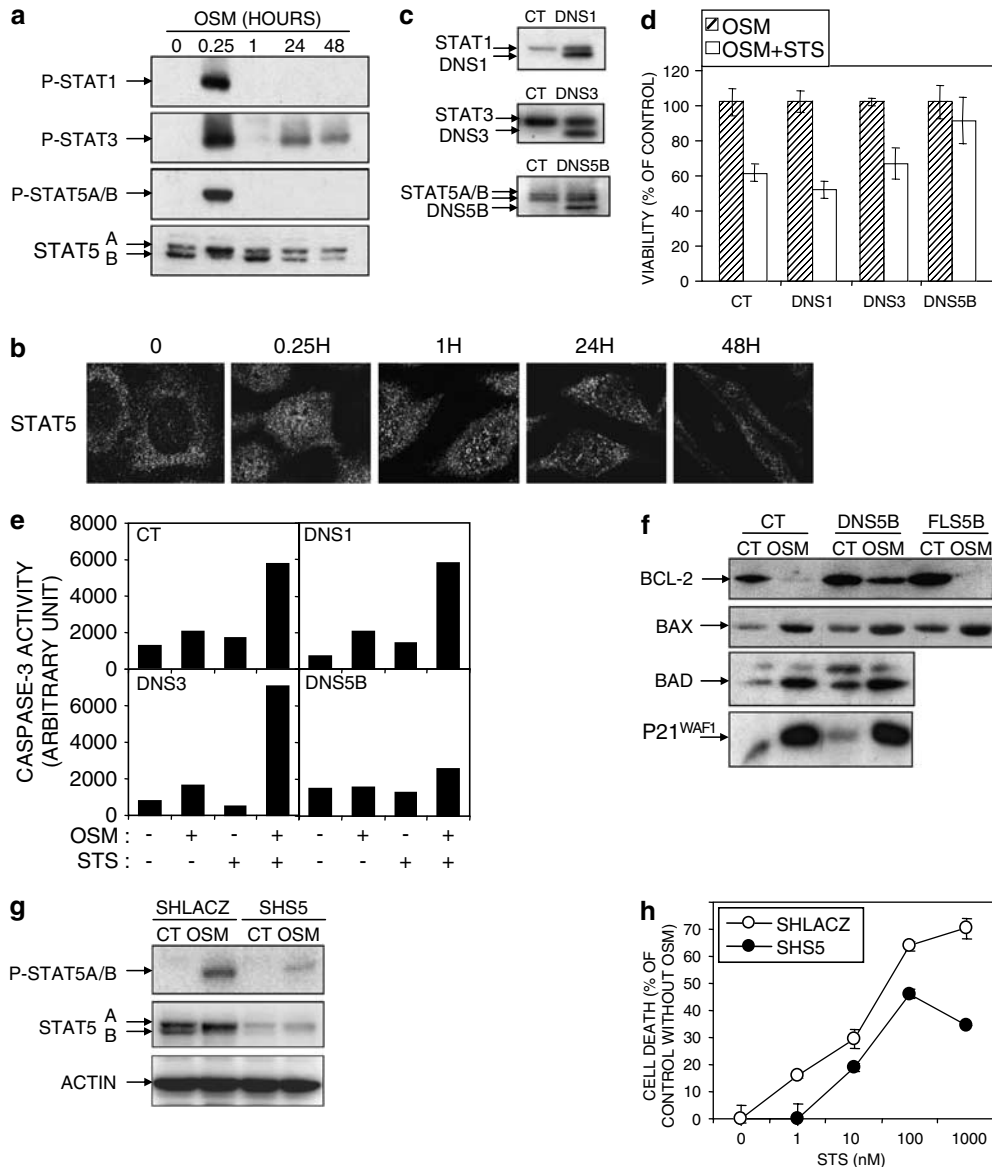


**Figure 4** OSM induces cell death in association with specific kinases inhibitors. **(a)** OSRGA cells were treated or not with Sts (1  $\mu$ M, 1 h) and then OSM (100 ng/ml) was added for 15 min. Whole cells lysates were analysed by western blotting for phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204; P-ERK), phospho-PKC $\delta$  (Thr505; P- PKC $\delta$ ), phospho-Akt (Ser476; P-Akt) and total Akt. **(b)** OSRGA cells were treated with OSM (100 ng/ml) and indicated inhibitors for 3 days. LY294002 (20  $\mu$ M); PI3K/Akt inhibitor, AktI (50  $\mu$ M); Akt inhibitor, UO126 (10  $\mu$ M); MEK/ERK inhibitor, Rottlerin (8  $\mu$ M); PKC $\delta$  inhibitor. Cell viability was assessed by an XTT assay. Bars represent the mean  $\pm$  s.d. OSM, oncostatin M; Sts, staurosporine; MEK, MAPK/ERK kinase.

inhibitors alone did not reduce cell viability below 80%. These results suggested that activation of the PI3K/Akt and PKC $\delta$  pathways by OSM induced anti-apoptotic signals, and that at least some of the Sts proapoptotic effects were due to inhibition of these kinases.

*STAT5 is necessary for apoptosis induced by OSM + Sts* STATs represent others transduction pathways known to be activated by OSM. Western blot analysis showed that OSM induced a transient (at 15 min) phosphorylation/activation of STAT1, STAT3 and STAT5 in OSRGA cells (Figure 5a). Two highly homologous and redundant STAT5 isoforms, STAT5a and STAT5b exist (Buitenhuis *et al.*, 2004) and could be detected in OSRGA cells (Figure 5a, bottom panel). OSM treatment clearly modified the electrophoretic migration of STAT5b, indicating that at least this isoform was activated by OSM as shown previously (Auguste *et al.*, 1997). By immunocytochemistry, we observed a nuclear translocation of STAT5 after 15 min of OSM treatment (Figure 5b). By 24–48 h of OSM treatment, STAT5 could be detected in the cytoplasm and nucleus, this regulation being very similar to the one observed with p53 (compare Figures 3c and 5b).

To evaluate the role of these pathways in the sensitization effect of OSM, OSRGA cells were transfected with dominant-negative STAT1, 3 or 5b (dnS1, 3 or 5b) expression vectors (Figure 5c). These dominant negative STATs were previously shown to prevent various promoters and genes induction in HepG2 and OSRGA cells (Baumann *et al.*, 2000; Chipoy *et al.*, 2004). While neither dnS1 nor dnS3 modified the cell viability, transfection of dnS5b was able to prevent apoptosis induced by OSM + Sts (Figure 5d). Similarly, only dnS5b was able to prevent the caspase-3 activity

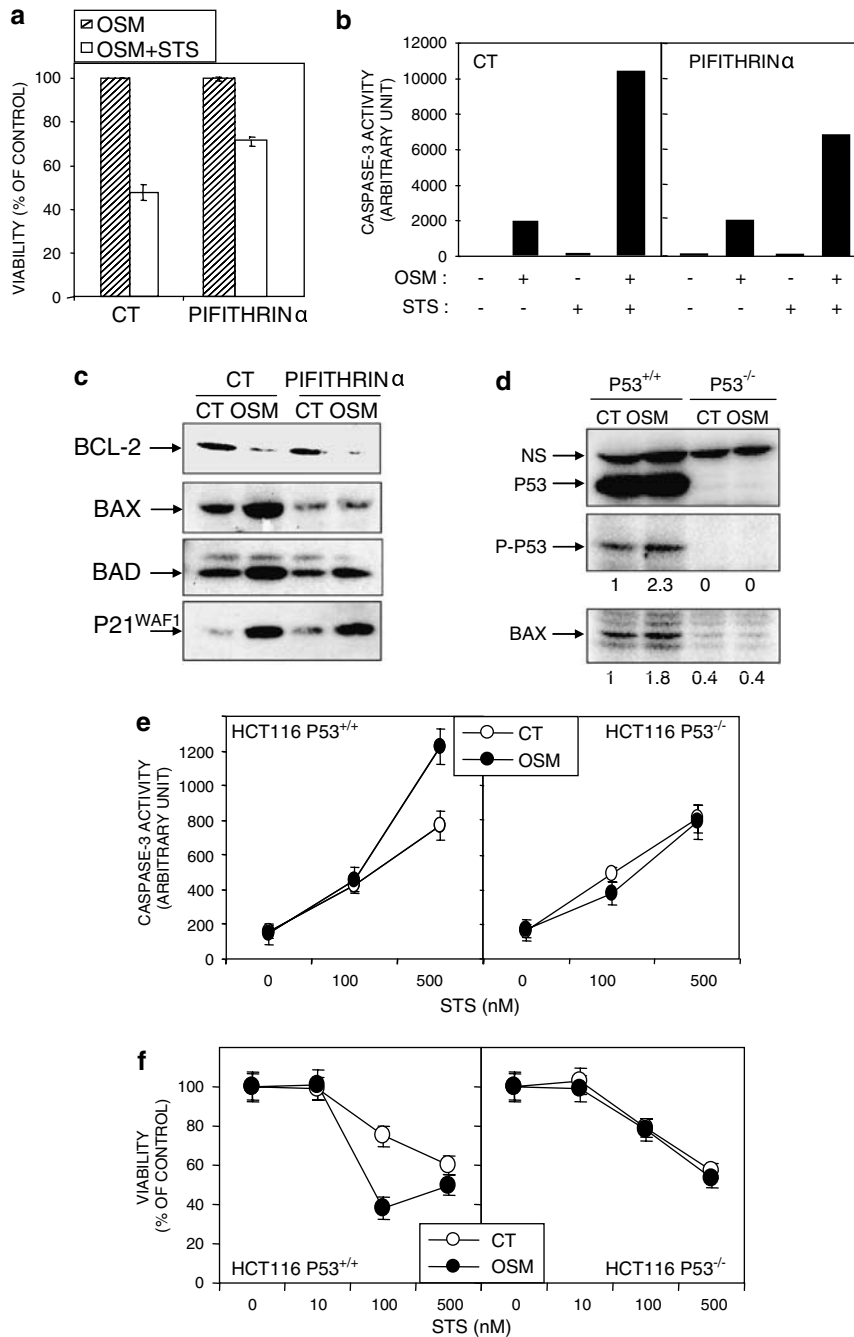


**Figure 5** STAT5 is necessary for apoptosis induced by OSM + Sts. **(a)** OSRGA cells were treated with OSM as indicated. Whole cells lysates were analysed by western blotting for phospho-STAT1 (Tyr701), phospho-STAT3 (Tyr705), phospho-STAT5 (Tyr694) and total STAT5. **(b)** OSRGA cells were treated with OSM (100 ng/ml) for indicated times, fixed and immunostained with antibodies to STAT5. **(c)** OSRGA cells were transfected with dominant-negative STAT1, 3 or 5b (dnS1, 3 or 5b) expression vectors. Whole cells lysates were analysed by western blotting for total STAT1, 3 or 5. **(d)** Transfected cells were treated with OSM (100 ng/ml for 3 days) and Sts (100 nM overnight). Controls are cells transfected with an empty vector. Cell viability was assessed by an XTT assay. **(e)** Transfected cells were treated with OSM (100 ng/ml for 3 days) and Sts (100 nM for 5 h). Caspase-3 activity was determined on cell lysates by a fluorometric assay. **(f)** OSRGA cells were transfected with dnS5b or total STAT5b (tot S5b) and treated with OSM for 48 h. Bax, Bcl-2, Bad and p21 expression was estimated by western blotting. **(g)** ShLacZ or shSTAT5 OSRGA cells were treated with OSM (100 ng/ml for 15 min) and analysed for phospho-STAT5 or total STAT5 by western blotting. Protein loading was controlled with an anti-actin. **(h)** ShLacZ or shSTAT5 OSRGA cells were treated with OSM (100 ng/ml for 3 days) and then Sts was added overnight as indicated. Cell viability was assessed by an XTT assay. Results are expressed as percent of cell death induced by OSM + Sts over cell death induced by Sts alone. In all cases, bars represent the mean  $\pm$  s.d. and similar results were observed in three independent experiments. OSM, oncostatin M; STAT, signal transducer and activator of transcription; Sts, staurosporine.

induced by the combination OSM + Sts (Figure 5e). These results suggested that activation of STAT5 by OSM is necessary for its proapoptotic effect, whereas activation of STAT1 and STAT3 seems to be dispensable.

To investigate the role of STAT5 in the modulation of the Bax/Bcl-2 ratio, the expression levels of these

proteins were studied by western blotting. Figure 5f shows that Bcl-2 expression was strongly reduced following OSM treatment in control and full length S5b transfected cells, but in dnS5b transfected cells the loss of Bcl-2 was partly prevented. On the other hand, the Bax level was increased after OSM treatment even in dnS5b or full length S5b transfected cells. Similarly,



**Figure 6** p53 is required for maximal apoptosis induced by OSM + Sts. (a–c) OSRGA cells were treated with OSM (100 ng/ml for 3 days), pifithrin  $\alpha$  (3 days at 10  $\mu$ M for (b) and 30  $\mu$ M for (c and d) and Sts (100 nM) as indicated. (a) Cell viability was assessed by an XTT assay. (b) Caspase-3 activity was determined on cell lysates by a fluorometric assay. (c) Bax, Bcl-2, Bad and p21 expression was estimated by western blotting. (d–f) Parental HCT116 cells (p53<sup>+/+</sup>) or HCT116 cells with targeted deletion of both p53 alleles (p53<sup>-/-</sup>) were treated with OSM (50 ng/ml for 3 days). (d) Protein expression was analysed by western blotting, quantified by densitometry and expressed relative to untreated p53<sup>+/+</sup> cells. (e) Cells were treated with OSM and increasing concentrations of Sts (5 h). Caspase-3 activity was determined on cell lysates by a fluorometric assay. (f) Cells were treated with OSM and increasing concentrations of Sts (over night). Cell viability was assessed by an XTT assay. Bars represent the mean  $\pm$  s.d. Similar results were observed in three (a–c) or two (d–f) independent experiments. OSM, oncostatin M; Sts, staurosporine.

induction of p21<sup>WAF1</sup> or Bad by OSM was not inhibited by the dnS5b (Figure 5e). These results indicated that STAT5 is necessary for full Bcl-2 reduction by OSM but not for the induction of Bax, p21<sup>WAF1</sup> or Bad.

To confirm the implication of STAT5 in cell death induced by OSM + Sts, we stably knocked down both

STAT5a and b in OSRGA cells by transduction with a lentiviral vector (Figure 5g). In comparison to shLacZ OSRGA cells used as control cells, shSTAT5 OSRGA cells were characterized by a 70% reduced level of STAT5a/b and a 68% reduced activation of STAT5 by OSM. ShSTAT5 OSRGA cells were less sensitive to cell

death induced by OSM + Sts, although this protection was only partial, especially at high Sts concentrations (30% reduced cell death with 100 nM Sts; Figure 5h). Considering that STAT5 was reduced by 70%, these results suggested that STAT5 molecules were not rate limiting for cell death in OSRGA cells. However, together with the results obtained with the dnS5b, these data indicated that STAT5 has a significant role in apoptosis induced by OSM + Sts.

#### *p53 is required for Bax induction*

It is well described that p53 can bind to the Bax promoter and enhance its transcription (Thornborrow and Manfredi, 1999). Since p53 was activated after OSM treatment (Figure 3), we examined the effect of a p53 inhibitor, pifithrin  $\alpha$ . As shown in Figure 6a, pifithrin  $\alpha$  partially prevented the cell death induced by the combination OSM + Sts (viability of 48% in absence versus 72% in presence of pifithrin  $\alpha$ ). Moreover, induction of caspase-3 activity was reduced by the use of pifithrin  $\alpha$  by 33% (Figure 6b). Implication of p53 in Bax induction was also confirmed by western blotting experiments. When cells were pretreated with pifithrin  $\alpha$ , OSM was not able to upregulate Bax at the protein level, whereas Bcl-2 was still decreased (Figure 6c). In the absence of OSM treatment, pifithrin  $\alpha$  was also found to reduce the basal level of Bax. In contrast, pifithrin  $\alpha$  did not prevent induction of p21<sup>WAF1</sup> or Bad by OSM (Figure 6c).

The role of p53 in sensitization to apoptosis by OSM was then confirmed by the screening of cell lines with different p53 status (Figure 6d, Table 1 and Supplementary Figure 2 for ROS, ST2 and MG63 cells). Indeed, the combination OSM + Sts did not induce apoptosis on cell lines which have a defective p53 (mutated or null), like MG63, SaOS2 and MNNG-HOS human osteosarcoma cell lines (Diller *et al.*, 1990; Casey *et al.*, 1991; Chandar *et al.*, 1992; Wei, 2005). The resistant U2OS cells are known to express wild-type p53, but inactivated by an excess of its negative regulatory partner mdm2 (Florenes *et al.*, 1994) and/or loss of its activator p14<sup>ARF</sup> (Stott *et al.*, 1998). Moreover, OSM was unable to activate STAT5 in these cells (Table 1). In contrast, osteosarcoma cells with a wild-type p53 – OSRGA, ROS, POS – were all sensitized to apoptosis driven by OSM except UMR106 cells. On this resistant cell line, OSM activated STAT3 but not STAT5 (Table 1), suggesting again that both p53 and STAT5 need to be activated. In the case of non-tumoral osteoblastic cells, OSM + Sts induced apoptosis on cells with a high rate of proliferation, such as the ST2 stromal cells, MC3T3 calvaria cells and bone marrow mesenchymal stem cells (BMSC) but had no effect on mature slowly proliferating osteoblasts in spite of a wild-type p53 (Table 1 and Supplementary Figure 2); suggesting a link between the OSM + Sts induced apoptosis and the cell cycle. In ST2 cells, OSM induced phosphorylation of p53 and expression of Bax, whereas Bcl-2 was decreased (Supplementary Figure 2d). Moreover, sensitization to cell death by OSM was not restricted to osteoblastic cells, as MCF-7 breast cancer cells and

mouse embryonic fibroblasts (MEF) were found sensitive to apoptosis induced by OSM + Sts (Table 1).

Altogether, these experiments suggested that p53, together with STAT5, is required for sensitization of osteosarcoma cells to apoptosis by OSM. However, this conclusion was tempered by the fact that these cell lines might differ in ways other than p53 and STAT5. We therefore analysed parental colorectal HCT116 cells containing wild-type p53 (p53<sup>+/+</sup>) and HCT116 cells with targeted deletions of both p53 alleles (p53<sup>-/-</sup> cells obtained by targeted homologous recombination; Bunz *et al.*, 1998). Whereas OSM increased the sensitivity of p53<sup>+/+</sup> cells for Sts, this cytokine did not affect activation of caspase-3 or cell death induced by Sts in p53<sup>-/-</sup> cells (Figure 6e and f), thus confirming the key role of p53 in apoptosis induced by OSM + Sts. Moreover, in p53<sup>+/+</sup> HCT116 cells OSM induced phosphorylation of p53 (2.3-fold) and expression of Bax (1.8-fold), whereas in p53<sup>-/-</sup> cells OSM had no effect on Bax expression (Figure 6d), thus confirming that OSM induced Bax expression through p53 activation.

## Discussion

In this study, we demonstrate for the first time that OSM sensitizes osteosarcoma and non-transformed osteoblastic cells to apoptosis induced by a variety of death inducers. OSM plus Sts induce cyt *c* release, activation of caspases-3 and -9 and a pan caspases inhibitor prevents full cell death induced by this combination, suggesting that OSM sensitizes cells to the mitochondrial apoptotic pathway. Indeed, Sts and UV are known to induce Bax conformational changes and its insertion in the outer mitochondrial membrane, leading to caspases-9 and -3 activation and cell death (Kashkar *et al.*, 2005). TNF- $\alpha$  activates the death receptor pathway, characterized by activation of caspase-8 and then caspase-3. However, extrinsic and intrinsic apoptotic pathways can be linked by the proapoptotic protein Bid. After activation by caspase-8, truncated Bid triggers relocalization of Bax in the mitochondria, release of cyt *c* and apoptosome formation (Eskes *et al.*, 2000).

Thus, all these apoptotic signals can activate the mitochondrial pathway, but how does OSM sensitize the mitochondria to suboptimal dose of apoptotic agents? Our results indicate that OSM enhances the expression of various proapoptotic Bcl-2 members, most notably Bax, Bad and Bnip-3, while the anti-apoptotic protein Bcl-2 is reduced. However, these changes are not sufficient to trigger cell death, because none of the cells tested so far undergoes apoptosis when treated with OSM alone. Also not directly tested in this study, it is therefore possible that OSM enhanced the cytoplasmic inactive pool of Bax and that following an apoptotic stimulus such as Sts or UV, a large amount of Bax undergoes a localization shift to the mitochondria, thus triggering cyt *c* release as well as caspases-9 and -3 activation. A decreased Bcl-2 and increased Bad level



would further enhance this death pathway, while the induced expression of the anti-apoptotic Mcl-1 protein would mitigate it. Moreover, OSM could regulate other proteins important for the mitochondrial apoptotic pathway or more generally for cell death. Indeed, micro-array analyses indicated that OSM modulates the mRNA expression of Apaf-1, cathepsin D and L, Hif-1 (hypoxia-inducible factor-1), COX-VIII (cyclo-oxygenase-VIII) and superoxide dismutase-2 for example. Further experiments are needed to determine their respective role in apoptosis induced by OSM.

As described previously, binding of OSM to its specific receptor triggers the activation of kinases such as ERK  $\frac{1}{2}$ , Akt and PKC $\delta$ , and of the transcription factors STAT1, 3 and 5 (Auguste *et al.*, 1997; Chen and Benveniste, 2004; Chipoy *et al.*, 2004). Here, the use of specific kinase inhibitors indicated that the PI3K/Akt and the PKC $\delta$  pathways have an anti-apoptotic function in osteosarcoma, whereas STAT5 appears necessary for caspase-3 activation and apoptosis. Thus, OSM is able to activate both proapoptotic and anti-apoptotic signals, this balance being necessary to avoid cell death as observed with OSM alone. When treated with kinase inhibitors such as Sts, osteosarcoma cells then undergo apoptosis due to an excess of STAT5 proapoptotic signals.

The role of STATs in apoptosis has been previously studied. Whereas STAT1 is clearly known to trigger apoptosis, STAT3 seems to have proapoptotic or anti-apoptotic effects depending on the cell type (Chapman *et al.*, 1999; Stephanou *et al.*, 2000; Battle and Frank, 2002). Most of the studies about STAT5 described it as an anti-apoptotic factor, leading to oncogenesis when activated (Battle and Frank, 2002; Debierre-Grockiego, 2004; Heath and Cross, 2004). Nevertheless, hyperphosphorylation of STAT5 after IL-3 treatment was shown to induce apoptosis on myeloid cells expressing a constitutively active STAT5 mutant. On these cells, the affinity of STAT5 to the promoter regions of the target genes seems to be modified by the degree and the duration of its phosphorylation, resulting in opposite effects, like proliferation, differentiation or apoptosis (Nosaka *et al.*, 1999). Here we demonstrated, by using both dominant negative STAT5 and STAT5 knock down, that this transcription factor was necessary for full Bcl-2 reduction and apoptosis induced by OSM in osteosarcoma cells.

Several lines of evidence indicate that p53 is also implicated in the sensitization to apoptosis by OSM. First, we could detect a nuclear translocation followed by an accumulation and phosphorylation/activation of p53 after OSM treatment. The exact molecular mechanisms implicated in p53 activation by OSM are currently not known but could rely on interaction with other activated kinases or STATs. Thus, a recent publication showed that p53 can interact with the transcription factor STAT1 in response to DNA damage, STAT1 acting as a co-activator for p53 (Townsend *et al.*, 2004). Second, a p53 transcriptional inhibitor, pifithrin  $\alpha$ , reduces caspase-3 activation and cell death induced by OSM + Sts. Interestingly, pifithrin  $\alpha$  totally prevented

Bax induction by OSM, suggesting that induction of this proapoptotic protein was also important for sensitization to apoptosis. Third, osteosarcoma cell lines with a defective or inactivated p53 are not sensitized to cell death induced by OSM + Sts. The key role of p53 is also confirmed in HCT116 cells with targeted deletions of p53. Therefore, wild-type p53 seems to be necessary for sensitization to apoptosis, but it is not sufficient because (i) in UMR106 cells with wild-type p53 and normal activation of STAT3, OSM does not activate STAT5 or cell death with Sts and (ii) in non-transformed slowly proliferating mature osteoblasts, OSM activates all the transduction pathways presented here but not cell death. Thus, our screening on cell lines and primary cultures (Table 1 and Supplementary Figure 2) indicates that OSM can sensitize to apoptosis normal or transformed proliferating osteoblasts as well as normal embryonic fibroblasts and breast cancer cells. To respond, OSM should be able to activate p53, STAT5, to increase the Bax/Bcl-2 ratio and thus to sensitize the mitochondria to release cyt *c* and to activate caspases-9 and -3.

Currently, we do not know whether STAT1, STAT3, STAT5 and/or p53 are also implicated in the induced expression of Bcl-xl, Mcl-1, Bnip-3, Bad, Apaf-1 and p21<sup>WAF1</sup> in OSRGA cells. Because in p53-deficient MG63 osteosarcoma cells, induction of differentiation, growth arrest and protection against apoptosis by OSM depends on STAT3 and p21<sup>WAF1</sup> (Bellido *et al.*, 1998; Jilka *et al.*, 1998), these results suggest that different STATs are involved in differentiation/cell-cycle arrest/survival (STAT3) versus sensitization to apoptosis (STAT5). Whereas the action of STAT3 does not require p53, the action of STAT5 does, implying that growth arrest by OSM is not restricted by the p53 status whereas sensitization to apoptosis is only observed in wild-type p53 osteosarcoma (Table 1).

In osteoblastic cells, OSM induces differentiation into glial/osteocytic cells characterized by reduced osteoblastic markers expression and functions (Chipoy *et al.*, 2004). Thus, OSM could affect bone formation not only by inducing differentiation but also by sensitizing proliferating osteoblasts to cell death. Whether p53 and STAT5 are implicated in this OSM-induced differentiation of osteoblasts deserves further investigations but recent *in vivo* studies with p53 knockout mice indicated that p53 inhibits osteoblast differentiation, bone development and neoplasia (Lengner *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006). Similarly, STAT5ab<sup>-/-</sup> mice, although smaller than their wild-type littermates, have an increased number of trabecular osteoblasts and bone formation (Sims *et al.*, 2000).

In conclusion, we identified p53 and STAT5 as key transcription factors used by OSM to increase Bax and decrease Bcl-2 expression respectively, and thus controlling the mitochondrial cell death pathway in osteosarcoma and proliferating osteoblastic cells. In parallel, strong anti-apoptotic signals are also activated by OSM, via the PKC $\delta$  and PI3K/Akt pathways. All these events are concomitant with, and most presumably linked to, the OSM-induced differentiation into glial/osteocytic cells, that is, the terminal differentiation of osteoblastic

cells. In human osteosarcoma, p53 mutations are frequent and we effectively found that the p53 and/or STAT5 pathways are often disrupted. The use of kinase inhibitors such as Sts in association with OSM could therefore represent new treatments for wild-type p53 osteosarcoma.

## Materials and methods

### Cell culture and reagents

The rat osteosarcoma OSRGA cell line was described previously (Chipoy *et al.*, 2004). The rat OSRGA, ROS17/2.8 (herein termed ROS) and UMR106, the murine POS-1 (POS), the human MG63, SaOS2, U2OS, MNNG-HOS, MCF-7 and HeLa cell lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, BioWhittaker, Belgium), supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS). The HCT116 cell lines with wild-type or targeted disruption of p53, a kind gift from Drs B Vogelstein and KW Kinzler (Howard Hughes Medical Institute, Baltimore, MD, USA), were cultured in McCoy's 5A medium supplemented with 10% FBS. Mouse BMSC were isolated as described previously (Chipoy *et al.*, 2004) and cultured in DMEM supplemented with 10% FBS. Primary mouse and human osteoblasts, isolated from bone explants as described (Chipoy *et al.*, 2004), as well as the mouse non-tumoral ST2 and MC3T3-E1 cell lines were cultured in RPMI 1640 (BioWhittaker, Belgium) supplemented with 10% FBS and antibiotics (100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin). MEF were kindly provided by Dr P Jourdon (INSERM U533, Nantes, France). Cells were treated with mouse (100 ng/ml) or human (50 ng/ml) recombinant OSM (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) and with Sts (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France). Z-VAD-FMK, a pan-caspase inhibitor and the kinase inhibitors LY294002 (PI3K/Akt inhibitor), AktI (Akt inhibitor), UO126 (MEK/ERK inhibitor) and Rottlerin (PKC $\delta$  inhibitor) were from Calbiochem (La Jolla, CA, USA). Pifithrin  $\alpha$ , a p53 inhibitor, was from Biomol International (Plymouth Meeting, PA, USA).

### Cell growth and viability

Cell viability was assessed by Trypan blue exclusion. Dead cells were quantitated after combining non-adherent with adherent cells released from the culture dish using trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid. The percentage of cells exhibiting both nuclear and cytoplasmic Trypan blue staining was determined using a Malassez cell. A minimum of 100 cells were counted.

Cell viability was also determined by XTT assay (Roche, Mannheim, Germany). Cells were plated into 96-wells plates at an initial density of 1500 cells/well, and cultured for 72 h in complete medium with indicated treatments before adding XTT reagents (sodium 3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate). After incubation for 5 h at 37°C, the absorbance was read at 490 nm. All assays were performed in triplicate.

For cell growth, incorporation of [<sup>3</sup>H]thymidine (Amersham, Buckinghamshire, UK) was estimated in replicate, subconfluent cell cultures as described previously (Chipoy *et al.*, 2004).

### Time-lapse microscopy

OSRGA cells were cultured in 6-well plates for 72 h with or without OSM. Time-lapse experiments begun just after adding

Sts for a duration of 14 h. Phase-contrast photos were taken every 10 min through a Leica microscope (Leica, Wetzlar, Germany), then Quick Time movies were edited with the Metamorph software. Cell division and cell death can be observed and apoptotic cells were counted in a time-dependent manner. Each condition was realized in duplicate.

### Micro-arrays

Total RNA was isolated using TRIZOL Reagent (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). From the total RNA, 20 µg were reverse-transcribed with incorporation of amino-allyl-dUTP using the CyScribe Post-Labeling Kit protocol (Amersham RPN5660-X). The amino allyl-modified cDNA were labeled with Cy3 or Cy5. RNA and labeled cDNA quality was assessed using the NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer and the Agilent 2100 bioanalyser with RNA LabChip Kits. The Cy3 and Cy5 probes were mixed and hybridized on Human 40 K OciChip or Rat 10 K OciChip. Hybridized arrays were scanned by fluorescence confocal microscopy (Scanarray 3000, GSI-Lumonics). Fluorescence values and expression ratios were analysed using GenePix Pro 5.0 image analysis software (Axon). Consolidated expression values were obtained using MADSCAN (Le Meur *et al.*, 2004).

### Western blot analysis

For total cell lysates, cells were treated as indicated, and then lysed in radioimmunoprecipitation (RIPA) buffer (150 mM NaCl, 5% Tris, pH 7.4, 1% NP-40, 0.25% Na deoxycholate, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 0.5 mM PMSF, 10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml aprotinin). Lysates were cleared of debris by centrifugation at 12000 g for 15 min. For mitochondria and cytosol fractions (cyt c release), the cytochrome c release apoptosis assay kit from Calbiochem was used. Protein concentration was determined by the BCA kit (Pierce Chemical, Rockford, IL, USA). Total cell lysate proteins (5–20 µg) were run on 10 or 12% sodium dodecyl sulfate-poly-acrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and electrophoretically transferred to Immobilon-P membrane (Millipore, Bedford, MA, USA). The membrane was blotted with antibodies to cyt c (Calbiochem), caspase-3, caspase-9, P-p53 (Ser15), Bad, Bax, Bcl-2, Bim, P-Rb (Ser795), P-ERK 1/2 (Thr202/Tyr204), P-PKC $\delta$  (Thr505), P-Akt (Ser473), Akt, P-STAT1 (Tyr701), P-STAT3 (Tyr705), STAT1 (Cell Signaling Technologies, Beverly, MA, USA), P-Bad (Ser136) (Oncogene, Cambridge, USA), Bak, Mcl-1, p21<sup>WAF1</sup>, STAT3, STAT5 (BD Biosciences, San Diego, CA, USA), Bcl-x, PUMA (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) or P-STAT5 (Tyr694) (Invitrogen) in PBS, 0.05% Tween 20, and 3% bovine serum albumin (BSA). The membrane was washed and probed with the secondary antibody coupled to horseradish peroxidase. Antibody binding was visualized with the enhanced chemiluminescence system (ECL Kit; Roche). For quantification, the emitted glow was acquired with a CCD camera (Syngene, Cambridge, UK) and analysed with the GeneTools program (Syngene).

For total p53 in OSRGA cells, 700 µg of protein were incubated with an anti-p53 antibody (Santa Cruz Biotechnology) at 4°C for 2 h. Immune complexes were isolated using protein G sepharose beads (Sigma), and washed three times with RIPA buffer. The beads were then boiled in SDS sample buffer and analysed by western blotting with antibodies to p53 (Cell Signaling Technologies).

### Transfection

Cells were transfected with polyethylenimine (PEI; kind gift from Dr Bruno Pitard; INSERM U533, Nantes, France) using

0.6  $\mu$ l PEI (10 mM), 100  $\mu$ l NaCl (150 mM), and 4  $\mu$ g of DNA for 2 ml of culture medium. The DNA used are pEX-STAT1 $\Delta$ 38C (lacking 38 C-terminal residues), pDC-STAT3 $\Delta$ 55C, pDC-STAT5b $\Delta$ 40C and pDC-STAT5b full length. The four vectors encoding STATs are a kind gift from Dr H Baumann (Buffalo, NY, USA). Preliminary experiments indicated that transfection of OSRGA cells with the pEGFP(N3) vector (Upstate Biotechnology, Charlottesville, VA, USA) gave around 80% of green fluorescent protein positive (GFP<sup>+</sup>) cells, an efficiency that is high enough to expect modifications in the majority of the cells.

#### RNA interference

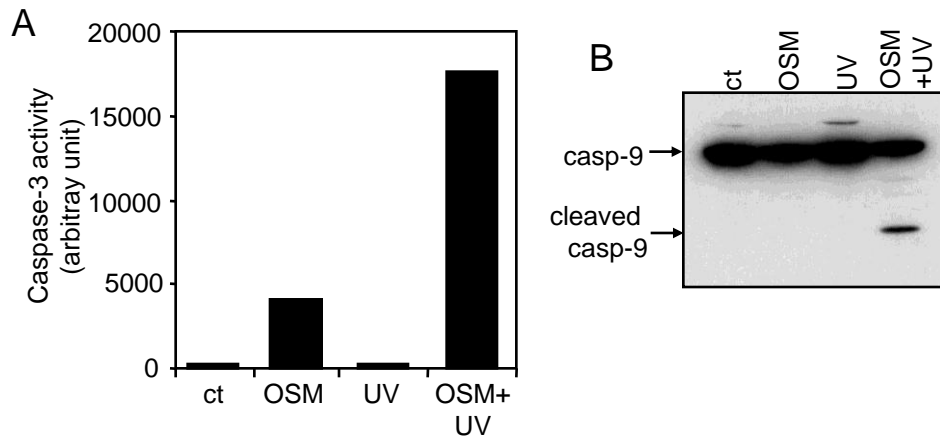
Stably modified OSRGA cells were obtained by lentiviral cell transduction essentially as described previously (Trichet *et al.*, 2006). Oligonucleotides were designed and cloned into pSUPER to produce the short hairpin RNA shSTAT5 directed against both rat STAT5a and STAT5b genes. The targeted sequence was GATCAAGCTGGGGCACTAT. The cloned oligonucleotides were controlled by sequencing (Genome Express, Meylan, France) before subcloning them with the upstream H1 promoter into the vector pFG12 (Qin *et al.*, 2003). As a control, a vector pFG12 was developed to produce shRNA targeting LacZ gene as done by Qin *et al.* (2003). The resulting constructs allowed the expression of both GFP and target-specific shRNA. They were used for lentivirus production following the protocols provided with the ViraPower Lentiviral Expression System (Invitrogen). A multiplicity of infection of 10 was used to transduce OSRGA cells. Seven days after transduction, GFP<sup>+</sup> OSRGA cells were sorted out using FACS.

#### References

- Auernhammer CJ, Dorn F, Vlotides G, Hengge S, Kopp FB, Spoettl G *et al.* (2004). The oncostatin M receptor/gp130 ligand murine oncostatin M induces apoptosis in adrenocortical Y-1 tumor cells. *J Endocrinol* **180**: 479–486.
- Auguste P, Guillet C, Fourcin M, Olivier C, Veziere J, Pouplard-Barthelax A *et al.* (1997). Signaling of type II oncostatin M receptor. *J Biol Chem* **272**: 15760–15764.
- Battle TE, Frank DA. (2002). The role of STATs in apoptosis. *Curr Mol Med* **2**: 381–392.
- Baumann H, Wang Y, Richards CD, Jones CA, Black TA, Gross KW. (2000). Endotoxin-induced renal inflammatory response. Oncostatin M as a major mediator of suppressed renin expression. *J Biol Chem* **275**: 22014–22019.
- Bellido T, Borba VZ, Roberson P, Manolagas SC. (1997). Activation of the Janus kinase/STAT (signal transducer and activator of transcription) signal transduction pathway by interleukin-6-type cytokines promotes osteoblast differentiation. *Endocrinology* **138**: 3666–3676.
- Bellido T, O'Brien CA, Roberson PK, Manolagas SC. (1998). Transcriptional activation of the p21(WAF1, CIP1, SDI1) gene by interleukin-6 type cytokines. A prerequisite for their pro-differentiating and anti-apoptotic effects on human osteoblastic cells. *J Biol Chem* **273**: 21137–21144.
- Buitenhuis M, Coffey PJ, Koenderman L. (2004). Signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5). *Int J Biochem Cell Biol* **36**: 2120–2124.
- Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, Waldman T, Zhou S, Brown JP *et al.* (1998). Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* **282**: 1497–1501.
- Casey G, Lo-Hsueh M, Lopez ME, Vogelstein B, Stanbridge EJ. (1991). Growth suppression of human breast cancer cells by the introduction of a wild-type p53 gene. *Oncogene* **6**: 1791–1797.
- Chandar N, Billig B, McMaster J, Novak J. (1992). Inactivation of p53 gene in human and murine osteosarcoma cells. *Br J Cancer* **65**: 208–214.
- Chapman RS, Lourenco PC, Tonner E, Flint DJ, Selbert S, Takeda K *et al.* (1999). Suppression of epithelial apoptosis and delayed mammary gland involution in mice with a conditional knockout of Stat3. *Genes Dev* **13**: 2604–2616.
- Chen SH, Benveniste EN. (2004). Oncostatin M: a pleiotropic cytokine in the central nervous system. *Cytokine Growth Factor Rev* **15**: 379–391.
- Chipoy C, Berreur M, Couillaud S, Pradal G, Vallette F, Colombeix C *et al.* (2004). Downregulation of osteoblast markers and induction of the glial fibrillary acidic protein by oncostatin M in osteosarcoma cells require PKC $\delta$  and STAT3. *J Bone Miner Res* **19**: 1850–1861.
- Debierre-Grockieo F. (2004). Anti-apoptotic role of STAT5 in haematopoietic cells and in the pathogenesis of malignancies. *Apoptosis* **9**: 717–728.
- Diller L, Kassel J, Nelson CE, Gryka MA, Litwak G, Gebhardt M *et al.* (1990). p53 functions as a cell cycle control protein in osteosarcomas. *Mol Cell Biol* **10**: 5772–5781.
- Eskes R, Desagher S, Antonsson B, Martinou JC. (2000). Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol* **20**: 929–935.

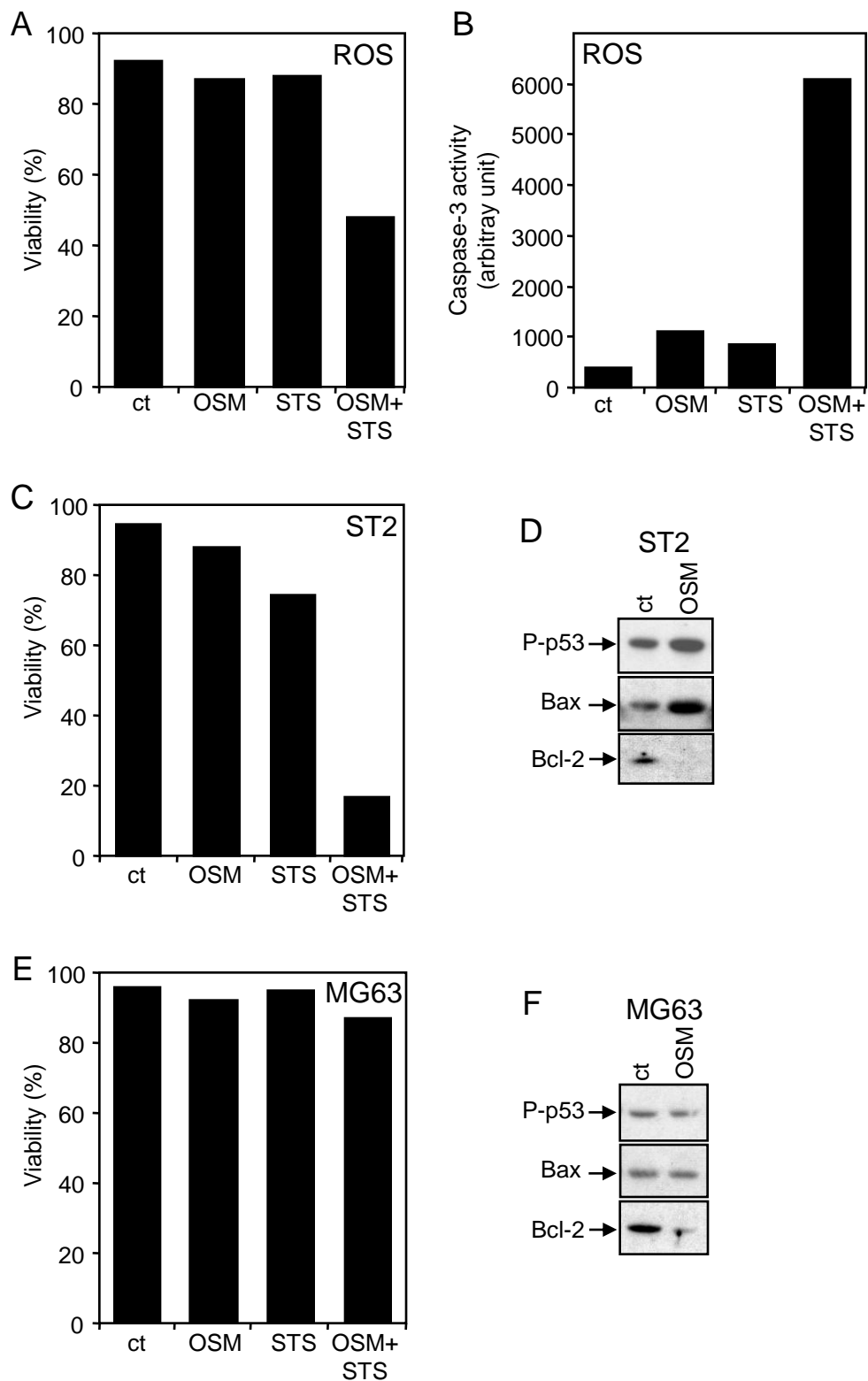
- Florenes VA, Maeldandsmo GM, Forus A, Andreassen A, Myklebost O, Fodstad O. (1994). MDM2 gene amplification and transcript levels in human sarcomas: relationship to TP53 gene status. *J Natl Cancer Inst* **86**: 1297–1302.
- Fuchs B, Pritchard DJ. (2002). Etiology of osteosarcoma. *Clin Orthop Relat Res* **397**: 40–52.
- Grant SL, Begley CG. (1999). The oncostatin M signalling pathway: reversing the neoplastic phenotype? *Mol Med Today* **5**: 406–412.
- Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y. (2003). Apoptosis – the p53 network. *J Cell Sci* **116**: 4077–4085.
- Heath C, Cross NC. (2004). Critical role of STAT5 activation in transformation mediated by ZNF198-FGFR1. *J Biol Chem* **279**: 6666–6673.
- Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Parfitt AM, Manolagas SC. (1998). Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. *J Bone Miner Res* **13**: 793–802.
- Kamiya A, Kinoshita T, Ito Y, Matsui T, Morikawa Y, Senba E *et al.* (1999). Fetal liver development requires a paracrine action of oncostatin M through the gp130 signal transducer. *EMBO J* **18**: 2127–2136.
- Kashkar H, Wiegmann K, Yazdanpanah B, Haubert D, Kronke M. (2005). Acid sphingomyelinase is indispensable for UV light-induced Bax conformational change at the mitochondrial membrane. *J Biol Chem* **280**: 20804–20813.
- Le Meur N, Lamirault G, Bihouee A, Steenman M, Bedrine-Ferran H, Teusan R *et al.* (2004). A dynamic, web-accessible resource to process raw microarray scan data into consolidated gene expression values: importance of replication. *Nucleic Acids Res* **32**: 5349–5358.
- Lengner CJ, Steinman HA, Gagnon J, Smith TW, Henderson JE, Kream BE *et al.* (2006). Osteoblast differentiation and skeletal development are regulated by Mdm2-p53 signaling. *J Cell Biol* **172**: 909–921.
- Nosaka T, Kawashima T, Misawa K, Ikuta K, Mui AL, Kitamura T. (1999). STAT5 as a molecular regulator of proliferation, differentiation and apoptosis in hematopoietic cells. *EMBO J* **18**: 4754–4765.
- Oren M. (2003). Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ* **10**: 431–442.
- Qin XF, An DS, Chen IS, Baltimore D. (2003). Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 183–188.
- Sims NA, Clement-Lacroix P, Da Ponte F, Bouali Y, Binart N, Moriggl R *et al.* (2000). Bone homeostasis in growth hormone receptor-null mice is restored by IGF-I but independent of Stat5. *J Clin Invest* **106**: 1095–1103.
- Stephanou A, Brar BK, Knight RA, Latchman DS. (2000). Opposing actions of STAT-1 and STAT-3 on the Bcl-2 and Bcl-x promoters. *Cell Death Differ* **7**: 329–330.
- Stott FJ, Bates S, James MC, McConnell BB, Starborg M, Brookes S *et al.* (1998). The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO J* **17**: 5001–5014.
- Thornborrow EC, Manfredi JJ. (1999). One mechanism for cell type-specific regulation of the bax promoter by the tumor suppressor p53 is dictated by the p53 response element. *J Biol Chem* **274**: 33747–33756.
- Townsend PA, Scarabelli TM, Davidson SM, Knight RA, Latchman DS, Stephanou A. (2004). STAT-1 interacts with p53 to enhance DNA damage-induced apoptosis. *J Biol Chem* **279**: 5811–5820.
- Trichet V, Benezech C, Dousset C, Gesnel MC, Bonneville M, Breathnach R. (2006). Complex interplay of activating and inhibitory signals received by Vgamma9Vdelta2 T cells revealed by target cell beta2-microglobulin knockdown. *J Immunol* **177**: 6129–6136.
- Wadayama B, Toguchida J, Shimizu T, Ishizaki K, Sasaki MS, Kotoura Y *et al.* (1994). Mutation spectrum of the retinoblastoma gene in osteosarcomas. *Cancer Res* **54**: 3042–3048.
- Wang X, Kua HY, Hu Y, Guo K, Zeng Q, Wu Q *et al.* (2006). p53 functions as a negative regulator of osteoblastogenesis, osteoblast-dependent osteoclastogenesis, and bone remodeling. *J Cell Biol* **172**: 115–125.
- Wei Q. (2005). Pitx2a binds to human papillomavirus type 18 E6 protein and inhibits E6-mediated P53 degradation in HeLa cells. *J Biol Chem* **280**: 37790–37797.

Supplementary Information accompanies the paper on the Oncogene website (<http://www.nature.com/onc>).



### **Additional Figure 1**

OSRGA cells were pretreated or not with OSM (100 ng/ml) for 3 days. Then cells were treated with UV for 2 minutes. After 5 hours, the cell lysates were analyzed for caspase 3 activity by a fluorometric assay (A) and for caspase 9 by western blotting (B).



### Additional Figure 2

Cells were treated with OSM for 3 days and then with Sts (100nM). A, C, E: viability was quantified by trypan blue staining. B: the cell lysates were analyzed for caspase 3 activity. D, F: the cell lysates were analyzed for the indicated protein by western blotting.

## Complément de discussion à l'article 2

De part ses capacités d'inhibition de la prolifération tumorale et d'induction de la différenciation ostéoblastique, l'OSM est une molécule particulièrement intéressante dans le cadre de l'élaboration de nouveaux protocoles thérapeutiques des ostéosarcomes. Néanmoins son rôle sur la viabilité cellulaire restait jusqu'à présent presque totalement inconnu. Les travaux présentés dans cet article constituent la première mise en évidence d'un effet sensibilisateur de l'OSM à l'apoptose dans des cellules de type ostéoblastique. En effet, bien que l'OSM seule inhibe la prolifération des ostéosarcomes, elle n'affecte pas la viabilité cellulaire. En fait, elle semble préparer la cellule à divers signaux de mort. Ainsi, une faible dose de Sts sans effet sur des cellules non traitées à l'OSM, déclenchera une apoptose massive si ces mêmes cellules ont été préalablement cultivées en présence d'OSM. Cette mort est associée au relargage du cytochrome c dans le cytosol et à l'activation par clivage des caspases-9 et -3, et donc à la voie mitochondriale de l'apoptose. Des résultats similaires ont été obtenus avec d'autres inducteurs de mort, comme les UV, le TNF $\alpha$  associé à l'IFN $\gamma$  ou la privation de sérum. Le mécanisme commun à ces différents agents semble être la relocalisation de la protéine pro-apoptotique Bax à la mitochondrie, même dans le cas du TNF $\alpha$  qui active la voie des récepteurs de mort (Eskes et al., 2000; Kashkar et al., 2005). En effet, la caspase-8, qui peut cliver directement la caspase-3, va également activer une protéine de la famille Bcl-2, appelée Bid, qui à son tour va venir relocaliser Bax à la membrane mitochondriale. C'est l'élément clé de la cascade apoptotique, puisque cette insertion de Bax alors oligomérisé va permettre le relargage dans le cytosol de cytochrome c, son association avec Apaf-1 et la caspase-9 (formant l'apoptosome), puis l'activation de la caspase-3 (figure 26).

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

Les voies de signalisation activées par l'OSM sont nombreuses, et on peut distinguer deux familles: les facteurs de transcription STATs (STAT1, STAT3 et STAT5) et les kinases (Erk 1/2, Akt et PKC $\delta$ ), ces dernières étant classiquement associées à la notion de survie et de prolifération. Ceci a pu être confirmé par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques qui ont conduit à une réduction de viabilité cellulaire, principalement avec les inhibiteurs d'Akt et de PKC $\delta$ . On peut donc penser que l'action de la Sts (inhibiteur de kinases non spécifique), après un traitement à l'OSM, peut être reliée à la fois à l'annulation de signaux de survie (Akt et PKC $\delta$ ) et à la relocalisation de la protéine Bax présente à des taux très importants.

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



classiquement activé par STAT5, est retrouvé faiblement induit par l'OSM, que ce soit au niveau du transcrit ou de la protéine, mais n'est pas suffisant pour empêcher l'apoptose.

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

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

- **l'OSM sensibilise les cellules d'ostéosarcome à la mort induite par divers agents apoptotiques (Sts, UV, TNF $\alpha$ )**

- cette mort se caractérise par l'activation des caspases -9 et-3 et par une augmentation du ratio Bax / Bcl-2
- les facteurs de transcription STAT5 et p53 sont nécessaires à cette apoptose, réduisant Bcl-2 et induisant Bax respectivement
- cet effet pro-apoptotique n'est pas restreint aux ostéosarcomes de rongeurs, mais est observé également dans des carcinomes humains ou des ostéoblastes non cancéreux s'ils sont en phase de prolifération

## II. OSM et différenciation ostéoblastique

### Introduction

L'OSM a d'abord été identifiée pour sa capacité à inhiber la prolifération de nombreuses cellules tumorales dont les ostéosarcomes. Cet effet inhibiteur est très souvent associé à une induction de la différenciation. En effet, après un traitement par l'OSM, la prolifération des cellules MCF-7 et MDA-MB-231 issues de cancer du sein est fortement réduite (Douglas et al., 1998). Le traitement à l'OSM est corrélé à une induction de la différenciation de ces cellules en cellules épithéliales mammaires matures. De même, l'OSM humaine réduit la prolifération des cellules MG63, en association avec un phénotype ostéoblastique plus marqué caractérisé par une induction de la phosphatase alcaline. Cet effet pro-différenciation met en jeu la voie JAK-STAT et la protéine p21<sup>WAF1</sup>, un inhibiteur des CDKs induit par l'OSM (Bellido et al., 1997; Bellido et al., 1998). De plus, le rôle majeur de l'OSM dans le remodelage osseux a été confirmé *in vivo* par injection d'un adénovirus codant l'OSM murine au niveau du genou de souris. La production d'OSM induit alors une inflammation localisée mais également une formation osseuse associée à la présence de plusieurs couches de cellules de type ostéoblastique (de Hooge et al., 2002).

Cependant, d'autres études ont mis en évidence un effet inhibiteur de l'OSM sur la différenciation ostéoblastique. En effet, dans des cellules de calvaria de rat, l'OSM stimule l'ostéogénèse durant les premiers jours de culture mais l'inhibe à plus long terme (Liu et al., 2002). De même, l'OSM inhibe la prolifération de cellules issues d'ostéosarcome de rat différencié et d'ostéoblastes matures en corrélation avec à une diminution de l'expression de marqueurs ostéoblastiques tels que la phosphatase alcaline, la sialoprotéine osseuse et l'ostéocalcine et de la formation de nodules minéralisés par ces cellules (Chipoy et al., 2004). Cet effet inhibiteur dépend de l'activation de la PKC $\delta$  par l'OSM. Cette cytokine semble donc avoir un effet biphasique sur l'ostéogénèse dépendant du stade de différenciation du modèle cellulaire utilisé. Cependant, l'OSM est également capable d'induire l'expression de la GFAP dans les cellules ostéoblastiques, via le facteur de transcription STAT3, suggérant une différenciation de type glial ou ostéocytaire (Chipoy et al., 2004). L'objectif de ce travail a donc été de préciser l'action de l'OSM sur l'ostéogénèse, en particulier après un traitement à long terme.

### Article 3

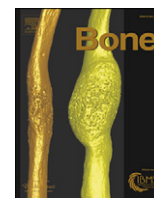
#### « Un traitement à long terme par l'Oncostatine M induit une différenciation de type ostéocytaire dans des cellules d'ostéosarcome et de calvaria »

**Brounais B**, David E, Chipoy C, Trichet V, Ferré V, Charrier C, Duplomb L, Berreur M, Rédini F, Heymann D, Blanchard F. Bone. 2009 May;44(5):830-9.

Les études précédentes sur des cellules ostéoblastiques primaires ou d'ostéosarcome (ostéoblastes normaux ou transformés) ont montré que l'oncostatine M (OSM), une cytokine de la famille de l'interleukine-6, possède à la fois des effets cytotostatiques et pro-apoptotiques. Sur la différenciation, l'OSM a des activités complexes et mal comprises, stimulant les premières étapes de l'ostéogenèse mais inhibant l'expression des marqueurs ostéoblastiques et la formation osseuse à des étapes plus tardives.

Dans cette étude, nous avons analysé des cellules d'ostéosarcome de rat transduites avec des particules lentivirales codant l'OSM (lvOSM) pour produire stablement cette cytokine. Après plusieurs semaines de culture, les cellules transduites OSRGA et ROS 17/2.8 sont inhibées en prolifération et sensibilisées à l'apoptose induite par un inhibiteur de kinases, la staurosporine (Sts). De plus, ce traitement à long terme avec l'OSM induit (i) une diminution des marqueurs ostéoblastiques (phosphatase alcaline, bone sialoprotein, osteocalcin), (ii) des changements morphologiques aboutissant à des formes allongées et/ou étoilées et (iii) une augmentation des marqueurs ostéocytaires (sclerostin et/ou E11), suggérant une différenciation ostéocytaire. Au contraire des ostéosarcomes, les cellules de la calvaria de rat (comprenant principalement des précurseurs ostéoblastiques) transduites avec le lvOSM ont un taux de prolifération augmenté. Cependant, elles se différencient également en cellules étoilées exprimant la sclerostin, E11 et Phex (phosphate-regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome). Les cellules de calvaria transduites avec le lvOSM, mais pas les cellules d'ostéosarcome, expriment aussi des héli-canaux fonctionnels, une caractéristique des ostéocytes en lien avec leurs capacités de mécanosenseurs.

Ces résultats indiquent que les ostéosarcomes produisant stablement l'OSM ne développent pas de résistance à cette cytokine et pourraient donc représenter un nouvel outil intéressant pour étudier les effets anti-cancéreux de l'OSM *in vivo*. De plus, le statut de différenciation des cellules ostéoblastiques sur-exprimant l'OSM ressemble à celui de pré-ostéocytes plutôt qu'à celui de pré-ostéoblastes. Cependant, ces changements sont observés à des degrés divers selon les modèles cellulaires et le statut de transformation. Ainsi, nous proposons de nouvelles conditions de cultures pour l'obtention d'ostéocytes qui sont difficiles à obtenir *in vitro* alors qu'ils représentent le contingent cellulaire le plus important des os.



## Long term oncostatin M treatment induces an osteocyte-like differentiation on osteosarcoma and calvaria cells

Bénédicte Brounais<sup>a,b</sup>, Emmanuelle David<sup>a,b</sup>, Céline Chipoy<sup>a,b,1</sup>, Valérie Trichet<sup>a,b</sup>, Virginie Ferré<sup>c,d</sup>, Céline Charrier<sup>a,b</sup>, Laurence Duplomb<sup>a,b,c</sup>, Martine Berreur<sup>a,b</sup>, Françoise Rédini<sup>a,b</sup>, Dominique Heymann<sup>a,b,c</sup>, Frédéric Blanchard<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> INSERM, ERI 7, Nantes, F-44035, France

<sup>b</sup> Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, EA3822, Nantes, F-44035, France

<sup>c</sup> CHU, Hôtel Dieu, Nantes, France

<sup>d</sup> Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, Laboratoire d'Immunovirologie et Polymorphisme Génétique, EA4271, Nantes, F-44035, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 24 July 2008

Revised 15 December 2008

Accepted 18 December 2008

Available online 3 January 2009

Edited by: J. Aubin

#### Keywords:

Oncostatin M

Lentivirus

Osteosarcoma

Osteoblast

Osteocyte

### ABSTRACT

Previous *in vitro* studies on primary osteoblastic and osteosarcoma cells (normal and transformed osteoblasts) have shown that oncostatin M (OSM), a member of the interleukin-6 family, possesses cytostatic and pro-apoptotic effects in association with complex and poorly understood activities on osteoblast differentiation. In this study, we use rat osteosarcoma cells transduced with lentiviral particles encoding OSM (lvOSM) to stably produce this cytokine. We show that after several weeks of culture, transduced OSRGA and ROS 17/2.8 cells are growth inhibited and sensitized to apoptosis induced by the kinase inhibitor Staurosporine (Sts). Moreover, this long term OSM treatment induces (i) a decrease in osteoblastic markers, (ii) morphological changes leading to an elongated and/or stellate shape and (iii) an increase in osteocytic markers (sclerostin and/or E11), suggesting an osteocyte-like differentiation. We also show that non transformed rat calvaria cells transduced with lvOSM differentiate into stellate shaped cells expressing sclerostin, E11, Phex and functional hemichannels. Together, these results indicate that osteosarcoma cells stably producing OSM do not develop resistance to this cytokine and thus could be a valuable new tool to study the anti-cancer effect of OSM *in vivo*. Moreover, OSM-over-expressing osteoblastic cells differentiate into osteocyte-like cells, the major cellular contingent in bone, providing new culture conditions for this cell type which is difficult to obtain *in vitro*.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

### Introduction

Oncostatin M (OSM) is a multifunctional cytokine belonging to the Interleukin (IL)-6 family [1] which also includes IL-11, IL-27, IL-31, leukemia inhibitory factor (LIF), ciliary neurotrophic factor (CNTF), cardiotrophin-1 (CT-1), cardiotrophin-like cytokine (CLC) and neuropoietin (NP). OSM binds to a specific receptor complex composed of gp130 and OSMR $\beta$  and activates two main signaling pathways: the Janus Kinase (JAK)/Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) and the Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) signaling pathways [2,3]. In comparison to other IL-6-type cytokines, OSM is more active to induce renal inflammatory response [4], differentiation of fetal hepatocytes [5], chronic joint inflammation and destruction [6]

and growth inhibition of various solid tumor cell lines derived from melanoma [7], breast and lung cancer [8], hepatoma [9], glioblastoma [10] or osteosarcoma [11].

Osteosarcomas are rare primitive bone tumors derived from osteoblasts. Patient survival largely depends on the response of tumor cells to chemotherapy, reaching 60–70% in the best responsive patient groups and only 30% when pulmonary metastases are detected at the time of diagnosis. Thus, a better understanding of osteosarcoma and osteoblast biology is necessary in order to improve this treatment. On osteosarcoma cell lines and normal proliferating osteoblasts, we previously showed that OSM inhibits the proliferation and sensitizes to apoptosis driven by various death inducers such as the kinase inhibitor Staurosporine [12,13]. Moreover, in a rat osteosarcoma model, OSM in combination with Midostaurin, a derivate of Staurosporine, reduced the progression of the primary bone tumor, in association with an increased tumor necrosis and tissue repair [14].

The inhibitory effect of OSM on cancer cell proliferation is tightly coupled to induced differentiation. OSM, through activation of the

\* Corresponding author. Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, Faculté de Médecine, 1 rue Gaston Veil, F-44035 Nantes cedex 1, France.

E-mail address: [frederic.blanchard@univ-nantes.fr](mailto:frederic.blanchard@univ-nantes.fr) (F. Blanchard).

<sup>1</sup> Present address: Molecular Oncology Group, McGill University, Montreal, Canada.

JAK/STAT3 pathway, blocks human MG63 pre-osteoblastic osteosarcoma cells in the G0–G1 phase of the cell cycle and induces alkaline phosphatase (ALP) activity, a protein expressed early in osteogenesis [11,15]. Similarly in mouse calvaria cells, OSM enhances ALP activity and osteocalcin (OC) expression, a protein implicated in extracellular matrix mineralization and expressed in mature and quiescent osteoblasts [11]. The major role of OSM on bone remodeling was confirmed *in vivo* using an adenoviral gene transfer of OSM in knee joints of mice. OSM production results in localized joint inflammation, but also in the formation of several layers of osteoblastic-like cells and new bone formation [16]. In contrast, others reports have shown an inhibitory effect of OSM on bone formation. In fact, in rat calvaria cells, OSM stimulates osteogenesis during the first days of culture but inhibits bone nodules formation at later times [17]. Similarly on the rat cell lines OSRGA and ROS 17/2.8, which are well-differentiated osteosarcoma cells [13], OSM reduces ALP activity, OC and bone sialoprotein (BSP) expression, a major component of the bone extracellular matrix, in association with a decrease in bone nodule formation [13]. OSM presents a biphasic or dual effect on osteogenesis, stimulating the first stages but inhibiting the later stages of osteoblast differentiation. However, we observed that OSM induces expression of the Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) on osteosarcoma and rat bone marrow mesenchymal stem cells, suggesting either an osteocytic-like terminal differentiation or a glial-like trans-differentiation [13].

All these results were obtained with OSM treatments of less than 13 days for *in vitro* studies or with an adenoviral gene transfer of OSM which induces only a transient (7 days) [6] and systemic over-expression of OSM *in vivo* [14]. In addition, high doses of adenovirus encoding mouse OSM (AdOSM) are highly toxic in rats, inducing generalized inflammation, cachexia, bone loss and death. Therefore, the effect of only transient and low doses of systemic OSM has been studied in an osteosarcoma pre-clinical model and we observed that OSM alone does not modify the tumor development but synergizes with Midostaurin to induce cancer cell death [14]. It remains now to determine whether high and long lasting doses of OSM, especially in the tumor environment, would alone slow down tumor progression. This is why the response of normal or transformed osteoblastic cells to a longer OSM treatment must be explored *in vitro*.

In this study, we observe that osteosarcoma and calvaria cells transduced with lentiviral particles encoding OSM (lvOSM) do not develop resistance to this cytokine and differentiate into osteocyte-like cells, presumably pre-osteocytes.

## Materials and methods

### Cell lines

The rat osteosarcoma OSRGA cell line was established by Dr J.P. Thiéry from an initially radio-induced osteosarcoma [13,18] which corresponds to the transplantable osteosarcoma model described elsewhere [14]. The rat osteosarcoma ROS 17/2.8 cell line was kindly provided by Prof. H.J. Donahue (Penn State University, USA). These cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Lonza, Verviers, Belgium) supplemented with 5% Fetal Bovine Serum (FBS, Perbio, Logan, USA).

The murine osteocytic cell line MLO-Y4 [19], a kind gift from Dr. L. Bonewald (University of Missouri, Kansas City, USA), was cultured in  $\alpha$ -Minimal Essential Medium ( $\alpha$ -MEM, Invitrogen, Eragny, France) containing 5% FBS, 5% Calf Serum (CS, Perbio) and 1% penicillin–streptomycin (Lonza) on collagen I (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) coated flasks.

Rat calvaria cells were obtained from 4 day-old Sprague–Dawley rats by an explant culture technique. Briefly, the calvaria was minced and incubated at 37 °C for 30 min with 1 mg/mL collagenase A (Roche, Mannheim, Germany) 2 times. Then, collagenase A was removed,

calvaria explants were rinsed with  $\alpha$ -MEM, spread and cultured in a flask with  $\alpha$ -MEM containing 10% FBS and 1% penicillin–streptomycin (complete medium or compM) until calvaria cells expanded and reached 80% of confluence. Cells were then released using trypsin–EDTA (Lonza) and immediately used for transduction with lentiviruses.

### Lentiviral particle production and cell transduction

The cDNA encoding mouse OSM (mOSM; amino acids 1 to 173) was amplified by PCR from the pME18S/mOSM plasmid (kind gift from Dr. A. Miyajima, University of Tokyo, Japan) using oligonucleotides as follows: mOSM sense, 5'-tacgtcgcaccgatgacagacac-3'; mOSM antisense, 5'-agacgcgtctatctccgct-3' (introducing a MluI site). The mOSM cDNA was then cloned into an intermediary pcDNA3 vector using the EcoRV site, excised by BamHI and MluI digestion and transferred into the pLNT/Sffv-MCS plasmid [20]. The resulting plasmid was designed pLNT-mOSM.

Lentiviral particle production was based on the "Vira Power Lentiviral expression system" (Invitrogen). Briefly, 293FT cells were transfected with helper plasmids and pLNT-mOSM by polyethylenimine (PEI; gift from Dr. B. Pitard, INSERM U915, Nantes, France). Lentivirus-containing supernatants were harvested 48 h post-transfection and concentrated by ultrafiltration (Millipore, Bedford, MA, USA).

OSRGA, ROS 17/2.8 and rat calvaria cells at passage 1 were transduced with lentiviral particles coding OSM (lvOSM) using a Multiplicity Of Infection (MOI) of 4, 50 and 50, respectively, and called OSRGA/lvOSM, ROS/lvOSM and calvaria/lvOSM cells. Preliminary experiments using a lentivirus encoding the Green Fluorescent Protein (GFP) indicated that these MOI were sufficient to transduce 100% of the cells. OSRGA/lvOSM, ROS/lvOSM or control cells were subsequently cultured in DMEM + 5% FBS and split 1/5 or 1/10 using trypsin–EDTA (Lonza) twice a week. Calvaria/lvOSM or control cells were cultured in compM and split 1/5 or 1/10 using trypsin–EDTA once a week. For morphology, RNA studies and hemichannel activity, cells were plated 10 days after transduction at 10<sup>4</sup> cells/well in 6 well plates and cultured either in compM or in differentiation medium (diffM) containing 50  $\mu$ g/mL freshly prepared ascorbic acid (Sigma, Saint Quentin-Fallavier, France) and 10 mM Na  $\beta$ -glycerophosphate (Sigma) for 14 days with no passage. For the morphology, phase contrast photographs were taken using a Leica microscope. Two independent transductions with lvOSM were performed in OSRGA and calvaria cells with similar results.

### Western blot analysis

Cells were cultured without FBS for 2 h and lysed in RIPA buffer as described previously [14]. Protein concentration was determined by the BCA protein assay (Sigma). Fifteen  $\mu$ g of total cell lysate proteins were run on 10% SDS-PAGE and transferred to Immobilon-P membrane (Millipore). The membranes were blotted with antibodies to P-Erk1/2 (Thr202/Tyr204), P-STAT1 (Tyr701), P-STAT3 (Tyr705), P-p53 (Ser15) (Cell Signaling Technologies, Beverly, MA, USA), STAT3 (BD Biosciences), P-STAT5 (Tyr694) (Invitrogen), Bax (Oncogene, Cambridge, USA), Bcl-2 (Calbiochem), sclerostin (Interchim, Montluçon, France) or actin (Sigma) in PBS, 0.05% Tween 20 and 3% BSA overnight at 4 °C. Then, the membranes were washed and probed with the secondary antibody coupled to horseradish peroxidase in PBS, 0.05% Tween 20 and 5% milk. The labeled proteins were detected using ECL reagent (Pierce, Rockford, USA) according to the manufacturer's recommendations. Revelation was performed with a G-Box camera (Syngene).

### Assay for OSM production

OSM production was evaluated by a biological test measuring activation of STAT3 in parental OSRGA cells by supernatants from

transduced OSRGA, ROS17/2.8 or calvaria cells. Serial dilutions of these conditioned media were added on parental, untransduced OSRGA cells for 15 min. Then, OSRGA cell lysates were analyzed by western blotting as indicated above. The membranes were blotted with antibodies to P-STAT3 or actin and signals were quantified using the GeneTools software (Syngene). OSM production by OSRGA $\Delta$ OSM, ROS $\Delta$ OSM or calvaria $\Delta$ OSM cells was compared to standard mouse recombinant OSM (R&D Systems, Abingdon, UK). Specificity of the bio-assay was verified by pre-incubation of the conditioned media with a neutralizing goat anti-mOSM antibody (10  $\mu$ g/mL; R&D Systems) or a control goat IgG (10  $\mu$ g/mL; R&D Systems) for 30 min at 37 °C.

#### Cell counting for estimation of doubling time

Seven days after transduction, OSRGA cells were plated at the density of  $2.5 \times 10^4$  cells in 24 well-plates. Every 3 or 4 days of culture, cells were released with trypsin–EDTA and living and dead cells were quantified by Trypan Blue exclusion using a Malassez cell. After counting,  $2.5 \times 10^4$  cells were plated again. Seven days after transduction, calvaria and ROS17/2.8 cells were plated at a density of  $5 \times 10^4$  cells in 6 well-plates. Once or twice a week, cells were released with trypsin–EDTA and counted using a Malassez cell. After counting,  $5 \times 10^4$  cells were plated again.

#### Cell viability

Cells were plated into 96-well plates at an initial density of 1500 cells/well, and cultured for 72 h with Staurosporine (Sigma) added for the last 16 h. Living cells were quantified by an XTT assay: the XTT reagents (sodium 30-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate) (Roche) were added for 5 h at 37 °C and the absorbance was read at 490 nm. All assays were performed in triplicate.

Living and dead cells were also quantified by Trypan Blue exclusion after combining non-adherent with adherent cells released from the culture dish using trypsin–EDTA. The percentage of living cells was determined using a Malassez cell.

#### Caspase 3 activity

Caspase-3 activity was assessed using the Fluorometric CaspACE Assay System kit (Promega, Madison, WI, USA) following the manufacturer's recommendations. Ten  $\mu$ L of total cell lysates were used and results are expressed in arbitrary units, after correction for protein content.

#### RNA isolation and PCR

Total cellular RNA and cDNA were prepared as described previously [13]. The cDNA was amplified with 1.25 U of Ampli Taq Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and 20 pmol each sense and antisense primers as follows: 18S sense, 5'-tcaagaacgaaagtcggaggttcg-3'; 18S antisense, 5'-ttattgctcaatctcgggtgctg-3'; ALP sense, 5'-cctttgtgctctctcaag-3'; ALP antisense, 5'-ctggcctctcatccagttc-3'; BSP sense, 5'-atggagatggcgatagttcg-3'; BSP antisense, 5'-gttctctcgcacctgcttc-3'; OC sense, 5'-catgaggaccctctctctgc-3'; OC antisense, 5'-cctaaacgggtggtgccatag-3'; sclerostin sense, 5'-cccaccatcttatgacacc-3'; sclerostin antisense, 5'-ctcaggtccaagtctctga-3'; E11 sense, 5'-agtgttctctgggtttgg-3'; E11 antisense, 5'-gattccgaccagggtcacta-3'; DMP-1 sense, 5'-atacccccagtgacagcaag-3'; DMP-1 antisense, 5'-gtccctctgggctatctcc-3'; Phex sense, 5'-aacaggagtactgctgaagc-3'; Phex antisense, 5'-tgctcattgatgctctgctg-3'.

The thermal cycle profile was as follows: denaturation for 15 s at 95 °C, annealing for 30 s at 58–62 °C depending on primers, and extension for 30 s at 72 °C. For semi-quantitative assessment of expression levels, each PCR reaction was realized for different cycles

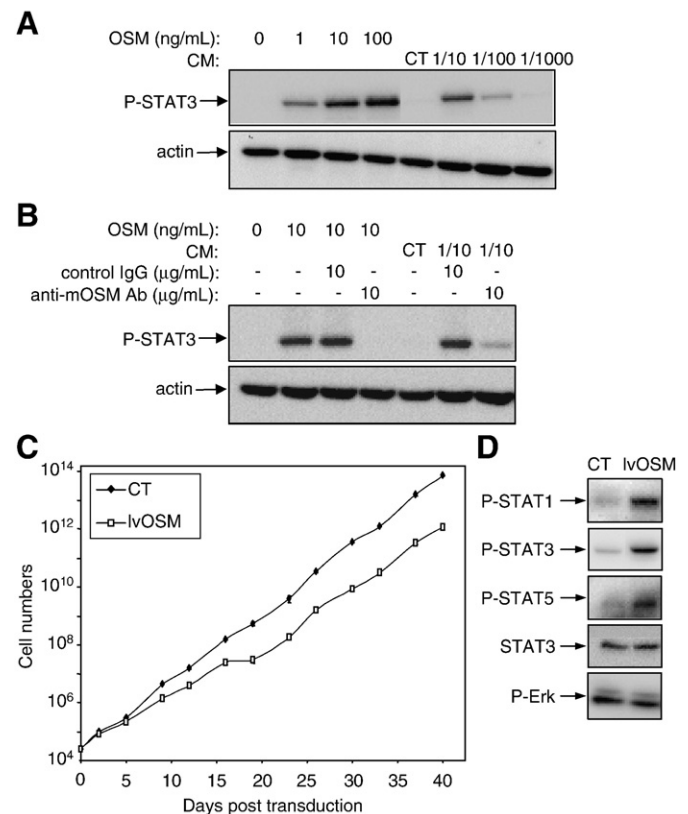
ranging from 20 to 40 cycles: ALP-25 $\times$ , BSP-40 $\times$ , OC-40 $\times$ , sclerostin-40 $\times$ , E11-25 $\times$ , DMP1-40 $\times$ , Phex-40 $\times$ , 18S-20 $\times$ . PCR products were size fractionated on a 1% agarose gel, labeled with Gel Red (GelRed Nuclei Acid Gel Stain in NaCl 0,1 M, Interchim) and analyzed under UV transillumination.

#### ALP activity

Cells were lysed in RIPA buffer without NaVO<sub>4</sub> (phosphatase inhibitor). ALP activity was assayed using p-nitrophenyl phosphate (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) as a substrate, and the production of p-nitrophenol per minute was determined by measuring absorbance at 405 nm [13]. Protein concentration was determined by the BCA protein assay and ALP activity was expressed as units per milligram protein (1 U = 10  $\mu$ g p-nitrophenol).

#### Flow cytometry

Control OSRGA or OSRGA $\Delta$ OSM cells were released with PBS–EDTA (Lonza) and  $2 \times 10^5$  cells were washed with PBS and incubated 30 min in dark at 4 °C with mouse anti rat CD44-PE mAb (Serotec, Oxford, UK)



**Fig. 1.** OSRGA $\Delta$ OSM cells had an increased doubling time. (A) OSM production by OSRGA $\Delta$ OSM cells was evaluated 84 days after transduction. After 4 days of culture, the conditioned media (CM) from control OSRGA (CT; dilution 1/10) or OSRGA $\Delta$ OSM cells (dilution 1/10; 1/100; 1/1000) was used to treat parental OSRGA cells for 15 min. Recombinant mouse OSM was used as a standard. Aliquots from whole cell lysates were analyzed by western blotting for phospho-STAT3 (Tyr705; P-STAT3) and actin. (B) Specificity of the bio-assay was verified by pre-incubation of the conditioned media with a neutralizing anti-mOSM antibody or a control IgG. (C) Control OSRGA and OSRGA $\Delta$ OSM cells were counted two times per week for 40 days. (D) Aliquots of control OSRGA and OSRGA $\Delta$ OSM lysates collected 31 days after transduction were analyzed by western blotting for phospho-STAT1 (Tyr701; P-STAT1), phospho-STAT3 (Tyr705; P-STAT3), phospho-STAT5 (Tyr694; P-STAT5), total STAT3 and phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204; P-ERK). CM: conditioned media; CT: Control OSRGA;  $\Delta$ OSM: OSRGA $\Delta$ OSM; OSM: oncostatin M; STAT: signal transducer and activator of transcription.



or isotopic control mAb in PBS–BSA 1%. Then, they were washed twice and analyzed by flow cytometry (FACScan; BD Biosciences).

#### Dye uptake assay

Hemichannel activity was studied by Lucifer Yellow (LY) dye uptake essentially as described previously [21]. Cells were plated at low densities (1000 cells/cm<sup>2</sup>) and after 2 days, the growth medium was removed and replaced by medium without FBS for 1 h. Cells were then treated with or without 5 mM EGTA (Sigma) for 30 min. LY (1 mg/mL; Sigma) was added together with EGTA for 30 min. Cells were then washed with PBS and fixed in 1% paraformaldehyde. Fluorescence was visualized using a Leica microscope using appropriate filters. Results are presented as the number of LY positive cells divided by the total number of cells within several fields of view. A minimum of 150 cells were counted for each condition.

#### PGE2 release

Cells were plated into 6-wells plates at an initial density of  $5 \times 10^4$  cells/well. After 2 days, cells were cultured with 0.2% FBS for 4 h before adding fresh medium containing 0.2% FBS with or without 5 mM EGTA for 4 h. Then, the supernatants were collected and cells were lysed in RIPA buffer as described previously [14]. PGE2 release in conditioned media was quantified using the Prostaglandin E2 Parameter Assay Kit (R&D Systems) following the manufacturer's recommendations and corrected for cellular protein content.

#### Statistics

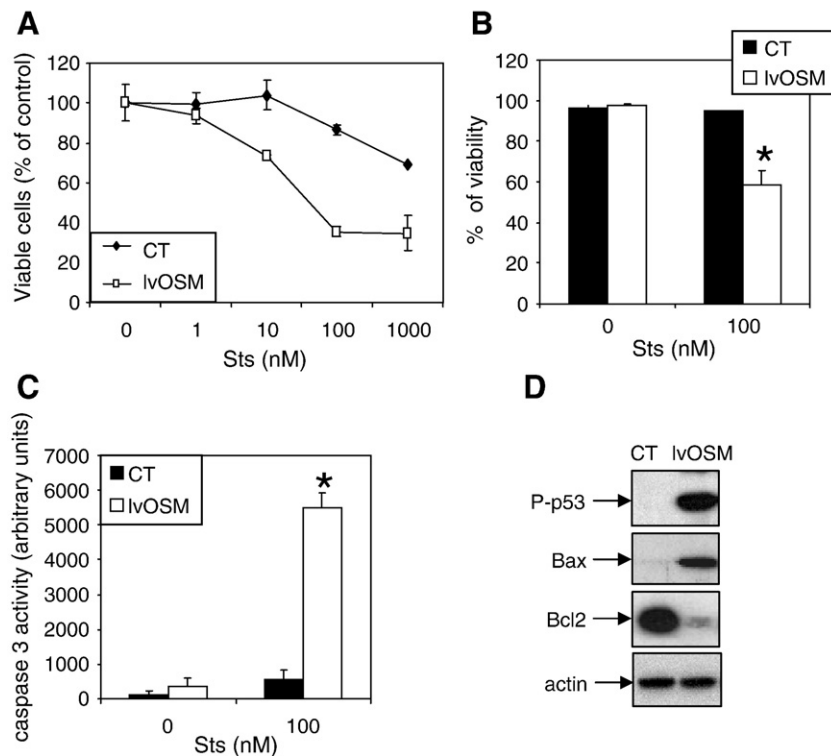
Statistical significance between the various groups was evaluated using the unpaired Mann–Whitney test. Results with  $p < 0.05$  were considered significant.

## Results

### OSRGA/vOSM cells had an induced doubling time

In order to study the long term effects of OSM, we first transduced OSRGA osteosarcoma cells with lvOSM to obtain stably modified cells producing this cytokine. Because long term OSM treatments (between 1 and 3 months) induce a stable OSM resistance in melanoma cells [22], our initial objective was to analyze transduced OSRGA cells within this time frame, with a daily examination of morphological changes. Two independent transductions with lvOSM were performed in OSRGA cells and gave similar results. As shown in Fig. 1A, 84 days post-transduction, the conditioned media from OSRGA/vOSM cells contained more than 10 ng/mL of OSM. To verify the specificity of the bio-assay, the conditioned medium was pre-incubated with a neutralizing antibody against OSM. This treatment effectively prevented activation of STAT3, and only a faint signal remained, indicating that OSM was the main STAT3 activator produced by OSRGA/vOSM cells (Fig. 1B). Similar doses of OSM were found 7 days post-transduction (the earliest time point that could be analyzed, data not shown), indicating a stable production of OSM for near 3 months.

OSRGA/vOSM cells showed a slower growth rate than control OSRGA cells and this inhibitory effect of OSM persisted for several weeks (Fig. 1C). Indeed, the doubling time for control OSRGA cells was 31 h whereas it was 47 h for OSRGA/vOSM cells. Moreover, we did not observe an enhanced OSRGA/vOSM cell death in these culture conditions, suggesting a stable cytostatic effect of OSM. Transduction of OSRGA cells with lentiviral particles encoding the Green Fluorescent Protein (lvGFP) had no effect on cell viability or proliferation (data not shown). As indicated below, 31 days after transduction OSRGA/vOSM cells developed morphological changes and looked like stellate shaped osteocytes. Therefore in the



**Fig. 2.** Apoptosis induced by Sts in OSRGA/vOSM cells was associated with an increased Bax/Bcl-2 ratio and activation of p53 and caspase-3. (A) After 3 days in culture, the number of viable cells was estimated by an XTT assay with increasing concentrations of Sts (1–1000 nM) added overnight. (B) Percentages of living cells were determined by Trypan Blue Exclusion Test with Sts added overnight. (C) Caspase-3 activity was determined on cell lysates by a fluorometric assay with Sts added for 5 h. (D) Aliquots of control OSRGA and OSRGA/vOSM lysates were analyzed by western blotting for phospho-p53 (Ser 15; P-p53), Bax and Bcl-2. CT: Control OSRGA; lvOSM: OSRGA/vOSM; OSM: oncostatin M; Sts: staurosporine. Bars represent the mean  $\pm$  SD. \* $p < 0.05$  compared to control OSRGA cells.

subsequent experiments, OSRGAlvOSM cells were analyzed between 31 and 60 days after transduction, when they acquired this osteocytic morphology.

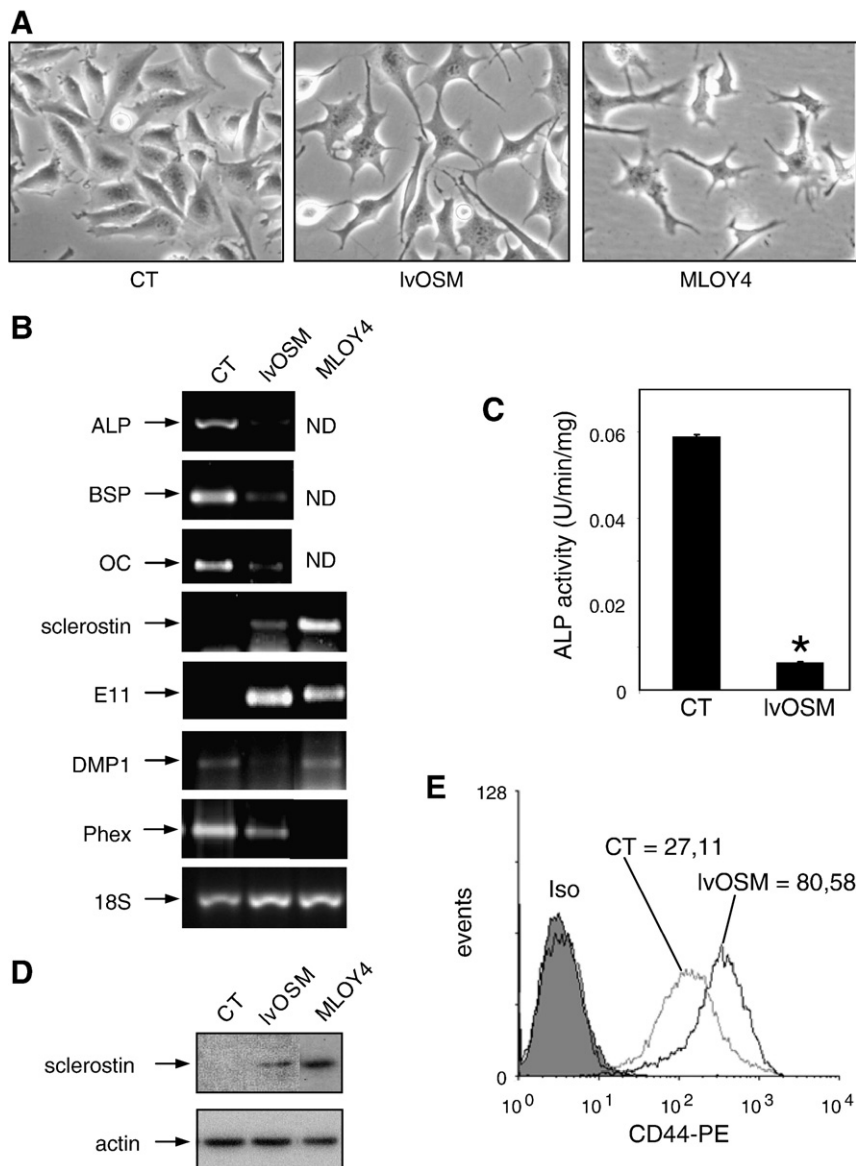
Exogenously added recombinant OSM is known to induce phosphorylation of the transcription factors STAT1, STAT3 and STAT5 and the kinases Erk 1/2, with a peak of activation after 15 min of OSM treatment and a strong decline thereafter [12,13]. As shown in Fig. 1D, STAT1, STAT3 and STAT5 were still activated in OSRGAlvOSM cells 31 days after transduction, whereas Erk 1/2 were not modulated. Thus, after several weeks of treatment, OSRGA cells remained sensitive to OSM for growth inhibition and STATs activation.

*Apoptosis induced by Sts in OSRGAlvOSM was associated with an increased Bax/Bcl-2 ratio as well as p53 and caspase-3 activation*

Three days of treatment with recombinant OSM sensitize OSRGA cells to apoptosis induced by staurosporine (Sts). This pro-apoptotic

effect of OSM is associated with an increased Bax/Bcl-2 ratio, which controls the mitochondrial apoptotic pathway [12]. As shown in Fig. 2A, the viability of OSRGAlvOSM cells (31 days after transduction) treated with Sts for 16 h was reduced compared to control OSRGA cells. The IC<sub>50</sub> was around 50 nM of Sts for OSRGAlvOSM cells and more than 1 μM for control OSRGA cells. Fig. 2B showed that a treatment with Sts (100 nM) for 16 h induced a decrease of living OSRGAlvOSM cells compared to control OSRGA cells (40% decrease). Moreover, in OSRGAlvOSM cells treated with Sts (100 nM) for 5 h, we observed a 10-fold increase in caspase-3 activity compared to control OSRGA cells, indicating an induced apoptosis (Fig. 2C).

Next, we examined the expression level of proteins implicated in OSM-induced sensitization to apoptosis (Fig. 2D). In OSRGAlvOSM cells (31 days after transduction), p53 was phosphorylated/activated. Moreover, the pro-apoptotic protein Bax was upregulated, whereas the anti-apoptotic protein Bcl-2 was downregulated. These modifications in apoptotic protein expression are presumably implicated in



**Fig. 3.** Morphology and expression of osteoblastic/osteocytic markers in OSRGAlvOSM cells. (A) Control OSRGA, OSRGAlvOSM and MLOY-4 cells were cultured in control culture medium and observed by phase contrast microscopy. Original magnification, 100×. (B) Total cell RNA was extracted and analyzed by RT-PCR with primers specific for the indicated cDNA. (C) ALP activity in control OSRGA and OSRGAlvOSM lysates was analyzed using p-nitrophenyl phosphate as a substrate and corrected for protein content. Bars represent the mean ± SD. \**p* < 0.05 compared to control OSRGA cells. (D) Aliquots from whole cell lysates were analyzed by western blotting for sclerostin and actin. (E) CD44 expression was measured by flow cytometry using anti CD44-PE or isotypic control antibodies. The ratio of the mean fluorescence intensity (MFI) of the anti CD44-PE antibody to the MFI of the isotypic control antibody is indicated. CT: Control OSRGA; lvOSM: OSRGAlvOSM; Iso: isotypic control; ND: not done.

apoptosis induced by OSM + Sts, as described previously [12]. Therefore, OSRGAlvOSM cells did not develop resistance to apoptosis induced by OSM + Sts.

#### Morphology and expression of osteoblastic/osteocytic markers were modified in OSRGAlvOSM cells

On OSRGA cells, a 3-day OSM treatment induces an elongated cell shape, reduces expression of the three osteoblastic markers ALP, OC and BSP, and induces GFAP, suggesting a glial or an osteocytic-like differentiation [13]. In these conditions however, no stellate shape or expression of osteocytic markers can be observed (data not shown). As shown in Fig. 3A, 31 days after transduction OSRGAlvOSM cells developed morphological changes with cytoplasmic processes, leading to the stellate shape of the reference murine osteocytic cell line MLO-Y4 [19], whereas OSRGA cells transduced with lvGFP had the same quadrangular morphology as control OSRGA cells (data not shown).

These morphological changes were associated with a reduced ALP mRNA level (Fig. 3B) and activity (Fig. 3C) in OSRGAlvOSM cells (31 days after transduction) compared to control OSRGA cells. Similarly, the two others osteoblastic markers OC and BSP were decreased in OSRGAlvOSM cells. Next, we studied osteocytic markers and observed an induced sclerostin mRNA and protein expression in OSRGAlvOSM cells (Figs. 3B and D) but to a lower level than in MLO-Y4 cells. Similarly E11, the earliest osteocyte-selective glycoprotein [19], was enhanced in OSM-over-expressing cells to a level even higher than in MLO-Y4 cells (Fig. 3B). CD44 membranous expression, a cell-surface glycoprotein highly expressed in osteocytes in comparison to osteoblasts [23], was also enhanced in OSRGAlvOSM cells (Fig. 3E). In contrast, DMP1 (Dentin Matrix Protein 1), a phosphorylated extracellular matrix-associated protein expressed in mineralized tissues and predominantly in osteocytes [24,25], and PheX (Phosphate-regulating gene with Homologies to Endopeptidases on the X chromosome), a glycoprotein expressed in osteoblasts and osteocytes [26], were reduced in OSRGAlvOSM cells (Fig. 3B). Thus after one month, OSRGAlvOSM cells did differentiate into osteocyte-like cells, but not all osteocytic markers were upregulated.

#### Analysis of ROSlvOSM cell growth, apoptosis and differentiation

In order to confirm the results obtained with OSRGAlvOSM, we transduced ROS 17/2.8 osteosarcoma cells with lvOSM. Fourteen days after transduction, the conditioned media from ROSlvOSM cells contained more than 10 ng/mL of OSM (data not shown). Like in OSRGA cells, ROSlvOSM had a slower growth rate than control ROS cells (Supplementary Fig. S1A). The doubling time for control ROS cells was 44 h versus 59 h for ROSlvOSM cells. 31 days after transduction, ROSlvOSM cells treated with Sts (100 nM) had a reduced viability (data not shown) and a 12-fold increase in caspase-3 activity (Supplementary Fig. S1B) compared to control ROS cells, indicating a sensitization to apoptosis.

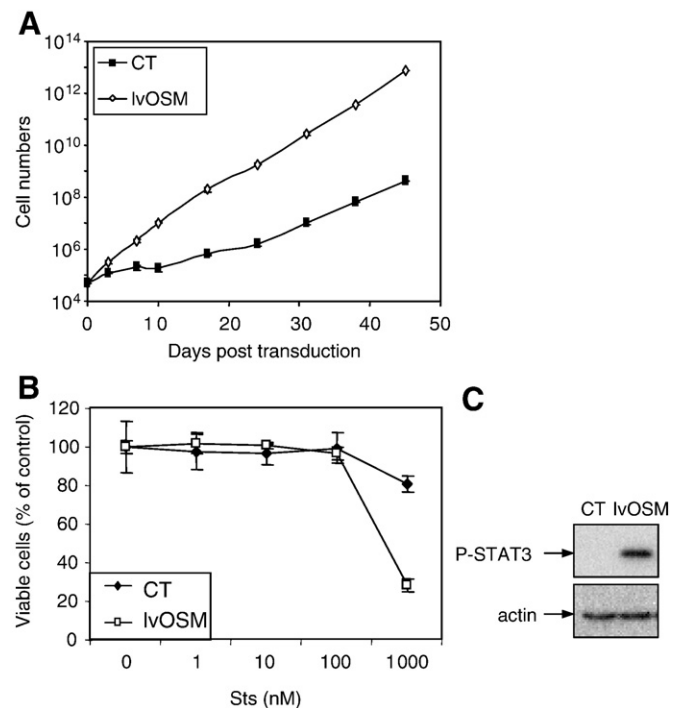
ROSLvOSM cells were analyzed for morphological changes until day 75 post-transduction. As observed with OSRGAlvOSM cells, they adopted an elongated shape around day 4, but they never adopted a stellate shape, even in a medium favoring osteoblast differentiation (containing ascorbic acid and Na  $\beta$ -glycerophosphate; data not shown). 31 days after transduction, these morphological changes were associated with a reduced ALP, BSP and OC mRNA level (Supplementary Fig. S1C) in ROSlvOSM cells compared to control ROS cells. Moreover, E11 was enhanced in ROSlvOSM cells whereas sclerostin, PheX and DMP-1 were not modulated. These results suggested that ROSlvOSM cells also differentiated into osteocyte-like cells, but were presumably blocked at an earlier stage of osteocyte differentiation than OSRGAlvOSM cells.

CalvariallvOSM cells had a decrease doubling time but remained sensitive to apoptosis induced by OSM + Sts

To determine whether long term treatment with OSM would also induce osteocyte differentiation of non transformed osteoblasts, we next transduced rat calvaria cells with lvOSM. Two independent transductions with lvOSM were performed with similar results. Fourteen days after transduction, the bio-assay for OSM production using the neutralizing antibody indicated that the conditioned media from calvariallvOSM cells contained more than 10 ng/mL of OSM (data not shown). In contrast to OSRGAlvOSM and ROSlvOSM cells, calvariallvOSM cells had a higher growth rate than control calvaria cells. The doubling time for control calvaria cells was 87 h versus 41 h for calvariallvOSM cells (Fig. 4A). As described below, calvariallvOSM developed morphological changes, leading to a stellate shape, as soon as 24 days after transduction. Therefore, the subsequent experiments were performed between 24 and 31 days after transduction.

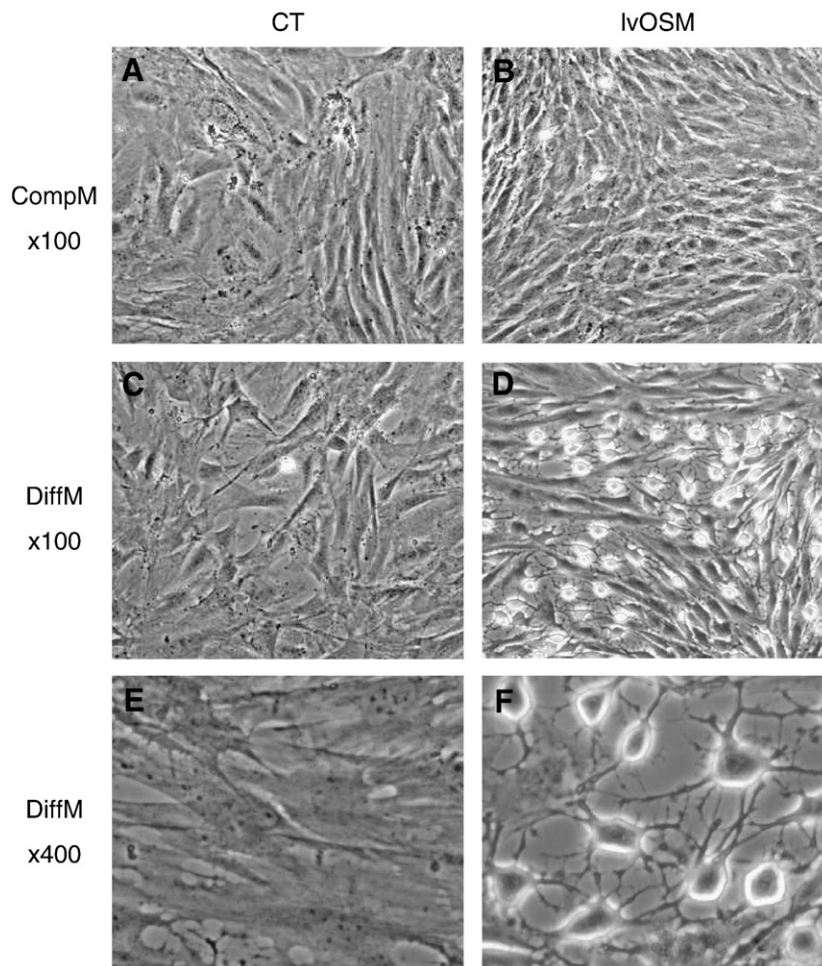
As shown in Fig. 4B, control calvaria cells were slightly affected by Sts whereas calvariallvOSM cells (24 days after transduction) were sensitized to cell death induced by 1  $\mu$ M of Sts. However, a 10-fold increase in Sts was needed to reach the cell death observed in OSRGAlvOSM cells (Fig. 2A). Transduction of calvaria cells with lvGFP had no effect on cell viability (data not shown).

We also observed that STAT3 was activated in calvariallvOSM cells 24 days after transduction (Fig. 4C), confirming that non transformed calvaria cells also remained sensitive to OSM after several weeks of treatment.



**Fig. 4.** CalvariallvOSM cells grew more quickly than control calvaria cells but remained sensitive to apoptosis induced by OSM + Sts. (A) Control calvaria and calvariallvOSM cells were counted one or two times per week for 45 days. (B) After 3 days in culture, the number of viable cells was estimated by an XTT assay with increasing concentrations of Sts (1–1000 nM) added overnight. (C) Aliquots of control calvaria and calvariallvOSM lysates performed 14 days after transduction were analyzed by western blotting for phospho-STAT3 (Tyr705; P-STAT3) and actin. CT: Control calvaria; lvOSM: calvariallvOSM; OSM: oncostatin M; Sts: staurosporine; STAT: signal transducer and activator of transcription.





**Fig. 5.** CalvarialvOSM cells presented osteocytic morphological changes in the presence of ascorbic acid and Na  $\beta$ -glycerophosphate. (A, B) Control calvaria and calvarialvOSM cells were cultured for 24 days after transduction in complete medium (compM) and observed by phase contrast microscopy. Original magnification, 100 $\times$ . (C–F) Control calvaria and calvarialvOSM cells were cultured for 10 days after transduction in compM and then for 14 days in a differentiation medium (diffM) containing 50  $\mu$ g/ml freshly prepared ascorbic acid and 10 mM Na  $\beta$ -glycerophosphate and observed by phase contrast microscopy. Original magnification, 100 $\times$  or 400 $\times$ . CT: Control calvaria; lvOSM: calvarialvOSM.

#### *CalvarialvOSM cells presented osteocytic morphological changes in the presence of ascorbic acid and Na $\beta$ -glycerophosphate*

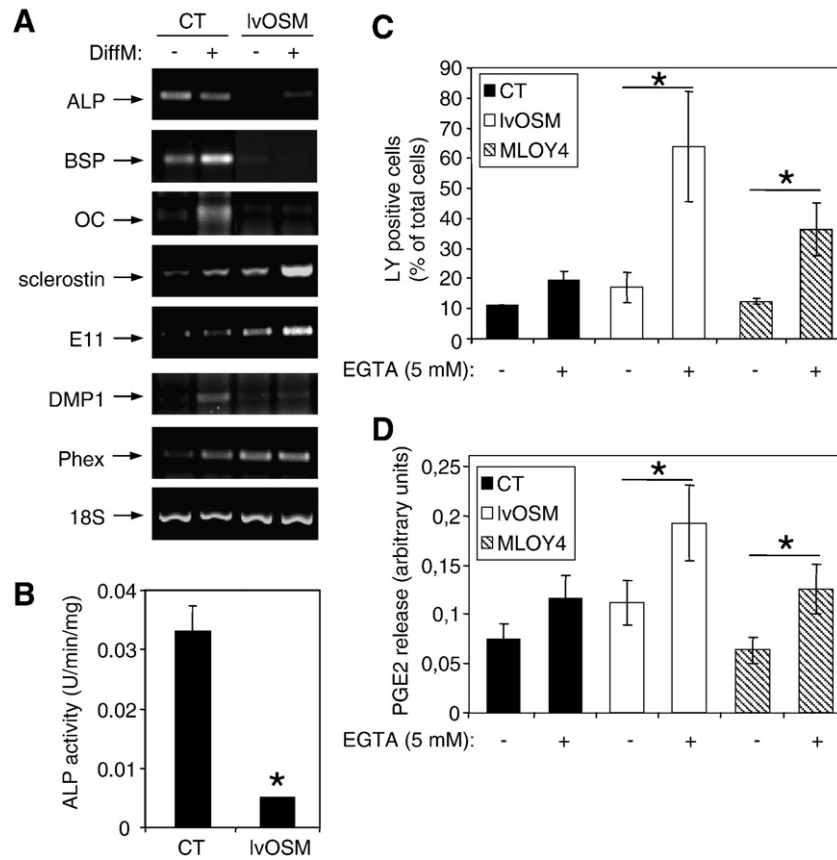
As OSRGAlvOSM and ROSlvOSM cells presented morphological changes, we examined the effect of long term OSM treatment on calvaria cell morphology when cultured in complete medium (compM) or in differentiation medium containing ascorbic acid and Na  $\beta$ -glycerophosphate (diffM), a medium known to induce osteoblast differentiation. Control calvaria cells appeared as spread cells with a large cell body and presented the same morphology in compM or diffM (Figs. 5A, C and E). On the contrary, calvarialvOSM cells in compM (24 days after transduction) appeared more compact and lengthy (Fig. 5B). In diffM, about 40% of the cells became more refringent with a higher nucleocytoplasmic ratio, and presented a stellate shape with multiple and slender cytoplasmic processes (Fig. 5D and F), like the osteocytes [27].

#### *CalvarialvOSM cells expressed osteocytic markers and functional hemichannels*

The morphological changes observed in calvarialvOSM cells cultured in diffM were also associated with modification in osteoblastic and osteocytic markers (24 days after transduction). In control calvaria cells cultured in diffM, we observed an increase in BSP and OC mRNA levels whereas ALP mRNA level was not

modulated, confirming an enhanced osteoblast differentiation (Fig. 6A). CalvarialvOSM cells in compM or diffM expressed lower amounts of ALP, BSP and OC mRNA than control calvaria cells (Fig. 6A) and had a reduced ALP activity (Fig. 6B). Sclerostin, E11, DMP1 and Phex mRNA levels were slightly induced in control calvaria cells cultured in diffM (Fig. 6A). In calvarialvOSM cells cultured in compM and even more in diffM, we observed enhanced sclerostin, E11 and Phex mRNA levels whereas DMP1 mRNA level was reduced compared to control calvaria cells. Osteocytic markers (except DMP1) were enhanced in calvarialvOSM cells, suggesting that these cells were able to differentiate into osteocyte-like cells when placed in a medium favoring osteoblast differentiation.

During bone remodeling, osteocytes have a unique function as sensor of mechanical strain and stress, through cell–cell communications (Gap junctions) and un-opposed connexons (hemichannels) [28]. It has been shown that oscillating fluid flow or calcium chelation with EGTA activate hemichannels formed by connexins 43 in osteocytes but not in osteoblasts [21]. In addition, hemichannel activation in osteocytes induces release of PGE2 [21]. Therefore, to study the osteocyte function, we explored hemichannel activation in calvarialvOSM cells (24 days after transduction) through a specific dye uptake assay. EGTA induced a significant increase in LY uptake in MLO-Y4 and calvarialvOSM cells but not in control calvaria cells (Fig. 6C). Similarly, EGTA significantly induced PGE2 secretion in MLO-Y4 and calvarialvOSM cells but not in control calvaria cells (Fig. 6D). In



**Fig. 6.** CalvarialvOSM cells presented a decrease in osteoblastic markers, an increase in osteocytic markers and functional hemichannels. (A) Total cell RNA was extracted 24 days post-transduction as indicated in Fig. 5 and analyzed by RT-PCR with primers specific for the indicated cDNA. (B) ALP activity in control calvaria and calvarialvOSM lysates was analyzed using p-nitrophenyl phosphate as a substrate and corrected for protein content. Bars represent the mean  $\pm$  SD. \* $p < 0.05$  compared to control calvaria cells. (C) Lucifer yellow dye uptake was quantified in MLO-Y4, control calvaria and calvarialvOSM cells treated or not with EGTA (5 mM) for 30 min. (D) PGE2 release was quantified in MLO-Y4, control calvaria and calvarialvOSM cells treated or not with EGTA (5 mM) for 4 h. CT: Control calvaria; lvOSM: calvarialvOSM. Bars represent the mean  $\pm$  SD. \* $p < 0.05$  compared to untreated cells.

contrast in OSRGAlvOSM or ROSlvOSM cells, EGTA did not induce PGE2 secretion (data not shown).

**Discussion**

In this study, we demonstrate that long term OSM treatment does not induce resistance to this cytokine in osteosarcoma or non transformed osteoblastic cells. After several weeks of treatment, OSM still regulates proliferation and continues to sensitize the cells to apoptosis induced by Sts, in association with a permanent activation of STATs. These results are in sharp contrast to those obtained with melanoma cells. Indeed in melanoma cells, long term OSM treatment induces OSM resistance through either the loss of its receptor or signaling defects impacting growth inhibition by OSM [22]. Moreover, we observed in lvOSM-transduced cells (i) a decrease in osteoblastic markers, (ii) morphological changes leading to a stellate shape similar to osteocytes [27] and (iii) an increase in several osteocytic markers associated with functional hemichannels, confirming an osteocyte-like differentiation. However, these changes were observed at varying degrees depending on the cellular model (OSRGA, ROS 17/2.8 or calvaria cells).

Short term OSM treatment has been shown to inhibit in vitro the proliferation of several cell lines derived from solid tumors such as melanoma [7], breast and lung cancer [8], hepatoma [9], glioblastoma [10] or osteosarcoma [11] as well as non transformed cells such as human breast epithelial cells [29]. Moreover, glioblastoma cells stably transfected with the OSM gene grow slower in vitro or after implantation into nude mice brains, providing arguments for a

therapeutic application of OSM [30]. We observe the same cytostatic effect in vitro with OSRGAlvOSM and ROSlvOSM cells, and future experiments after their injection into rat femurs will determine if stable OSM over-production in the bone-tumor environment is also anti-tumorigenic for osteosarcoma. In contrast, OSM is able to enhance proliferation on others tumor cells derived from myeloma [31] and Kaposi sarcoma [32] or normal cells like dermal fibroblasts [33]. This enhanced effect of OSM on cell growth is also observed with calvarialvOSM cells but the mechanisms implicated are largely unknown. One possibility is that the differentiation or the transformation status dictates the growth response to OSM.

In spite of these opposite effects on proliferation in osteosarcoma versus calvaria cells, OSM appears to have a similar role on osteoblast/osteocyte differentiation. Indeed, OSM is known to have a dual effect on osteogenesis depending on the duration of the OSM treatment or on the differentiation stage of the osteoblast or osteosarcoma cells. OSM stimulates osteoblast differentiation on osteoblastic precursors, but longer OSM-treatments on osteoblastic precursors or osteosarcoma cells lead to morphological changes associated with a decrease in osteoblastic markers [13, 34]. These results suggest either a blockade at a pre-osteoblastic stage or the terminal differentiation of the cells into osteocytes, characterized by reduced osteoblastic marker expression [5]. In fact, we provide the first evidences that the phenotype of osteosarcoma and calvaria cells transduced with lvOSM is consistent with an osteocytic one. First, OSRGAlvOSM and calvarialvOSM cells when cultured in a medium favoring osteoblast differentiation become more refringent with a higher nucleocytoplasmic ratio, and present a stellate shape with multiple and

slender cytoplasmic processes like the osteocytes. Second, several osteocytic markers such as sclerostin and/or E11 are enhanced in OSRGAlvOSM, ROSlvOSM and calvarialvOSM cells, suggesting that these cells are able to differentiate into osteocytic-like cells. However, DMP-1 is not induced or even reduced in our three cellular models. This bone matrix protein may be implicated in the transformation of pre-osteocytes into osteocytes [25] and consequently, the low DMP-1 mRNA level may be in favor of a pre-osteocyte rather than an osteocyte differentiation. Phex is reduced but still detected in OSRGAlvOSM cells, is stable in ROSlvOSM cells whereas it is up-regulated in calvarialvOSM cells. This glycoprotein is detected in osteoblasts and osteocytes but not in osteoblast precursors [26,35]. Consequently, the detection of Phex mRNA level in OSM-treated-cells suggests that the inhibitory effect of OSM on osteoblastic markers is not due to a blockade of the cells in a pre-osteoblast stage but to an enhanced differentiation into pre-osteocyte. The enhanced E11 mRNA levels in OSRGAlvOSM, ROSlvOSM and calvarialvOSM cells also support this hypothesis. Although E11 expression seems to be variable, this marker could characterize pre-osteocytes rather than fully-differentiated osteocytes [36].

It should be noted that the osteocytic differentiation stage seems to depend on the cellular model. Indeed, E11 is the only osteocytic marker over-expressed in ROSlvOSM cells, and these cells adopt an elongated shape but not a stellate one, suggesting that they are blocked at an earlier stage of osteocytic differentiation than OSRGAlvOSM and calvarialvOSM cells. Whether ROS 17/2.8 cells have an altered machinery for osteocytic differentiation, e.g. in transcription factors implicated in the osteoblast to osteocyte transition, deserves further studies. In addition, only calvarialvOSM cells develop functional hemichannels, a characteristic of osteocytes related to their mechanosensing capacities [21,28]. CalvarialvOSM cells seem to reach a higher stage of osteocyte differentiation than OSRGAlvOSM or ROSlvOSM cells, and therefore could represent a valuable new tool to generate osteocyte-like cells in culture, with some functional properties of osteocytes. It should also be noted that long term treatment of calvaria cells with exogenously added recombinant OSM does allow to obtain pre-osteocytes in culture, but a longer culture period is necessary (40 days against 24 days for calvarialvOSM; Brounais et al., unpublished results). It is possible that this cytokine is unstable in culture or that an autocrine loop favors a faster osteoblast to osteocyte differentiation.

We also observed that ORGAlvOSM and ROSlvOSM cells, which are well differentiated osteosarcoma cells, do not need a differentiation medium to change their morphology and to express osteocytic markers whereas calvaria cells, comprising mainly osteoblast precursors, need (i) to be cultured in ascorbic acid and Na  $\beta$ -glycerophosphate to induce osteogenesis and (ii) to over-express OSM to induce the osteocytic differentiation. Moreover, we could culture and split OSRGAlvOSM cells with an osteocytic morphology during several months whereas, after about 15 days in culture, calvarialvOSM cells with a stellate shape did not grow anymore and died shortly thereafter (Brounais et al., unpublished results). It has been shown that osteocyte differentiation is associated with programmed cell death: 65% of the osteoblasts undergo apoptosis and only 10% to 30% really transform into osteocytes depending on the cellular model [36]. In line with these observations, we observed that OSM-induced pre-osteocyte differentiation correlates with the sensitization to apoptosis induced by Sts. As observed previously [12], this particularly high sensitivity to apoptosis in pre-osteocytes is mediated through p53 activation and induction of the Bax/Bcl2 ratio, indicating that the mitochondrial apoptotic pathway is activated in these cells.

One intriguing question is whether this induction of osteocyte differentiation by OSM could be physiologically relevant *in vivo*. Over-expression of OSM in transgenic mice or through adenovirus gene transfer results in new immature bone and new periosteal bone

deposition, with increased number of osteoblasts but osteocytes were never analyzed [16,37]. In contrast, we described that over-expression of OSM in rats results in reduced bone serum markers (ALP and OC) and reduced trabecular bone [14]. These discrepancies could be explained by the different locations (local versus systemic), levels and durations of the OSM production. Whatever the reason, we have now to re-evaluate these data considering that long term OSM treatment could lead to osteocyte differentiation *in vivo*. In this field of research, the stably modified osteoblastic cells over-expressing OSM could be used as a stable local source of OSM (studies in progress in the laboratory).

In conclusion, osteosarcoma cells stably producing OSM do not develop resistance to this cytokine, contrary to melanoma cells, and could be a valuable new tool to study the anti-cancer effect of this cytokine. Moreover, the differentiation status of OSM-over-expressing osteoblastic cells does not seem to be a pre-osteoblast phenotype but rather a pre-osteocyte one. This enhanced differentiation is associated with a sensitization to apoptosis. Normal calvaria cells differentiated into pre-osteocytes do not divide anymore and have a weak lifespan in culture, whereas transformed osteoblasts (osteosarcoma cells) with a pre-osteocyte phenotype can be maintained in culture. Overall, we provide here new culture conditions to obtain transformed or non transformed osteocytes/pre-osteocytes, a cell type which is difficult to obtain in culture whereas it represents the major cellular contingent in bone.

## Acknowledgments

We thanks Stéphane Télétchéa for critical comments on the manuscript and Inserm, the Ministère de la Recherche, La Ligue Contre le Cancer (comité Grand Ouest) and the Région Pays de la Loire (project CIMATH: Ciblage Moléculaire et Applications Thérapeutiques) for their grant support. BB is a recipient of a fellowship from the Ministère de la Recherche.

## Appendix A. Supplementary data

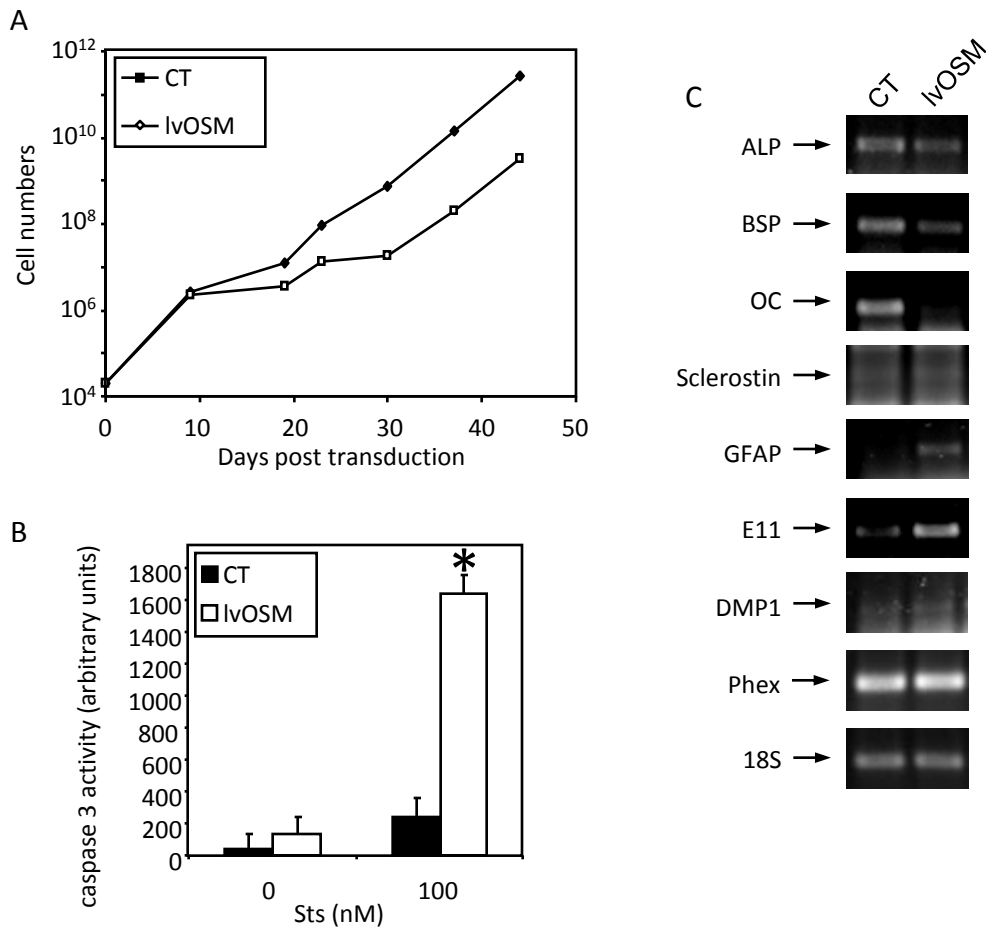
Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bone.2008.12.021.

## References

- [1] Tanaka M, Miyajima A. Oncostatin M, a multifunctional cytokine. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2003;149:39–52.
- [2] Auguste P, Guillet C, Fourcin M, Olivier C, Veziers J, Poupard-Barthelax A, et al. Signaling of type II oncostatin M receptor. *J Biol Chem* 1997;272:15760–4.
- [3] Chen SH, Benveniste EN. Oncostatin M: a pleiotropic cytokine in the central nervous system. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;15:379–91.
- [4] Baumann H, Wang Y, Richards CD, Jones CA, Black TA, Gross KW. Endotoxin-induced renal inflammatory response. Oncostatin M as a major mediator of suppressed renin expression. *J Biol Chem* 2000;275:22014–9.
- [5] Kamiya A, Kinoshita T, Ito Y, Matsui T, Morikawa Y, Senba E, et al. Fetal liver development requires a paracrine action of oncostatin M through the gp130 signal transducer. *EMBO J* 1999;18:2127–36.
- [6] Langdon C, Kerr C, Hassen M, Hara T, Arsenault AL, Richards CD. Murine oncostatin M stimulates mouse synovial fibroblasts *in vitro* and induces inflammation and destruction in mouse joints *in vivo*. *Am J Pathol* 2000;157:1187–96.
- [7] Horn D, Fitzpatrick WC, Gompper PT, Ochs V, Bolton-Hansen M, Zarling J, et al. Regulation of cell growth by recombinant oncostatin M. *Growth Factors* 1990;2:157–65.
- [8] Grant SL, Begley CG. The oncostatin M signalling pathway: reversing the neoplastic phenotype? *Mol Med Today* 1999;5:406–12.
- [9] Klausen P, Pedersen L, Jurlander J, Baumann H. Oncostatin M and interleukin 6 inhibit cell cycle progression by prevention of p27kip1 degradation in HepG2 cells. *Oncogene* 2000;19:3675–83.
- [10] Halfter H, Lotfi R, Westermann R, Young P, Ringelstein EB, Stogbauer FT. Inhibition of growth and induction of differentiation of glioma cell lines by oncostatin M (OSM). *Growth Factors* 1998;15:135–47.
- [11] Bellido T, Borba VZ, Roberson P, Manolagas SC. Activation of the Janus kinase/STAT (signal transducer and activator of transcription) signal transduction pathway by interleukin-6-type cytokines promotes osteoblast differentiation. *Endocrinology* 1997;138:3666–76.

- [12] Chipoy C, Brounais B, Trichet V, Battaglia S, Berreur M, Oliver L, et al. Sensitization of osteosarcoma cells to apoptosis by oncostatin M depends on STAT5 and p53. *Oncogene* 2007;26:6653–64.
- [13] Chipoy C, Berreur M, Couillaud S, Pradal G, Vallette F, Colombeix C, et al. Downregulation of osteoblast markers and induction of the glial fibrillary acidic protein by oncostatin M in osteosarcoma cells require PKCdelta and STAT3. *J Bone Miner Res* 2004;19:1850–61.
- [14] Brounais B, Chipoy C, Mori K, Charrier C, Battaglia S, Pilet P, et al. Oncostatin M induces bone loss and sensitizes rat osteosarcoma to the antitumor effect of Midostaurin in vivo. *Clin Cancer Res* 2008;14:5400–9.
- [15] Bellido T, O'Brien CA, Roberson PK, Manolagas SC. Transcriptional activation of the p21 (WAF1, CIP1, SDI1) gene by interleukin-6 type cytokines. A prerequisite for their pro-differentiating and anti-apoptotic effects on human osteoblastic cells. *J Biol Chem* 1998;273:21137–44.
- [16] de Hooge AS, van de Loo FA, Bennink MB, de Jong DS, Arntz OJ, Lubberts E, et al. Adenoviral transfer of murine oncostatin M elicits periosteal bone apposition in knee joints of mice, despite synovial inflammation and up-regulated expression of interleukin-6 and receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand. *Am J Pathol* 2002;160:1733–43.
- [17] Liu F, Aubin JE, Malaval L. Expression of leukemia inhibitory factor (LIF)/interleukin-6 family cytokines and receptors during in vitro osteogenesis: differential regulation by dexamethasone and LIF. *Bone* 2002;31:212–9.
- [18] Thiéry J-PPB, Gongora R, Gongora G, Mazabraud A. Un modèle expérimental d'ostéosarcome chez le rat. II L'ostéosarcome greffable du rat. *Sem Hôp Paris* 1982;58:1686–9.
- [19] Zhang K, Barragan-Adjemian C, Ye L, Kotha S, Dallas M, Lu Y, et al. E11/gp38 selective expression in osteocytes: regulation by mechanical strain and role in dendrite elongation. *Mol Cell Biol* 2006;26:4539–52.
- [20] Demaison C, Parsley K, Brouns G, Scherr M, Battmer K, Kinnon C, et al. High-level transduction and gene expression in hematopoietic repopulating cells using a human immunodeficiency [correction of immunodeficiency] virus type 1-based lentiviral vector containing an internal spleen focus forming virus promoter. *Hum Gene Ther* 2002;13:803–13.
- [21] Genetos DC, Kephart CJ, Zhang Y, Yellowley CE, Donahue HJ. Oscillating fluid flow activation of gap junction hemichannels induces ATP release from MLO-Y4 osteocytes. *J Cell Physiol* 2007;212:207–14.
- [22] Lacreusette A BI, Nguyen JM, Pandolfino MC, Dréno B, Jacques Y, Godard A BF. Defective activations of STAT3 Ser727 and PKC isoforms lead to Oncostatin M resistance in metastatic melanoma cells. *J Pathol* in press.
- [23] Hughes DE, Salter DM, Simpson R. CD44 expression in human bone: a novel marker of osteocytic differentiation. *J Bone Miner Res* 1994;9:39–44.
- [24] Toyosawa S, Shintani S, Fujiwara T, Ooshima T, Sato A, Ijuhin N, et al. Dentin matrix protein 1 is predominantly expressed in chicken and rat osteocytes but not in osteoblasts. *J Bone Miner Res* 2001;16:2017–26.
- [25] Rios HF, Ye L, Dusevich V, Eick D, Bonewald LF, Feng JQ. DMP1 is essential for osteocyte formation and function. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2005;5:325–7.
- [26] Ruchon AF, Tenenhouse HS, Marcinkiewicz M, Siegfried G, Aubin JE, DesGroseillers L, et al. Developmental expression and tissue distribution of PheX protein: effect of the Hyp mutation and relationship to bone markers. *J Bone Miner Res* 2000;15:1440–50.
- [27] Tanaka-Kamioka K, Kamioka H, Ris H, Lim SS. Osteocyte shape is dependent on actin filaments and osteocyte processes are unique actin-rich projections. *J Bone Miner Res* 1998;13:1555–68.
- [28] Bonewald LF, Johnson ML. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone* 2008;42:606–15.
- [29] Grant SL, Douglas AM, Goss GA, Begley CG. Oncostatin M and leukemia inhibitory factor regulate the growth of normal human breast epithelial cells. *Growth Factors* 2001;19:153–62.
- [30] Friedrich M, Hoss N, Stogbauer F, Senner V, Paulus W, Ringelstein EB, et al. Complete inhibition of in vivo glioma growth by oncostatin M. *J Neurochem* 2001;76:1589–92.
- [31] Zhang XG, Gu JJ, Lu ZY, Yasukawa K, Yancopoulos GD, Turner K, et al. Ciliary neurotropic factor, interleukin 11, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M are growth factors for human myeloma cell lines using the interleukin 6 signal transducer gp130. *J Exp Med* 1994;179:1337–42.
- [32] Miles SA, Martinez-Maza O, Rezai A, Magpantay L, Kishimoto T, Nakamura S, et al. Oncostatin M as a potent mitogen for AIDS-Kaposi's sarcoma-derived cells. *Science* 1992;255:1432–4.
- [33] Ihn H, Tamaki K. Oncostatin M stimulates the growth of dermal fibroblasts via a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *J Immunol* 2000;165:2149–55.
- [34] Malaval L, Liu F, Vernallis AB, Aubin JE. GP130/OSMR is the only LIF/IL-6 family receptor complex to promote osteoblast differentiation of calvaria progenitors. *J Cell Physiol* 2005;204:585–93.
- [35] Thompson DL, Sabbagh Y, Tenenhouse HS, Roche PC, Drezner MK, Salisbury JL, et al. Ontogeny of PheX/PHEX protein expression in mouse embryo and subcellular localization in osteoblasts. *J Bone Miner Res* 2002;17:311–20.
- [36] Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten PE. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn* 2006;235:176–90.
- [37] Malik N, Haugen HS, Modrell B, Shoyab M, Clegg CH. Developmental abnormalities in mice transgenic for bovine oncostatin M. *Mol Cell Biol* 1995;15:2349–58.

## Supplementary figure S1



### **Supplementary figure S1: Analysis of ROSlvOSM cell growth, apoptosis and differentiation.**

A- Control ROS 17/2.8 and ROSlvOSM cells were counted one or two times per week for 45 days. B- Caspase-3 activity was determined on cell lysates by a fluorometric assay with Sts added for 5h. Bars represent the mean  $\pm$  SD. \* $p < 0.05$  compared to control ROS 17/2.8 cells. C- Total cell RNA was extracted 31 days post-transduction and analyzed by RT-PCR with primers specific for the indicated cDNA. Sts: Staurosporine; CT: Control ROS 17/2.8; lvOSM: ROSlvOSM.



### Complément de discussion à l'article 3

L'OSM a des activités complexes et mal comprises sur la différenciation ostéoblastique. Les travaux présentés dans cet article décrivent les effets de l'OSM à long terme sur les cellules ostéoblastiques normales et transformées.

Tout d'abord, l'article 2 a mis en évidence que l'association de l'OSM et d'un inhibiteur de kinases tel que la Sts pourrait représenter une nouvelle stratégie thérapeutique pour les ostéosarcomes présentant une p53 de type sauvage. Dans cette étude (article 3), nous avons montré que les ostéosarcomes produisant stablement l'OSM ne développent pas de résistance à cette cytokine comme cela avait été observé dans des cellules de mélanomes. En effet, un traitement à long terme avec l'OSM induit une résistance à cette cytokine dans des lignées cellulaires issues de mélanomes métastatiques soit par perte de l'expression de la chaîne réceptrice OSMR soit par un défaut de signalisation intracellulaire (Lacrouette et al., 2007). L'effet cytotatique et pro-apoptotique de l'OSM sur les cellules d'ostéosarcome de rat transduites avec des particules lentivirales codant l'OSM est conservé même après plusieurs semaines de traitement. Ces cellules pourraient donc représenter un nouvel outil intéressant pour étudier les effets anti-cancéreux de l'OSM *in vivo*. Leur injection dans le fémur de rats permettrait de déterminer si une production autocrine locale et stable d'OSM a un effet anti-tumoral.

Cette étude nous a également permis de préciser le rôle de l'OSM sur l'ostéogenèse. Bien que cette cytokine régule de façon différente la prolifération des cellules ostéoblastiques normales (cellules précurseurs de calvaria) et transformées (ostéosarcomes), elle semble avoir le même effet sur la différenciation ostéoblastique. En effet, une diminution des marqueurs ostéoblastiques a été observée dans les cellules transduites avec les particules lentivirales codant l'OSM suggérant soit un blocage de ces cellules au stade pré-ostéoblastique soit l'induction d'une différenciation de type ostéocytaire, ces cellules étant caractérisées par une expression moins importante des marqueurs ostéoblastiques. Nous avons montré pour la première fois qu'un traitement à long terme avec l'OSM semble induire un phénotype ostéocytaire dans les cellules d'ostéosarcome et de calvaria de rat. Tout d'abord, ces cellules présentent des changements morphologiques aboutissant à des formes allongées et/ou étoilées avec une augmentation du ratio nucléo-cytoplasmique comme les ostéocytes (Tanaka-Kamioka et al., 1998). Plusieurs marqueurs ostéocytaires tels que la sclérostine et/ou E11 sont

également induits, suggérant une différenciation ostéocytaire. Cependant, la faible expression de DMP-1 et de Phex semblent indiquer une différenciation en pré-ostéocyte plutôt qu'en ostéocyte (Rios et al., 2005; Ruchon et al., 2000). De plus, seules les cellules de calvaria transduites avec les particules lentivirales codant l'OSM expriment des hémi-canaux fonctionnels, une caractéristique des ostéocytes en relation avec leurs capacités de mécanosenseurs (Bonewald and Johnson, 2008; Genetos et al., 2007). Ces résultats suggèrent que les cellules normales seraient capables d'atteindre un stade ostéocytaire plus avancé que les cellules transformées et pourraient donc représenter un nouvel outil pour générer des ostéocytes en culture.

La différenciation ostéocytaire est associée à une mort cellulaire programmée puisqu'environ 65% des ostéoblastes meurent par apoptose et seuls 10% à 30% se différencient en ostéocytes (Franz-Odenaal et al., 2006). Or, l'OSM sensibilise les cellules d'ostéosarcome et de calvaria à l'apoptose induite par la Sts. Cet effet pourrait donc être en lien avec l'induction d'une différenciation de type ostéocytaire dans ces cellules.

Il reste à déterminer si l'induction d'une différenciation ostéocytaire par l'OSM a un impact physiologique *in vivo*. En effet, la surexpression d'OSM dans les souris transgéniques ou après transfert de gène à l'aide d'un adénovirus induit la formation d'os immature associée à une augmentation du nombre d'ostéoblastes mais les ostéocytes n'ont jamais été analysés (de Hooge et al., 2002; Malik et al., 1995). De même, il serait intéressant d'évaluer le nombre d'ostéocytes dans les souris déficientes pour OSMR afin de déterminer si l'OSM est nécessaire à la différenciation des ostéoblastes en ostéocytes. Enfin, l'implication des autres cytokines de la famille de l'IL-6 devrait être étudiée. De même que l'OSM, dans un modèle de moelle osseuse de rat, le LIF a montré un effet biphasique en fonction du stade de différenciation cellulaire : à des stades très précoces, il inhibe la prolifération et stimule la minéralisation, alors qu'à un stade plus tardif, il inhibe la minéralisation et donc la différenciation (Malaval and Aubin, 2001). Il est donc possible que le LIF, comme l'OSM, ne bloque pas les cellules au stade pré-ostéoblastique mais induise une différenciation de type ostéocytaire. L'IL-6, quant à elle, favorise la différenciation des MSC en ostéoblastes lorsqu'elle est associée à son récepteur soluble (IL-6Rs)(Erices et al., 2002). Cependant, un traitement à plus long terme avec cette cytokine pourrait peut-être également induire une différenciation terminale des cellules en ostéocytes.

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

- **les ostéosarcomes produisant stablement l'OSM ne développent pas de résistance à cette cytokine.**
- **un traitement à long terme avec l'OSM induit une différenciation de type ostéocytaire**
- **le statut de différenciation et/ou de transformation semble important puisque seules les cellules de calvaria transduites avec le lvOSM, expriment des hémicanaux fonctionnels.**

### III. Effets de l'OSM *in vivo*

#### Introduction

L'ostéosarcome est une tumeur maligne caractérisée par l'élaboration d'os ou de substance ostéoïde par les cellules tumorales (Schajowicz, 1993). De multiples dérégulations des protéines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire telles que p53 ou Rb sont impliquées dans le développement des ostéosarcomes (Fuchs and Pritchard, 2002; Lopez-Guerrero et al., 2004). Les traitements actuels associant chirurgie et chimiothérapie, ont très largement amélioré le devenir des patients. Néanmoins, ils montrent aujourd'hui leurs limites, et notamment lorsque des métastases pulmonaires se sont développées, le taux de survie ne dépassant alors pas 30% à cinq ans. Il est donc nécessaire de développer de nouveaux protocoles thérapeutiques.

L'OSM, une cytokine de la famille de l'IL-6, est connue pour inhiber la prolifération, sensibiliser à l'apoptose et induire la différenciation de nombreuses cellules tumorales en culture issues par exemple de mélanome ou d'ostéosarcome, suggérant une application thérapeutique de cette cytokine. Cependant, l'OSM a également des activités complexes et parfois contradictoires sur le tissu osseux. La surexpression de l'OSM *in vivo* par injection d'un adénovirus codant l'OSM murine au niveau du genou de souris induit une inflammation localisée et une destruction de l'os et du cartilage (Richards, 2004) associée à une augmentation du nombre d'ostéoclastes (Hui et al., 2005). Cependant, une formation osseuse associée à la présence de plusieurs couches de cellules de type ostéoblastique est également observée (de Hooge et al., 2002). Les études *in vitro* indiquent, quant à elles, que l'OSM semble avoir un effet biphasique sur l'ostéogenèse dépendant du stade de différenciation du modèle cellulaire utilisé. Ainsi, l'OSM stimulerait les premières étapes de l'ostéogenèse sur des cellules précurseurs mais sur des cellules plus matures et à plus long terme, cette cytokine serait capable d'induire une différenciation de type ostéocytaire caractérisée par une diminution des marqueurs ostéoblastiques et de la formation osseuse ainsi qu'une sensibilisation à l'apoptose. En effet, l'OSM seule n'induit pas la mort cellulaire mais sensibilise les cellules ostéoblastiques et les cellules issues d'ostéosarcomes présentant une p53 sauvage à l'apoptose induite par différents agents dont la Sts.

Ces résultats laissent envisager la possibilité d'une utilisation thérapeutique de l'OSM dans le cadre des ostéosarcomes, notamment en association avec un analogue de la Sts : le Midostaurin (PKC412) ou N-benzoylstaurosporine, dont les effets anticancéreux *in vitro* ont déjà été décrits. Ce dérivé de la Sts est également testé en essais cliniques de phases I et II dans le cadre de pathologies tumorales (Johnstone et al., 2008; Propper et al., 2001; Virchis et al., 2002). Assez bien toléré, le Midostaurin a permis une réduction du taux de lymphocytes et une amélioration des analyses sanguines chez des patients atteints de lymphomes non-Hodgkiniens (Virchis et al., 2002). Dans une étude clinique portant sur des patients atteints de leucémies aigües myéloïdes, le Midostaurin a conduit à une diminution du nombre de lymphoblastes périphériques et de la moelle osseuse (Johnstone et al., 2008). Comme la Sts, le Midostaurin inhibe diverses kinases dont les PKC et Akt (Tenzer et al., 2001).

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

## Article 4

### « L'Oncostatine M induit une perte osseuse et sensibilise les ostéosarcomes de rat à l'effet anti-tumoral du Midostaurin *in vivo* »

**Brounais B**, Chipoy C, Mori K, Charrier C, Battaglia S, Pilet P, Richards CD, Heymann D, Rédini F, Blanchard F. Clin Cancer Res. 2008 Sep 1;14(17):5400-9.

L'Oncostatine M (OSM), une cytokine de la famille de l'Interleukine-6, réduit la prolifération et induit la différenciation des cellules d'ostéosarcome et des ostéoblastes en cellules de type ostéocytaire. De plus, nous avons récemment décrit que l'OSM, via STAT5 et p53, sensibilise les ostéosarcomes et les ostéoblastes à l'apoptose induite par différents inducteurs de mort tels que la Staurosporine (Sts), un inhibiteur de kinases. Le but de cette étude est de déterminer si l'OSM est également capable d'agir en synergie, *in vitro* et *in vivo*, avec le Midostaurin, un agent anticancéreux dérivé de la Sts et actuellement utilisé lors d'essais cliniques.

Nous avons utilisé la lignée cellulaire issue d'ostéosarcome OSRGA pour laquelle nous disposons d'un modèle tumoral chez le rat. *In vitro*, les cellules OSRGA sont résistantes à l'effet pro-apoptotique du Midostaurin même à forte concentration (supérieure à 10 $\mu$ M), alors que les cellules traitées à l'OSM meurent en présence de Midostaurin (IC<sub>50</sub>=1 $\mu$ M). Cette mort cellulaire par apoptose est associée à une désorganisation de la membrane, une condensation nucléaire et une activation de la caspase 3. Nous avons ensuite analysé l'effet anti-tumoral potentiel de l'association OSM+Midostaurin dans notre modèle d'ostéosarcome de rat. Nous avons tout d'abord observé qu'un adénovirus codant l'OSM (AdOSM ; 1.10<sup>9</sup> PFU injecté en i.m.) seul réduit les concentrations sériques des marqueurs ostéoblastiques et ostéoclastiques en corrélation avec une diminution de 42% du volume osseux trabéculaire (volume trabéculaire du tibia BV/TV déterminé par micro-scanner). De plus, l'AdOSM induit une formation osseuse ectopique anarchique au contact de la tumeur (surface osseuse ectopique BS/BV augmentée) même chez les animaux traités au Zolédronate pour inhiber l'ostéolyse associée aux tumeurs. De plus, l'association AdOSM+Midostaurin (30 mg/kg /jour, voie orale) est capable de prévenir la progression de la tumeur primaire et la dissémination métastatique pulmonaire, alors que ces agents seuls n'ont pas d'effet anti-tumoral. De plus, une augmentation de la nécrose et de la fibrose au niveau de la tumeur est

observée lorsque ces deux agents sont associés. Les seuls effets secondaires observés sont une perte de poids limitée et une cachexie.

En conclusion, les expérimentations *in vitro* et *in vivo* indiquent que l'OSM seule n'induit pas la mort cellulaire des ostéoblastes et des ostéosarcomes mais inhibe la formation osseuse par ces cellules. De plus, l'OSM ne semble pas posséder d'effet pro-résorptif important *in vivo* et son rôle potentiel sur l'ostéoclastogenèse nécessite des études plus approfondies. Etant donné que l'OSM sensibilise à l'apoptose les ostéosarcomes présentant une p53 sauvage, l'utilisation d'inhibiteurs de kinases tels que le Midostaurin en association avec l'OSM pourrait représenter de nouveaux traitements anticancéreux.

## Oncostatin M Induces Bone Loss and Sensitizes Rat Osteosarcoma to the Antitumor Effect of Midostaurin *In vivo*

Bénédicte Brounais,<sup>1,2</sup> Céline Chipoy,<sup>1,2</sup> Kanji Mori,<sup>1,2</sup> Céline Charrier,<sup>1,2</sup> Séverine Battaglia,<sup>1,2</sup> Paul Pilet,<sup>3</sup> Carl D. Richards,<sup>4</sup> Dominique Heymann,<sup>1,2</sup> Françoise Rédini,<sup>1,2</sup> and Frédéric Blanchard<sup>1,2</sup>

**Abstract Purpose:** In cultures, the cytokine oncostatin M (OSM) reduces the growth and induces differentiation of osteoblasts and osteosarcoma cells into glial/osteocytic cells. Moreover, OSM sensitizes these cells to apoptosis driven by various death inducers such as the kinase inhibitor staurosporine. Here, we asked whether OSM would have similar effects *in vivo*.

**Experimental Design:** Adenoviral gene transfer of OSM (AdOSM) was done in naive and osteosarcoma-bearing rats, alone or in combination with Midostaurin (PKC412), a derivative of staurosporine currently used in cancer clinical trials. Bone variables were analyzed by micro-computed tomography scanner, by histology, and by the levels of various serum bone markers. Osteosarcoma progression was analyzed by the development of the primary bone tumor, evolution of pulmonary metastasis, histology (necrosis and fibrosis), and animal survival.

**Results:** In naive rats, AdOSM reduced serum osteoblastic and osteoclastic markers in correlation with a reduced trabecular bone volume. In an osteosarcoma rat model, the combination of AdOSM with PKC412 reduced the progression of the primary bone tumor, pulmonary metastatic dissemination, and increased overall survival, whereas these agents alone had no antitumor effect. Increased tumor necrosis and tissue repair (fibrosis) were observed with this combination.

**Conclusion:** These *in vivo* experiments confirm that systemic OSM overexpression alters osteoblast/osteosarcoma activity. Because OSM sensitizes rat osteosarcoma to apoptosis/necrosis, the use of kinase inhibitors such as Midostaurin in association with OSM could represent new adjuvant treatments for this aggressive malignancy.

Osteosarcomas are rare bone-forming tumors that affect primarily young adults. These cancer cells arise from osteoblasts, the cells responsible for bone apposition. Rather than a unique gene alteration, multiple deregulations of the proteins

controlling the G<sub>1</sub>-S-phase cell cycle checkpoint (p53, Rb, p16<sup>INK4A</sup>, MDM2, etc.) are involved in the pathogenesis and chemoresistance of osteosarcomas (1, 2). Although the prognosis and chemotherapies of patients with osteosarcoma were improved significantly in the seventies, the survival rate after 5 years is only 60% to 70% and as low as 30% when pulmonary metastases are detected at diagnosis. These survival rates were not further ameliorated during the past decades (3, 4).

Thus, new therapies that inhibit the growth or metastasis of these tumors will have a significant effect on patient survival. Cytokines of the interleukin-6 (IL-6) family, such as oncostatin M (OSM), are recognized as pleiotropic factors influencing many pathophysiologic events in several organs, including bone (5–8). These cytokines have all been reported to stimulate osteoclastogenesis and, in some cases, to stimulate osteoblast differentiation in cell cultures. However, recent *in vivo* and genetic data have challenged these concepts (reviewed in refs. 5–8). For example, transgenic mice overexpressing IL-6 showed a decrease in osteoblast and osteoid as well as a decrease (9) or increase (10) in osteoclast and bone resorption.

Overexpression of OSM using adenoviruses in mouse joints induced inflammation, cartilage, and bone destruction (11), in association with increased osteoclast number (12), but also

**Authors' Affiliations:** <sup>1</sup>INSERM, ERI 7; <sup>2</sup>Université de Nantes, Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, EA3822; <sup>3</sup>INSERM, U791, Nantes, France; and <sup>4</sup>Center for Gene Therapeutics, McMaster University, Hamilton, Ontario, Canada  
Received 10/31/07; revised 1/8/08; accepted 1/21/08.

**Grant support:** INSERM, Ministère de la Recherche, La Ligue Contre le Cancer (Comité Grand Ouest), and Région Pays de la Loire (Project Ciblage Moléculaire et Applications Thérapeutiques); Ministère de la Recherche fellowship (B. Brounais); and Région Pays de la Loire fellowship (C. Chipoy).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

**Note:** Supplementary data for this article are available at Clinical Cancer Research Online (<http://clincancerres.aacrjournals.org/>).

B. Brounais and C. Chipoy contributed equally to this work.

Current address for C. Chipoy: Molecular Oncology Group, McGill University, Montreal, Quebec, Canada.

**Requests for reprints:** Frédéric Blanchard, Université de Nantes, Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, EA3822, Faculté de Médecine, 1 rue Gaston Veil, F-44035 Nantes Cedex 1, France. Phone: 33-240-41-28-46; Fax: 33-240-41-28-60;

E-mail: frederic.blanchard@univ-nantes.fr.

©2008 American Association for Cancer Research.

doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-4781



induced periosteal bone apposition (13). However, *in vitro* OSM appeared to have a dual effect on osteoblast differentiation. Thus, various reports indicated that OSM enhances osteoblast marker expression and bone nodule formation on osteoblast precursors or on the cell line MG63, a p53-negative osteosarcoma (14–16). In correlation, OSM blocks MG63 cells in the G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> phase of the cell cycle by inducing the cyclin-dependent kinase inhibitor p21<sup>WAF1</sup> (16). However, other reports on normal or transformed osteoblasts have shown an inhibitory effect of OSM on bone formation and markers expression *in vitro* (14, 15). It is possible that these dual effects depend on the differentiation stage of the osteoblast or osteosarcoma cells: on precursor cells, OSM would stimulate the first stages of differentiation, but on more mature cells it would stimulate the terminal differentiation into osteocytes characterized by reduced marker expression/bone formation/proliferation and enhanced apoptosis (15). Indeed, we observed that OSM alone does not induce cell death, but wild-type p53 osteoblastic or osteosarcoma cells treated with OSM are particularly sensitive to apoptosis induced by staurosporine (STS), UV, or tumor necrosis factor- $\alpha$  (17). OSM, through activation of STAT5 and p53, increases the Bax/Bcl2 ratio, which controls the mitochondrial apoptotic pathway, but concomitantly activates antiapoptotic signals through the kinases protein kinase C $\delta$  and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt (17).

Altogether, these results suggest that IL-6-type cytokines, especially OSM, could have opposite or dual effects on bone formation and resorption depending on the model, the pathophysiologic condition, and the presence of other inflammatory cytokines. Not surprisingly, these cytokines have also been described as pro-bone or anti-bone cancer agents. As a consequence, clinical trials were done either to use these cytokines as anticancer adjuvants (18) or to neutralize their unwanted effects on tumor growth and osteolysis (19). In fact, IL-6-type cytokines are known as potent growth inhibitors or stimulators depending on the cancer cell type. As indicated before (14–17), because OSM inhibits proliferation, induces differentiation, and sensitizes various osteosarcoma cells to apoptosis, this cytokine could represent a new adjuvant treatment for this aggressive malignancy. Moreover, *in vivo* recombinant IL-6 and OSM mediates tumor regression of various sarcomas and carcinomas that form lung or liver metastases (20, 21), but there are no reports describing a similar effect on bone metastases or primary bone cancers. In contrast, several reports indicated that IL-6-type cytokines that are produced in the bone-tumor environment, mainly IL-6, interleukin-11, and leukemia inhibitory factor (LIF), participate in bone resorption and in tumor proliferation in bone (22–24). Therefore, they are believed to participate to the vicious cycle that takes place between bone tumor proliferation and associated inflammation and osteolysis (25, 26).

In this study, we sought to determine the role of OSM overexpression *in vivo* on osteosarcoma development and associated bone remodeling. In rats, OSM appeared to act as an inhibitor of both osteoblast and osteoclast activities, modulating bone turnover in normal or cancer situations. Moreover, *in vivo* OSM sensitizes osteosarcoma cells to the antitumor effect of Midostaurin (PKC412), a derivative of

STS and anticancer agent currently used in various clinical trials (27, 28).

## Materials and Methods

**Cell viability.** The rat osteosarcoma OSRGA cell line, derived from the osteosarcoma used in the present study, was described previously (15) and cultured in DMEM (BioWhittaker) supplemented with 5% fetal bovine serum. Cells were plated into 96-well plates at an initial density of 1,500 per well and cultured with recombinant mouse OSM, human IL-6, human soluble IL-6 receptor (IL-6Rs; R&D Systems), human LIF (a kind gift from Dr. A. Godard, INSERM U601), STS (Sigma), or Midostaurin (PKC412; *N*-benzoyl-STS; kindly provided by Dr. J. Roesel, Novartis Pharma) before adding XTT reagents (Roche Molecular Biomedicals). After incubation for 5 h at 37°C, the absorbance was read at 490 nm. All assays were done in triplicate.

**Caspase-3 activity.** Subconfluent OSRGA cell cultures in 24-well plates were treated as indicated with OSM, STS, PKC412, methotrexate (Calbiochem), doxorubicin (Sigma), mafosfamide (kindly provided by Dr. A. Martinez, Baxter Oncology), or cisplatin (Calbiochem) and then lysed in radioimmunoprecipitation assay buffer [150 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris (pH 7.4), 1% NP-40, 0.25% sodium deoxycholate, 1 mmol/L Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 0.5 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mmol/L NaF, 10  $\mu$ g/mL leupeptin, 10  $\mu$ g/mL aprotinin]. Lysates were cleared of debris by centrifugation at 12,000  $\times$  g for 15 min. Caspase-3 activity was assessed on 10  $\mu$ L total cell lysates using the kit CasPACE Assay System, Fluorometric (Promega) as indicated previously (17). Results were expressed in arbitrary units and corrected for protein content as determined by the BCA kit (Sigma).

**Cell motility and adhesion.** For cell motility, OSRGA cells were cultured in six-well plate until confluent and treated or not with OSM (100 ng/mL). A slit was then done on the cell monolayer and phase-contrast photographs were taken using a Leica microscope every 24 h.

For cell adhesion, OSRGA cells were treated for 3 days with OSM (100 ng/mL), dissociated with PBS-EDTA (BioWhittaker), washed twice with DMEM containing 5% FCS, and plated into 96-well plates coated with collagen I, vitronectin, fibronectin, or Matrigel matrix (all from BD Biosciences) at an initial density of 2.10<sup>4</sup> cells per well. After indicated times, cells were washed with PBS to eliminate nonadherent cells. Then, XTT reagents (Roche Molecular Biomedicals) were added to each well and incubated for 5 h at 37°C; absorbance was read at 490 nm using a 96-multiwell microplate reader. All assays were done in triplicate.

**In vivo treatment with the AdOSM.** Replication-deficient adenovirus encoding mouse OSM has been described previously (29) and was produced, together with adenovirus encoding green fluorescent protein (AdGFP), in the vector facility of the INSERM U649 Laboratory. Seven-week-old male Sprague-Dawley rats (IFFA-CREDO) were injected *i.v.* in the portal vein or *i.m.* in the tibial anterior muscle with increasing doses of adenovirus as described (30). Animals were weighted twice a week until they showed signs of morbidity, at which point they were sacrificed by cervical dislocation. All experiments with adenoviruses were approved by the French Ministry of Research and were done in accordance with the institutional guidelines of the French Ethical Committee and under the supervision of authorized investigators.

**Rat osteosarcoma model.** This model has been described in detail previously (31). Briefly, 5-week-old male Sprague-Dawley rats were implanted at the right tibia with a 10 mm<sup>3</sup> osteosarcoma fragment. Two weeks later, rats bearing tumors with a volume >1,000 mm<sup>3</sup>, which were considered as progressive tumors, were injected in the left tibial anterior muscle with the AdOSM or AdGFP. PKC412 was administered as a microemulsion at 30 mg/kg/d *p.o.*, 6 days per week, starting 1 day after adenovirus injection. Control gavages were done with a placebo microemulsion. Tumor volumes were determined from caliper measurements of tumor diameters according to the formula: 0.5  $\times$  L  $\times$  S<sup>2</sup>, where L and S are the largest and smallest perpendicular tumor

diameters, respectively. Lung tumor dissemination was assessed at necropsy. The cumulative rate of overall survival (event-free survival) was calculated according to actuarial method and the endpoint considered was either death of animals or signs of morbidity, which included cachexia, respiratory distress, and/or animals bearing too bulky tumors (tumor volume >10,000 mm<sup>3</sup>).

**OSM reverse transcription-PCR.** At necropsy, the muscle and liver tissues were collected, used for total RNA extraction, and subjected to cDNA synthesis as described previously (15). For the PCR, the primers used were 18S sense 5'-TCAAGAACGAAAGTCGGAGGTTTCG-3', 18S antisense 5'-TTATTGCTCAATCTCGGGTGGCTG-3', OSM sense 5'-ATATGCGGCCGCGCTGGCTGCTCCAAC-3', and OSM antisense 5'-GACATAGAATTCTATCTCCGGCTGGCTGTGGAGCC-3'. The thermal cycle profile was as follows: denaturation for 15 s at 95°C, annealing for 30 s at 60°C, and extension for 30 s at 72°C. For 18S and OSM, 23 and 40 cycles were done, respectively. PCR products were size fractionated on a 1% ethidium bromide/agarose gel and visualized under UV transillumination.

**Serum bone markers.** Blood was drawn intermittently from the retro-orbital vein to monitor various serum bone variables. Alkaline phosphatase activity was assayed using *p*-nitrophenyl phosphate as a substrate (Biomérieux). Osteocalcin levels were estimated using the Rat-MID Osteocalcin ELISA (Nordic Bioscience Diagnostics). COOH-terminal telopeptides of type I collagen were quantified using the RatLaps ELISA (Nordic Bioscience Diagnostics). Osteoclast-derived tartrate-resistant acid phosphatase form 5b was measured using the RatTRAP Assay (SBA Sciences).

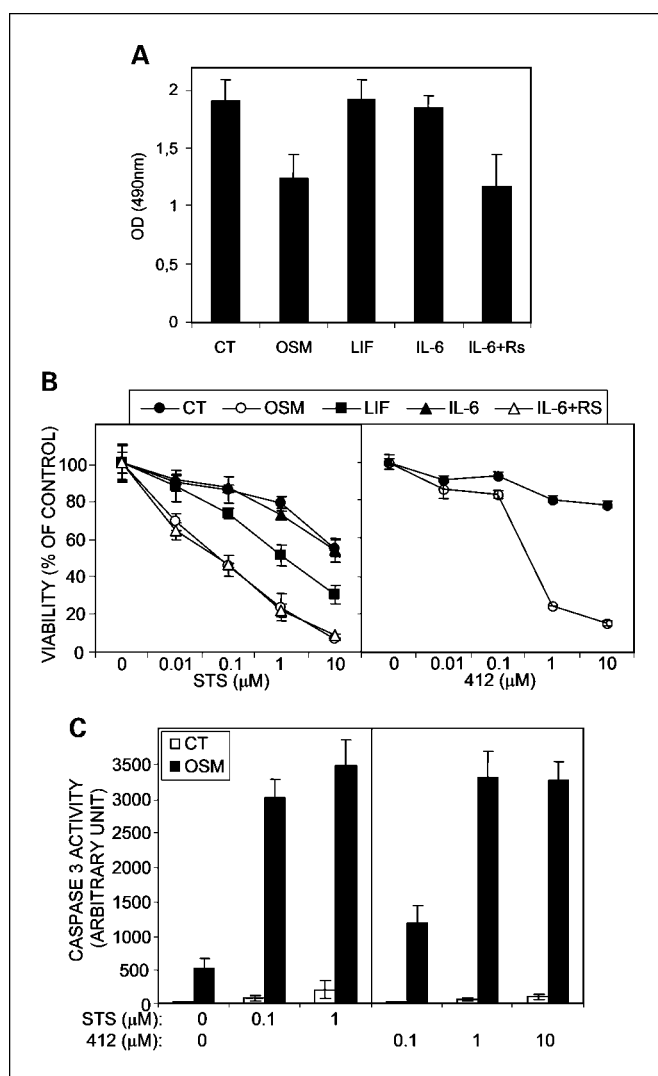
**Microscanner and radiologic analyses.** At necropsy, the right tibia was fixed in 10% buffered formaldehyde and dissected to discard soft tissues, comprising the major part of the tumor if present. Analysis of architectural variables was done using the high-resolution X-ray micro-computed tomography (micro-CT) system for small animal imaging SkyScan-1072 (SkyScan). Relative volume (BV/TV) of the tibia (cortical or trabecular bone) was quantified in the groups that received AdOSM compared with that of control rats. Other trabecular variables (number, thickness, and space) were similarly obtained using the SkyScan CtAn software. Radiographs on anesthetized animals (Nesdonal, 50 mg/kg) or on dissected tibias were taken with a mammography PLANMED Sophie apparatus (SN RAH 40710).

**Histologic analysis.** Right tibia were fixed in 10% buffered formaldehyde and decalcified by electrolysis, and after embedding in paraffin, 5- $\mu$ m-thick sections were mounted on glass slides. Transversal sections obtained from the tibia area were stained with H&E-safran. Sections obtained from the tumor tissues were stained with Masson trichrome. Analysis and quantification of necrotic and fibrotic areas was done using a Leica Q500 image analysis system.

**Statistics.** Statistical significance between the various animal groups was evaluated using the unpaired Mann-Whitney test. The differences of actuarial survival were determined by the  $K^2$  test. Results with  $P < 0.05$  were considered significant.

## Results

**OSM sensitizes rat OSRGA cells to apoptosis induced by Midostaurin in vitro.** We recently described that OSM inhibits proliferation and sensitizes rat OSRGA osteosarcoma cells to apoptosis driven by various death inducers such as STS, UV, or tumor necrosis factor- $\alpha$  (15, 17). As shown in Fig. 1A, 3-day treatment with OSM (100 ng/mL) or IL-6 in combination with IL-6Rs significantly reduced the number of viable cells, whereas LIF or IL-6 alone had no effect. Because there was no induction of cell death with these cytokines (Fig. 1C; data not shown), it could be assumed that these reductions were largely due to an inhibition of cell proliferation by OSM or IL-6 + IL-6Rs as described previously (15, 17).



**Fig. 1.** OSM induces apoptosis in association with PKC412 on OSRGA cells *in vitro*. OSRGA cells were pretreated as indicated with OSM, LIF, and IL-6 alone or in combination with IL-6Rs (100 ng/mL each) for 3 d and increasing concentrations of STS or PKC412 (412) were added. **A**, effect of the cytokines alone (no STS or PKC412) on cell viability as assessed by a XTT assay. **B**, STS or PKC412 were added overnight and cell viability was assessed by a XTT assay. Results are expressed relative to control cultures without STS or PKC412. **C**, STS or PKC412 were added for 5 h and caspase-3 activity was determined on cell lysates by a fluorometric assay. Columns, mean; bars, SD. Similar results were observed in three independent experiments.

Whereas OSRGA cells were largely resistant to STS, pretreatment for 3 days with OSM sensitized them to cell death induced by low doses of STS ( $IC_{50} = 0.1 \mu\text{mol/L}$ ; Fig. 1B). The reduced number of viable cells was indeed related to cell death because it was associated with membrane blebbing and nuclear condensation (see below). Dose-response experiments indicated that 10 ng/mL OSM were necessary to observe a maximum effect on cell death (data not shown). In contrast, pretreatment with IL-6 did not sensitize to cell death, whereas LIF pretreatment induced only a slight increase of death (Fig. 1B). IL-6 plus IL-6Rs sensitized OSRGA cells to cell death induced by STS to the same level as observed with OSM. Altogether, these results indicated that, within the IL-6 family of cytokines, OSM was a major inducer of OSRGA cell death and that these cells

were not responsive to IL-6 presumably because they did not express the IL-6R at the cell surface, thus needing IL-6Rs to increase cell death.

Because STS is highly toxic *in vivo*, we then asked whether OSM would similarly synergize with Midostaurin, a well-tolerated STS-related drug (27, 28). As shown in Fig. 1B (right), OSRGA cells were resistant to PKC412, but pretreatment with OSM sensitized them to cell death induced by PKC412 ( $IC_{50} = 1 \mu\text{mol/L}$ ). Decreased viability induced by OSM + PKC412 was associated with membrane blebbing and nuclear condensation (data not shown) as described previously with OSM + STS, suggesting an induced apoptosis. Indeed, both OSM + STS and OSM + PKC412 induced caspase-3 activity in OSRGA cells, but again we noticed that a 10-fold excess of PKC412 was needed to reach the level obtained with STS (Fig. 1C).

Polychemotherapy of osteosarcoma relies on methotrexate, ifosfamide, doxorubicin, and cisplatin regimens, some of these drugs being well-known to induce apoptosis in cancer cells through the mitochondrial apoptotic pathway (4, 32, 33). OSM also sensitized OSRGA cells to cell death induced by doxorubicin or cisplatin as revealed by the enhanced caspase-3 activity (Supplementary Fig. S1A and B). In contrast, we could not observe cell death when combining OSM with methotrexate or mafosfamide, the active compound of ifosfamide (ref. 34; Supplementary Fig. S1C and D).

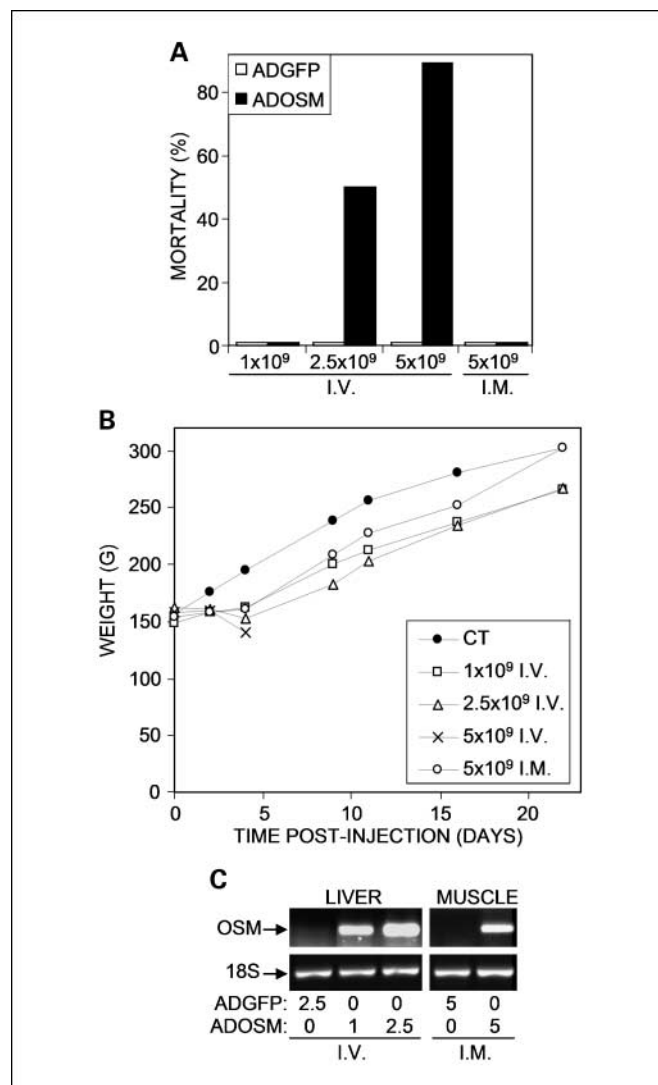
**OSM enhances motility and reduces adhesion of OSRGA cells *in vitro*.** The role of OSM on cancer metastasis is controversial. This cytokine could enhance the metastatic capacity of breast cancer cells (35) but reduces migration and invasion of lung cancer cells (21). As shown in Supplementary Fig. S2, OSM enhances motility of OSRGA osteosarcoma cells. In addition, OSM reduces adhesion to several matrix proteins such as vitronectin (Supplementary Fig. S3A), fibronectin, or collagen I (data not shown). A similar inhibitory effect of OSM was observed on reconstructed basement membrane gel (Matrigel-coated plates; Supplementary Fig. S3B). These results suggest that OSM could have a significant effect to enhance the metastatic potential of OSRGA cells.

**High doses of OSM are toxic in rats.** To assess the effect of OSM *in vivo*, injections of an adenovirus encoding OSM (AdOSM) were administered i.v. or i.m. (tibial anterior muscle) to male Sprague-Dawley rats. The AdOSM appeared to be highly and dose-dependently toxic when delivered i.v., with  $5 \times 10^9$  plaque-forming units (pfu) AdOSM inducing 90% of mortality within 7 days (Fig. 2A). Animals receiving the AdOSM i.v. rapidly lost weight (for the highest doses) or had a severely reduced gain of weight (for the lowest doses; Fig. 2B). In fact, during the first week postinjection of the high doses of AdOSM, rats harbored flu-like symptoms, with conjunctivitis and generalized inflammation (data not shown). These symptoms were never observed with the control virus encoding GFP (Fig. 2A and B). Similar amount of AdOSM injected i.m. were well tolerated, with no mortality observed (Fig. 2A), only transient and reversible weight loss (Fig. 2B), and only local inflammation at the site of virus injection (data not shown).

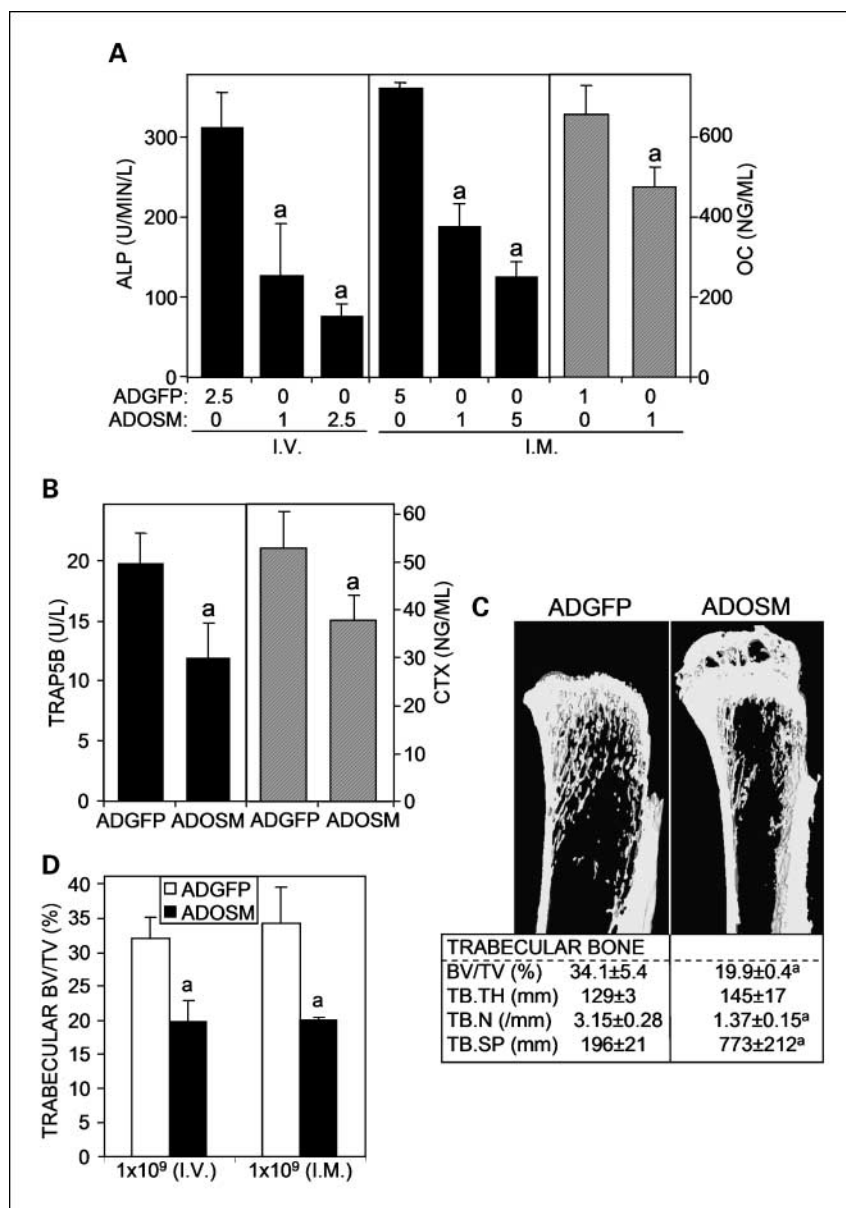
In the absence of specific ELISA for mouse OSM, the mRNA level of this cytokine was then analyzed by reverse transcription-PCR on various tissue samples (Fig. 2C). OSM transcripts were found expressed only in the liver after i.v. injections and only in the tibial anterior muscle after injection in this tissue. Moreover, mRNA expression levels were higher in the liver than

in muscles, suggesting that the reduced toxicity observed after the i.m. injections is related, likely in part, to reduced circulating levels of OSM. Whatever the reasons, further experiments especially in the rat osteosarcoma model (see below) were done with i.m. injections of AdOSM.

**AdOSM induces trabecular bone loss.** Seven days after AdOSM injections, the serum levels of various bone markers were analyzed (Fig. 3A and B). Serum alkaline phosphatase levels were dose-dependently reduced by OSM whether the AdOSM was injected i.v. or i.m. (Fig. 3A). Similarly, serum osteocalcin levels were reduced by OSM (Fig. 3A), suggesting a reduced osteoblast activity. Both serum tartrate-resistant acid phosphatase form 5b and COOH-terminal telopeptide of type I collagen levels, markers of mature osteoclasts and bone resorption, respectively, were also reduced in rats injected with the AdOSM (Fig. 3B).



**Fig. 2.** Toxicity of the AdOSM in naive rats. Rats were injected in the portal vein (i.v.) or in the tibial anterior muscle (i.m.) with the indicated dose (in pfu) of AdOSM or AdGFP. **A**, mortality at day 7 postinjection (6-10 animals per group corresponding to three different experiments). **B**, evolution of weight (4 animals per group). **CT**, control group of animals injected with  $5 \times 10^9$  pfu AdGFP i.v. **C**, 7 d postinjection, animals were sacrificed and liver and tibial anterior muscle tissues were analyzed by reverse transcription-PCR with primers specific for the indicated cDNA.



**Fig. 3.** AdOSM reduces serum bone markers expression and induces trabecular bone loss. *A*, rats were injected i.v. or i.m. with AdOSM or AdGFP at the indicated dose ( $\times 10^9$  pfu). Seven days later, sera were collected and analyzed for alkaline phosphatase activity (ALP; filled columns) or osteocalcin level (OC; hatched columns;  $n = 8$ , except for the group AdOSM at  $2.5 \times 10^9$  pfu in which  $n = 4$  because of the mortality). *B*, rats were injected i.m. with  $1 \times 10^9$  pfu adenoviruses. Seven days later, they were analyzed for serum tartrate-resistant acid phosphatase form 5b (TRAP5B; filled columns) or COOH-terminal telopeptide of type I collagen (CTX; hatched columns;  $n = 8$  in each group). *C*, rats were injected i.m. with  $1 \times 10^9$  pfu AdOSM or AdGFP. *D*, rats received the adenoviruses either i.v. or i.m. as indicated. Seven days later, bone variables of the tibiae were analyzed by micro-CT scan. *C*, top, sagittal sections; bottom, relative trabecular bone variables calculated from three-dimensional image registration data. BV/TV, relative trabecular bone volume; TB.TH, trabecular thickness; TB.N, trabecular number; TB.SP, trabecular space. *D*, relative trabecular bone volume ( $n = 3$  in each group). Columns, mean; bars, SD. a,  $P < 0.05$ , compared with the control AdGFP group.

At the tibia level, micro-CT scanner analysis revealed that OSM does not modify the cortical bone volume (data not shown) but significantly reduces the trabecular bone volume (Fig. 3C). Trabecular number was significantly reduced by OSM, whereas the trabecular space increased. Trabecular thickness was not significantly altered (Fig. 3C). These results were observed in the tibia near the injection site or in the contralateral tibia or after i.v. injection (Fig. 3D; data not shown), indicating a systemic effect of OSM on bone remodeling.

**Combination of AdOSM with Midostaurin limits osteosarcoma progression and enhances survival.** A rat osteosarcoma model was then used corresponding to the OSRGA cell line. Tumor fragments were transplanted in close contact to the tibiae surface and AdOSM was injected i.m. in the contralateral tibial anterior muscle. OSM was unable to modify the development of the primary bone tumor or the metastatic pulmonary

dissemination (Fig. 4A–C). However, because *in vitro* pretreatment with OSM sensitizes OSRGA cells to apoptosis induced by Midostaurin (PKC412; Fig. 1), the potent antitumor effect of this combination was analyzed in our rat osteosarcoma model. Preliminary experiments indicated that oral administrations of PKC412 up to 30 mg/kg/d were not toxic and did not exert any effect on tumor development (Fig. 4A–C; data not shown). However, when associated with the AdOSM, PKC412 reduced tumor progression. In a first set of experiments, primary bone tumor volumes were reduced 2.5-fold by OSM + PKC412 32 days after tumor implantation (18 days after AdOSM injection; Fig. 4A). These results were confirmed in subsequent experiments with, on average, a relative tumor volume reduced by 2-fold ( $P = 0.01$ ; Fig. 4B). At the time of sacrifice, we also noticed a 2-fold reduction in the incidence of lung metastasis for the animals treated with AdOSM and PKC412 (27% versus 50% for the control group; Fig. 4C). As a result of the decreased tumor

burden, the overall survival was significantly increased after treatment with OSM + PKC412 (Fig. 4D). In the groups treated with AdOSM or PKC412 alone, primary tumor progression (Fig. 4A and B), metastatic pulmonary incidence (Fig. 4C), or overall survival (Fig. 4D) was not modified.

**AdOSM alters the ectopic bone neoformation in the rat osteosarcoma model.** To better describe the modifications induced by OSM and potentially related to the sensitization to PKC412, we next analyzed the effect of OSM overexpression on cancer-induced bone remodeling and on cells implicated in this process. In this animal model, development of the tumor is known to induce osteolysis as well as an important ectopic bone formation at the tibia surface (Fig. 5A and B; ref. 31). This extensive bone remodeling induced by osteosarcoma cells is thought to participate to tumor development and is related to activation of both periosteal osteoblasts and osteoclasts, which appeared numerous in this ectopic bone area (Fig. 5B). Radiography and micro-CT scanner analysis revealed that this periosteal bone apposition has a well-organized and localized, sunshine appearance (Fig. 5A and C, arrows), characteristic of osteosarcoma-associated bone lesions. The AdOSM alone altered this ectopic bone formation, which appeared more anarchic, dispersed all over the tibia, and did not adopt a radiant structure anymore (Fig. 5C, arrows), indicating alterations in bone remodeling by OSM. However, histology in these ectopic bone areas did not reveal important modifications induced by AdOSM on the osteoblastic/osteocytic, osteoclastic, or tumoral contingents (data not shown).

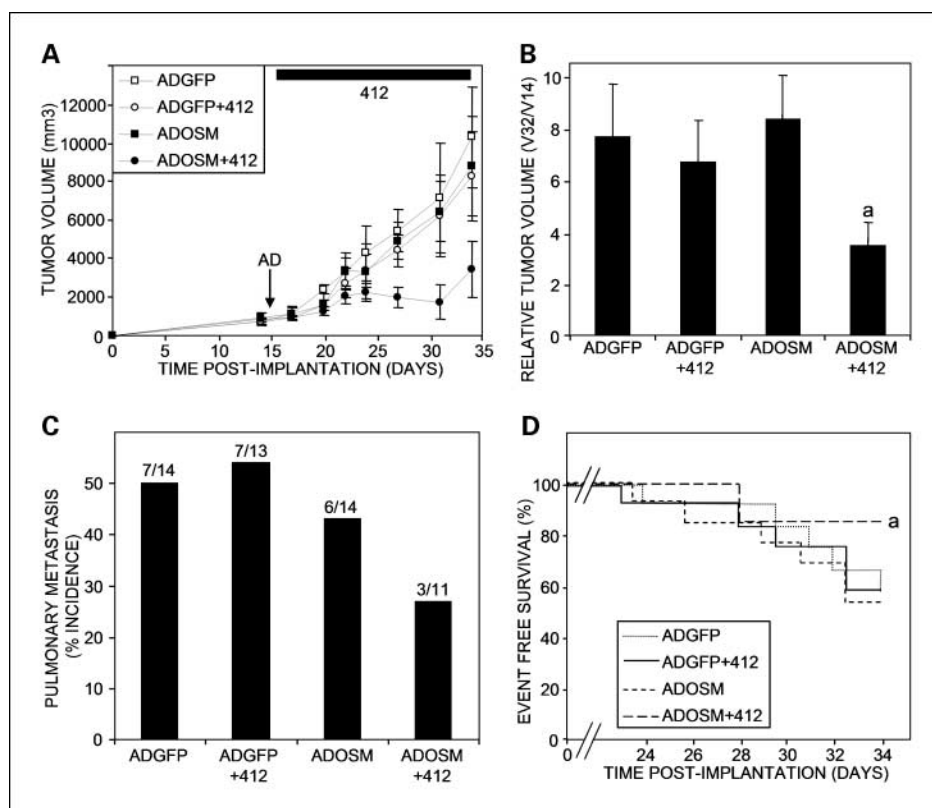
**AdOSM + PKC412 induces necrosis and fibrosis in the tumor tissues.** Histologic analyses in the tumor tissues showed that the decreased primary tumor volume in the group of animals

treated with OSM + PKC412 was associated with an increased tumor necrosis, especially at the cutaneous surface of the tumors (Fig. 6D, asterisks) compared with other groups (Fig. 6A–C). Quantification of the necrosis areas indicated a 3-fold increase in the OSM + PKC412 group (from 13%, 20%, and 18% of necrosis in the AdGFP, AdGFP + PKC412, and AdOSM groups, respectively, to 60% in the AdOSM + PKC412 group). Moreover, the collagen Masson trichrome staining revealed an important fibrotic component in the tumors treated with OSM + PKC412, with striking figures of fibrosis surrounding tumor nodules (arrows in Fig. 6D, inset). Fibrosis was also observed inside the tumor nodules as well as in necrotic areas, suggesting an induced tissue repair in comparison with the control, OSM, or PKC412 groups (Fig. 6A–D). With the association OSM + PKC412, we also observed an induced lymphocytic and polynuclear reaction in these superficial necrotic and fibrotic regions (data not shown). At the time point of these analyses (34 days postimplantation), there was no obvious modification in either the mitotic index or the percentage of apoptosis (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling staining; data not shown).

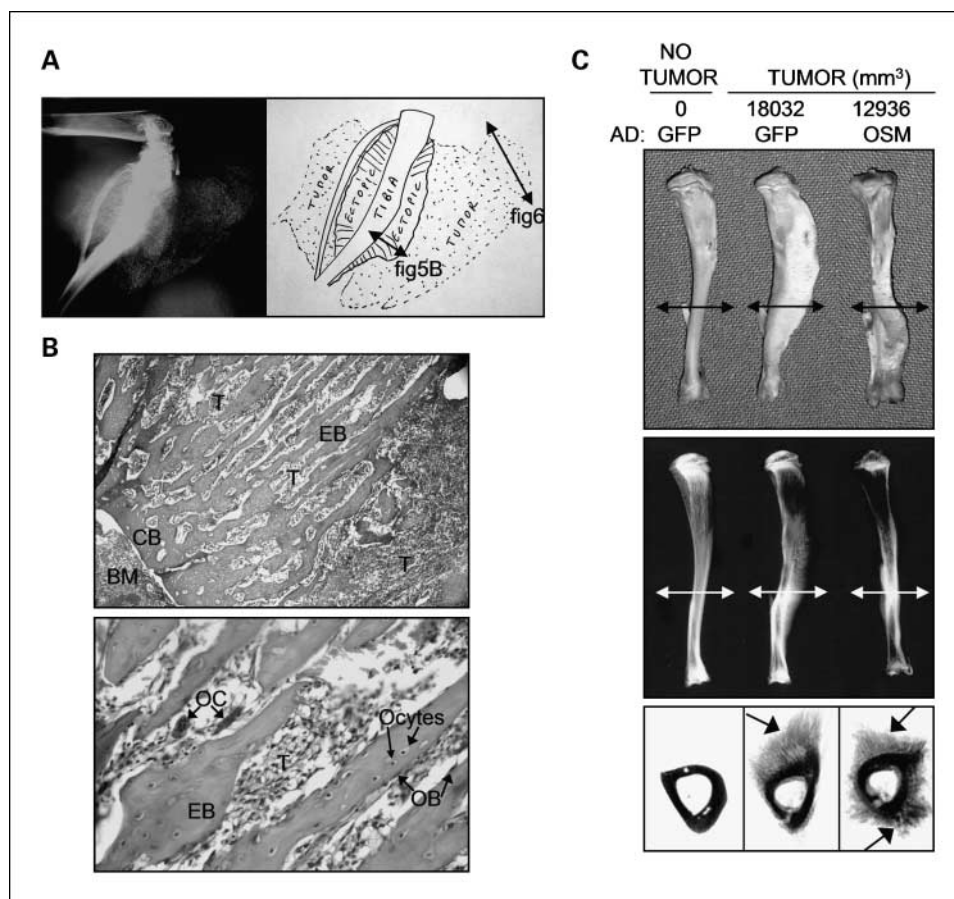
## Discussion

*In vitro*, OSM is known to induce differentiation, to inhibit proliferation, and/or to enhance apoptosis of various cancer cell lines (derived from melanomas or osteosarcomas for example), suggesting a therapeutic application for this cytokine. Within the IL-6 family of cytokines, OSM has been shown to possess the strongest anticancer effects, for example, on

**Fig. 4.** Association AdOSM + PKC412 limits osteosarcoma progression. Osteosarcoma fragments were implanted in contact to the right tibia of rats. Two weeks postimplantation, indicated adenoviruses ( $1 \times 10^9$  pfu) were injected in the left tibial anterior muscle. One day later, PKC412 (30 mg/kg/d, 6 d per week) or vehicle was given orally until the sacrifice of the animals (34 d postimplantation). **A**, time course of the mean tumor volume from a representative experiment ( $n = 5$  or 6 in each group). **B**, relative tumor volume between days 14 and 32 ( $V_{32}/V_{14}$ ) for three independent experiments ( $n = 13$  or 14 in each group). Columns, mean; bars, SE. a,  $P = 0.01$ , between AdOSM and AdOSM + PKC 412 group. **C**, incidence of lung metastasis at day 34 postimplantation. The number of animals with pulmonary metastasis in each group in also indicated. **D**, event-free survival rate in the same groups of animals (13 rats per group). a,  $P < 0.05$ , between AdOSM and AdOSM + PKC 412 group.







**Fig. 5.** AdOSM alters the ectopic bone formed at the surface of osteosarcoma-implanted tibia. Rats were implanted with tumor fragments (no tumor: sham-operated animals) and injected with adenoviruses as described in Fig. 4. Five weeks postimplantation, animals were anesthetized (A) or sacrificed (B and C). A, radiography of the right tibia of a rat injected with control AdGFP viruses. The drawing depicts the tibia, the ectopic bone harboring a sunshine appearance, and the tumor, which is also mineralized. The relative position of the sections used for histology in B and Fig. 6 are indicated. B, H&E-safran staining was done on a transversal section of the tibia. Top, bone marrow (BM), cortical bone (CB), ectopic bone (EB), and the various tumor areas (T). Original magnification,  $\times 40$ . Bottom, osteoclasts (OC), osteoblasts (OB), osteocytes (Ocytes), tumor cells, and the ectopic bone. Original magnification,  $\times 200$ . C, right tibia were dissected to remove any soft tissues (especially the tumors), photographed (top), and analyzed by radiography (middle) and by micro-CT scan (bottom; transversal sections are shown). Note the presence of ectopic bone at the surface of the tibia. The relative position of the sections shown in the micro-CT scan analysis is indicated.

proliferation (16) or apoptosis (Fig. 1A), followed by IL-6 but only in combination with its soluble receptor. This process, termed IL-6 trans-signaling, allows cells that do not express the IL-6R to respond to this cytokine (6–8). In bone, IL-6Rs are required for IL-6 effects on osteoblasts (6–8) and both IL-6 and IL-6Rs are required to lower the rate of melanoma growth in mice (36). Similarly, recombinant OSM reduces melanoma progression in mice, especially lung metastasis (14), but there are no data concerning its potent role on cancer progression in the bone environment. IL-6-type cytokines such as OSM have been shown to induce bone resorption in various experimental settings (12, 13, 37) and to participate in osteolysis associated with cancer development in bones (22–24). Bone degradation then allows the release of growth factors, further enhancing tumor proliferation in bones (25, 26). Here, we show that OSM alone is not sufficient to limit osteosarcoma proliferation in the bone environment, but that in combination with Midostaurin it significantly reduced primary bone tumor development and metastasis to lungs and enhances overall survival. Thus, we show for the first time that OSM could be considered as an adjuvant treatment for bone tumors such as osteosarcoma. Whether IL-6, especially in combination with its soluble receptor, would have similar effects on bone cancer is currently under investigation.

The osteosarcoma model presented here is in rodents; to the best of our knowledge, murine OSM used in this study does not bind to the LIF receptor (gp130 + LIFR $\alpha$ ) in contrast to human OSM (38). Therefore, the effects of murine OSM are expected to be mediated exclusively through its specific receptor (gp130 +

OSMR $\beta$ ); indeed, we observed that OSRGA cells express gp130 and OSMR $\beta$  mRNA as well as LIFR $\alpha$  mRNA.<sup>5</sup> Because LIF mildly but significantly sensitized OSRGA cells to apoptosis (Fig. 1B), we can assume that the receptor for LIF (gp130 + LIFR $\alpha$ ) also sensitizes OSRGA cells to apoptosis and thus could also synergize with Midostaurin *in vivo* but to a lower extent than the receptor for OSM.

That OSM alone has no anticancer effect in the osteosarcoma model presented here is surprising because this cytokine readily inhibits proliferation and induces expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21<sup>WAF1</sup> in OSRGA cells *in vitro* (Fig. 1A; ref. 15). However, we noticed previously that the growth-inhibitory effect of OSM on these cells is only observed in serum-free or low-serum conditions (15), suggesting that serum growth factors could prevent the inhibitory effect of OSM *in vitro* and also *in vivo*. OSM similarly inhibits the growth of osteosarcoma cell lines, such as ROS17/2.8, MG63, or SaOS2 cells, by blocking the cells in the G<sub>1</sub> phase of the cell cycle, but these effects are not prevented by serum (15–17, 39). Therefore, other animal models are needed to confirm the hypothesis that OSM alone could also prevent osteosarcoma progression *in vivo* by inhibition of cancer cell proliferation.

Based on previous studies, it was also possible that OSM alone or in combination with PKC412 alters metastasis of cancer cells. Indeed, we observed that OSM enhances motility

<sup>5</sup> B. Brounais, C. Chipoy, and F. Blanchard, unpublished data.

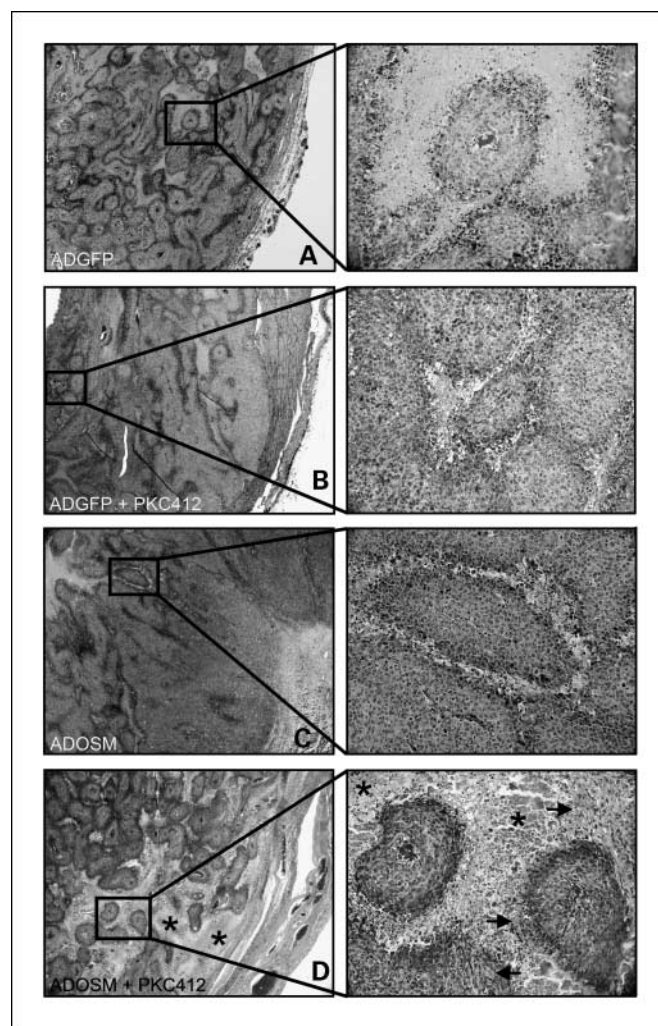
of OSRGA cells and reduces adhesion to several matrix components such as vitronectin, fibronectin, or collagen I, suggesting an enhanced metastatic potential as described previously for breast carcinoma cells (35). Similarly, the reduced cell binding to basement membrane (Matrigel) could limit adherence or readherence in a particular environment, thus promoting migration to a secondary growth site. However, OSM does not modify expression of matrix metalloproteinases potentially implicated in metastasis but induces expression of TIMP1, an inhibitor of several matrix metalloproteinases.<sup>5</sup> Similarly, systemic OSM enhances TIMP1 expression in the lungs of mice (29) and reduces pulmonary melanoma metastasis (21), suggesting that OSM could indeed limit osteosarcoma metastasis to the lung. In the rat osteosarcoma model presented here, systemic OSM alone does not modify the metastatic potential, but in combination with Midostaurin it significantly reduces lung metastasis.

Previous studies indicated that OSM exerts a dual effect on osteoblast differentiation, stimulating the first stages of osteoblastogenesis or inducing terminal differentiation into osteocytes depending on the differentiation stage of the cells used (14, 15). In addition, OSM has been shown to induce RANKL expression by osteoblastic or stromal cells, thus supporting osteoclastogenesis and bone resorption (12, 13, 39). However, other studies revealed a potent inhibitory effect of IL-6-type cytokines on osteoclast formation and bone resorption (9, 40). Recently, Sims et al. observed that OSM receptor-deficient mice have both a reduced bone formation by osteoblasts and a significantly reduced bone resorption by osteoclasts (41), indicating that OSM, or other cytokines using the OSM receptor such as interleukin-31 (42), have an important role in maintaining normal levels of bone remodeling. Here, we observe that systemic OSM overexpression reduces serum osteoblastic and osteoclastic markers as well as the trabecular bone volume in naive rats. We cannot exclude the possibility that OSM first stimulated osteoclastogenesis and bone resorption (within few days) and later inhibited these variables (within 1 week), but our results clearly indicate that OSM inhibits osteoblast activity *in vitro* (15) and *in vivo* (this study). Bone loss induced by OSM could thus be related in part to reduce bone formation by osteoblasts. Moreover, considering that osteoblasts are necessary to support osteoclast formation, it is possible that the reduced osteoblastic activity induced by OSM indirectly also reduced osteoclast activity. In contrast to the net inhibitory effect of OSM overexpression, it seems that physiologic levels of endogenous OSM regulate maintenance of bone remodeling, because OSM receptor deficient mice have decreased bone formation and resorption (41).

Similarly, OSM alters the ectopic bone formed at the tibia surface and at the contact of osteosarcomas, bone neoformation being more anarchic and dispersed all around the tibia. These alterations did not appear to depend on induced bone resorption as (a) there was no modification in the number of osteoclasts in the ectopic bone areas and (b) alterations were still observed in the presence of zoledronate, a powerful inhibitor of osteoclast-mediated osteolysis.<sup>5</sup> Moreover, because OSM overexpression alone did not modify osteosarcoma progression in our model, we can conclude that the potent osteolytic effect of this cytokine, which was not observed in this study, was in any case not sufficient to stimulate the vicious

cycle between bone resorption and tumor proliferation. Whether the alteration in ectopic bone induced by OSM is linked to an induced terminal differentiation of osteoblasts/osteosarcoma cells into osteocytic cells deserves additional experiments, but they are clearly associated with sensitization of the tumor cells to the anticancer agent Midostaurin (see below). Altogether, these results indicate that overexpression of OSM alone *in vivo* alters bone formation in physiologic or cancer-associated situations but with no significant effect on cancer progression.

The mechanism by which OSM plus Midostaurin (PKC412) reduces osteosarcoma progression in rats seems to rely on a direct induction of apoptosis in cancer cells. Indeed, we observed an induced necrosis with the combination of OSM with PKC412 *in vivo* as well as a higher proportion of fibrotic tissue and immune cell infiltration. There was no modification in terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick



**Fig. 6.** Combination AdOSM + PKC412 induces necrosis and fibrosis in osteosarcoma tumor tissue. Rats were implanted with tumor fragments and treated with adenoviruses and PKC412 as described in Fig. 4. Masson trichrome staining was done on the tumor tissue (see Fig. 4A) near the cutaneous surface at the time of sacrifice (34 d postimplantation). A, AdGFP + placebo animal group ( $n = 2$ ). B, AdGFP + PKC412 animal group ( $n = 2$ ). C, AdOSM + placebo animal group ( $n = 2$ ). D, AdOSM + PKC412 animal group ( $n = 3$ ). The combination AdOSM + PKC412 induced both necrosis (asterisk, clear areas) and fibrosis (arrows, green areas). Representative section is shown for each group. Original magnification,  $\times 20$  (left) or  $\times 120$  (insets, right).

end labeling staining (apoptosis) presumably because our histologic analyses were done at the endpoint of the experiments (34 days postimplantation) when the expression of OSM is largely reduced (as described previously; ref. 29). However, the necrosis (or late apoptosis) observed at that time point *in vivo* together with the apoptosis observed *in vitro* strongly suggests that the combination of OSM with PKC412 induces apoptosis and then necrosis in these osteosarcoma cells *in vivo*. Previous studies have also reported an induced fibrosis (through extracellular matrix production and fibroblast proliferation) and recruitment of immune cells (through chemokine production) by OSM in the lungs (27, 43, 44) and/or joints of mice (11–13) that could explain part of the proinflammatory and repair reactions observed in our cancer model.

As described previously *in vitro* (17), it is therefore possible that OSM *in vivo*, through the activation of p53 and STAT5, increases the expression of Bax and reduces the expression of Bcl2, thus sensitizing the mitochondria to suboptimal doses of death inducers in osteosarcoma cells. When PKC412 is given to rats, Bax is translocated from the cytosol to the mitochondria in cancer cells, activating the mitochondrial apoptotic pathway. However, OSM also induces activation of various survival kinases such as protein kinase C $\delta$ , Akt, and extracellular signal-regulated kinase 1/2, and we described previously that STS inhibits their activation by OSM (17). Therefore, an additional mode of apoptosis induction by STS or its derivative Midostaurin (PKC412) could be mediated through inhibition of survival kinases. In line with these data, PKC412 alone is highly active on tumors such as leukemia with FLT3 receptor mutations by directly inhibiting this tyrosine kinase (45). In

contrast, several fibrosarcoma and adenosarcoma and the OSRGA osteosarcoma appear resistant to PKC412 both *in vitro* and *in vivo* (17, 46). In these cells, however, combination of PKC412 and other anticancer treatments such as irradiation or OSM proves to be particularly active to induce, in a p53-dependent manner, the mitochondrial apoptotic pathway and destruction of cancer cells *in vivo* (17, 46).

Collectively, our results suggest that an adjuvant treatment with OSM could sensitize osteosarcoma cells to apoptosis/necrosis induced by Midostaurin. Therefore, there may be other new, still unknown cancer indications for this kinase inhibitor and further investigations are needed to adequately describe the list of cancer cells sensitive to this new bi-therapy. Because OSM can alter several steps in the complex process of metastasis, a careful examination of its potent unwanted effects in adequate cancer models is necessary. In addition, polychemotherapy of osteosarcoma actually comprise methotrexate, ifosfamide, doxorubicin, and cisplatin regimens (4), and OSM sensitizes OSRGA osteosarcoma cells to cell death induced by two of these drugs, doxorubicin and cisplatin. Similar to STS or Midostaurin, doxorubicin and cisplatin are known to induce cell death in osteosarcoma through p53 and the mitochondrial pathway (32, 33). Therefore, an adjuvant treatment with OSM could synergize with conventional chemotherapy or will be able to sensitize resistant tumors, such as advanced metastatic osteosarcomas, offering new lines of therapeutic interventions.

#### Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

#### References

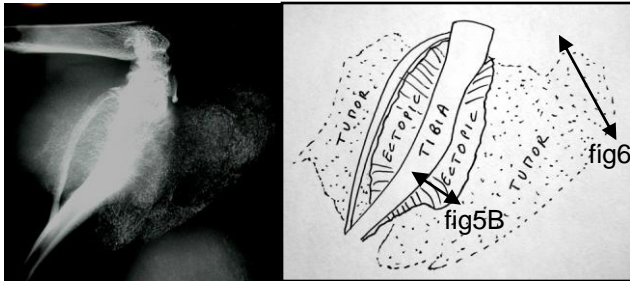
- Fuchs B, Pritchard DJ. Etiology of osteosarcoma. *Clin Orthop Relat Res* 2002;397:40–52.
- Lopez-Guerrero JA, Lopez-Gines C, Pellin A, Carda C, Lombart-Bosch A. Deregulation of the G<sub>1</sub> to S-phase cell cycle checkpoint is involved in the pathogenesis of human osteosarcoma. *Diagn Mol Pathol* 2004;13:81–91.
- Provisor AJ, Ettinger LJ, Nachman JB, et al. Treatment of nonmetastatic osteosarcoma of the extremity with preoperative and postoperative chemotherapy: a report from the Children's Cancer Group. *J Clin Oncol* 1997;15:76–84.
- Lamoureux F, Trichet V, Chipoy C, Blanchard F, Gouin F, Redini F. Recent advances in the management of osteosarcoma and forthcoming therapeutic strategies. *Expert Rev Anticancer Ther* 2007;7:169–81.
- Heymann D, Rousselle AV. gp130 cytokine family and bone cells. *Cytokine* 2000;12:1455–68.
- Liu XH, Kirschenbaum A, Yao S, Levine AC. The role of the interleukin-6/gp130 signaling pathway in bone metabolism. *Vitam Horm* 2006;74:341–55.
- Wong PK, Campbell IK, Egan PJ, Ernst M, Wicks IP. The role of the interleukin-6 family of cytokines in inflammatory arthritis and bone turnover. *Arthritis Rheum* 2003;48:1177–89.
- Franchimont N, Wertz S, Malais, M. Interleukin-6: an osteotropic factor influencing bone formation? *Bone* 2005;37:601–6.
- Kitamura H, Kawata H, Takahashi F, Higuchi Y, Furuichi T, Ohkawa H. Bone marrow neutrophilia and suppressed bone turnover in human interleukin-6 transgenic mice. A cellular relationship among hematopoietic cells, osteoblasts, and osteoclasts mediated by stromal cells in bone marrow. *Am J Pathol* 1995;147:1682–92.
- De Benedetti F, Rucci N, Del Fattore A, et al. Impaired skeletal development in interleukin-6-transgenic mice: a model for the impact of chronic inflammation on the growing skeletal system. *Arthritis Rheum* 2006;54:3551–63.
- Richards CD. Matrix catabolism in arthritis: priming the guns with oncostatin M. *J Rheumatol* 2004;31:2326–8.
- Hui W, Cawston TE, Richards CD, Rowan AD. A model of inflammatory arthritis highlights a role for oncostatin M in pro-inflammatory cytokine-induced bone destruction via RANK/RANKL. *Arthritis Res Ther* 2005;7:R57–64.
- de Hooge AS, van de Loo FA, Bennink MB, et al. Adenoviral transfer of murine oncostatin M elicits periosteal bone apposition in knee joints of mice, despite synovial inflammation and up-regulated expression of interleukin-6 and receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand. *Am J Pathol* 2002;160:1733–43.
- Malaval L, Liu F, Vernallis AB, Aubin JE. GP130/OSMR is the only LIF/IL-6 family receptor complex to promote osteoblast differentiation of calvaria progenitors. *J Cell Physiol* 2005;204:585–93.
- Chipoy C, Berreur M, Couillaud S, et al. Downregulation of osteoblast markers and induction of the glial fibrillary acidic protein by oncostatin M in osteosarcoma cells require PKC $\delta$  and STAT3. *J Bone Miner Res* 2004;19:1850–61.
- Bellido T, O'Brien CA, Roberson PK, Manolagas SC. Transcriptional activation of the p21 (WAF1, CIP1, SDI1) gene by interleukin-6 type cytokines. A prerequisite for their pro-differentiating and anti-apoptotic effects on human osteoblastic cells. *J Biol Chem* 1998;273:21137–44.
- Chipoy C, Brounais B, Trichet V, et al. Sensitization of osteosarcoma cells to apoptosis by oncostatin M depends on STAT5 and p53. *Oncogene* 2007;26:6653–64.
- Sosman JA, Aronson FR, Sznol M, et al. Concurrent phase I trials of intravenous interleukin 6 in solid tumor patients: reversible dose-limiting neurological toxicity. *Clin Cancer Res* 1997;3:39–46.
- Ding C, Jones G. Technology evaluation: MRA, Chugai. *Curr Opin Mol Ther* 2003;5:64–9.
- Mule JJ, McIntosh JK, Jablons DM, Rosenberg SA. Antitumor activity of recombinant interleukin 6 in mice. *J Exp Med* 1990;171:629–36.
- Ouyang L, Shen LY, Li T, Liu J. Inhibition effect of oncostatin M on metastatic human lung cancer cells 95-D *in vitro* and on murine melanoma cells B16BL6 *in vivo*. *Biomed Res* 2006;27:197–202.
- Nagai Y, Yamato H, Akaogi K, et al. Role of interleukin-6 in uncoupling of bone *in vivo* in a human squamous carcinoma coproducing parathyroid hormone-related peptide and interleukin-6. *J Bone Miner Res* 1998;13:664–72.
- Morgan H, Tumber A, Hill PA. Breast cancer cells induce osteoclast formation by stimulating host IL-11 production and downregulating granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *Int J Cancer* 2004;109:653–60.
- Akatsu T, Ono K, Katayama Y, et al. The mouse mammary tumor cell line, MMT060562, produces prostaglandin E<sub>2</sub> and leukemia inhibitory factor and supports osteoclast formation *in vitro* via a stromal cell-dependent pathway. *J Bone Miner Res* 1998;13:400–8.
- Guise TA, Mohammad KS, Clines G, et al. Basic mechanisms responsible for osteolytic and



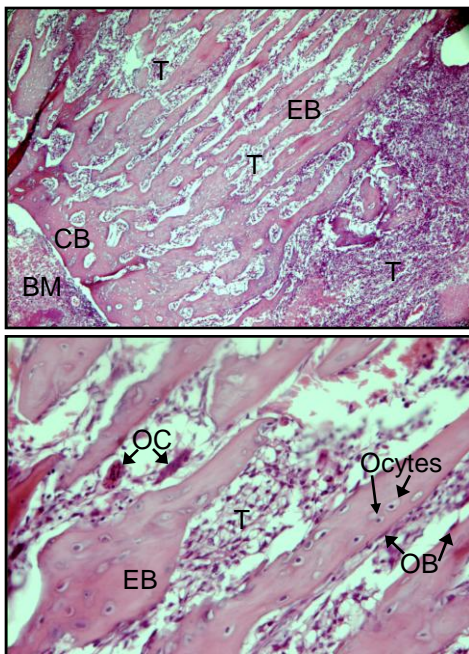
- osteoblastic bone metastases. *Clin Cancer Res* 2006;12:6213–6s.
26. Kwan Tat S, Padrines M, Theoleyre S, Heymann D, Fortun Y. IL-6, RANKL, TNF- $\alpha$ /IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;15:49–60.
  27. Fabbro D, Ruetz S, Bodis S, et al. PKC412—a protein kinase inhibitor with a broad therapeutic potential. *Anticancer Drug Des* 2000;15:17–28.
  28. Stone RM, DeAngelo DJ, Klimek V, et al. Patients with acute myeloid leukemia and an activating mutation in FLT3 respond to a small-molecule FLT3 tyrosine kinase inhibitor, PKC412. *Blood* 2005;105:54–60.
  29. Kerr C, Langdon C, Graham F, Gaudie J, Hara T, Richards CD. Adenovirus vector expressing mouse oncostatin M induces acute-phase proteins and TIMP-1 expression *in vivo* in mice. *J Interferon Cytokine Res* 1999;19:1195–205.
  30. Guillot C, Coathalem H, Chetritt J, et al. Lethal hepatitis after gene transfer of IL-4 in the liver is independent of immune responses and dependent on apoptosis of hepatocytes: a rodent model of IL-4-induced hepatitis. *J Immunol* 2001;166:5225–35.
  31. Heymann D, Ory B, Blanchard F, et al. Enhanced tumor regression and tissue repair when zoledronic acid is combined with ifosfamide in rat osteosarcoma. *Bone* 2005;37:74–86.
  32. Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 2003;22:7265–79.
  33. Ganjavi H, Gee M, Narendran A, et al. Adenovirus-mediated p53 gene therapy in osteosarcoma cell lines: sensitization to cisplatin and doxorubicin. *Cancer Gene Ther* 2006;13:415–9.
  34. Ludeman SM. The chemistry of the metabolites of cyclophosphamide. *Curr Pharm Des* 1999;5:627–43.
  35. Jorcyk CL, Holzer RG, Ryan RE. Oncostatin M induces cell detachment and enhances the metastatic capacity of T-47D human breast carcinoma cells. *Cytokine* 2006;33:323–36.
  36. Ozbek S, Peters M, Brehahn K, et al. The designer cytokine hyper-IL-6 mediates growth inhibition and GM-CSF-dependent rejection of B16 melanoma cells. *Oncogene* 2001;20:972–9.
  37. Palmqvist P, Persson E, Conaway HH, Lerner UH. IL-6, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M stimulate bone resorption and regulate the expression of receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF- $\kappa$ B in mouse calvariae. *J Immunol* 2002;169:3353–62.
  38. Tanaka M, Hara T, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Miyajima A. Reconstitution of the functional mouse oncostatin M (OSM) receptor: molecular cloning of the mouse OSM receptor  $\beta$  subunit. *Blood* 1999;93:804–15.
  39. Bellido T, Borba VZ, Roberson P, Manolagas SC. Activation of the Janus kinase/STAT (signal transducer and activator of transcription) signal transduction pathway by interleukin-6-type cytokines promotes osteoblast differentiation. *Endocrinology* 1997;138:3666–76.
  40. Sims NA, Jenkins BJ, Quinn JM, et al. Glycoprotein 130 regulates bone turnover and bone size by distinct downstream signaling pathways. *J Clin Invest* 2004;113:379–89.
  41. Sims NA, Walker EC, McGregor NE, Poulton IJ, Gillespie MT, Martin TJ. Oncostatin M is an essential regulator of bone formation, adipogenesis and osteoclastogenesis. *Bone* 2007;40:S126.
  42. Dillon SR, Sprecher C, Hammond A, et al. Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice. *Nat Immunol* 2004;5:752–60.
  43. Scaffidi AK, Mutsaers SE, Moodley YP, et al. Oncostatin M stimulates proliferation, induces collagen production and inhibits apoptosis of human lung fibroblasts. *Br J Pharmacol* 2002;136:793–801.
  44. Langdon C, Kerr C, Tong L, Richards CD. Oncostatin M regulates eotaxin expression in fibroblasts and eosinophilic inflammation in C57BL/6 mice. *J Immunol* 2003;170:548–55.
  45. Weisberg E, Boulton C, Kelly LM, et al. Inhibition of mutant FLT3 receptors in leukemia cells by the small molecule tyrosine kinase inhibitor PKC412. *Cancer Cell* 2002;1:433–43.
  46. Zaugg K, Rocha S, Resch H, et al. Differential p53-dependent mechanism of radiosensitization *in vitro* and *in vivo* by the protein kinase C-specific inhibitor PKC412. *Cancer Res* 2001;61:732–8.

Les figures 5 et 6 de cet article se trouvent en couleur sur ces pages pour une meilleure visibilité

A



B



C

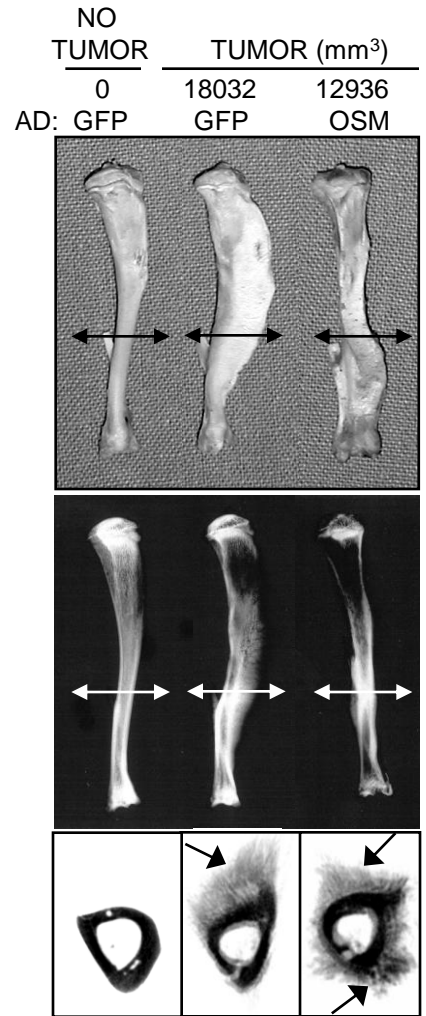


Figure 5



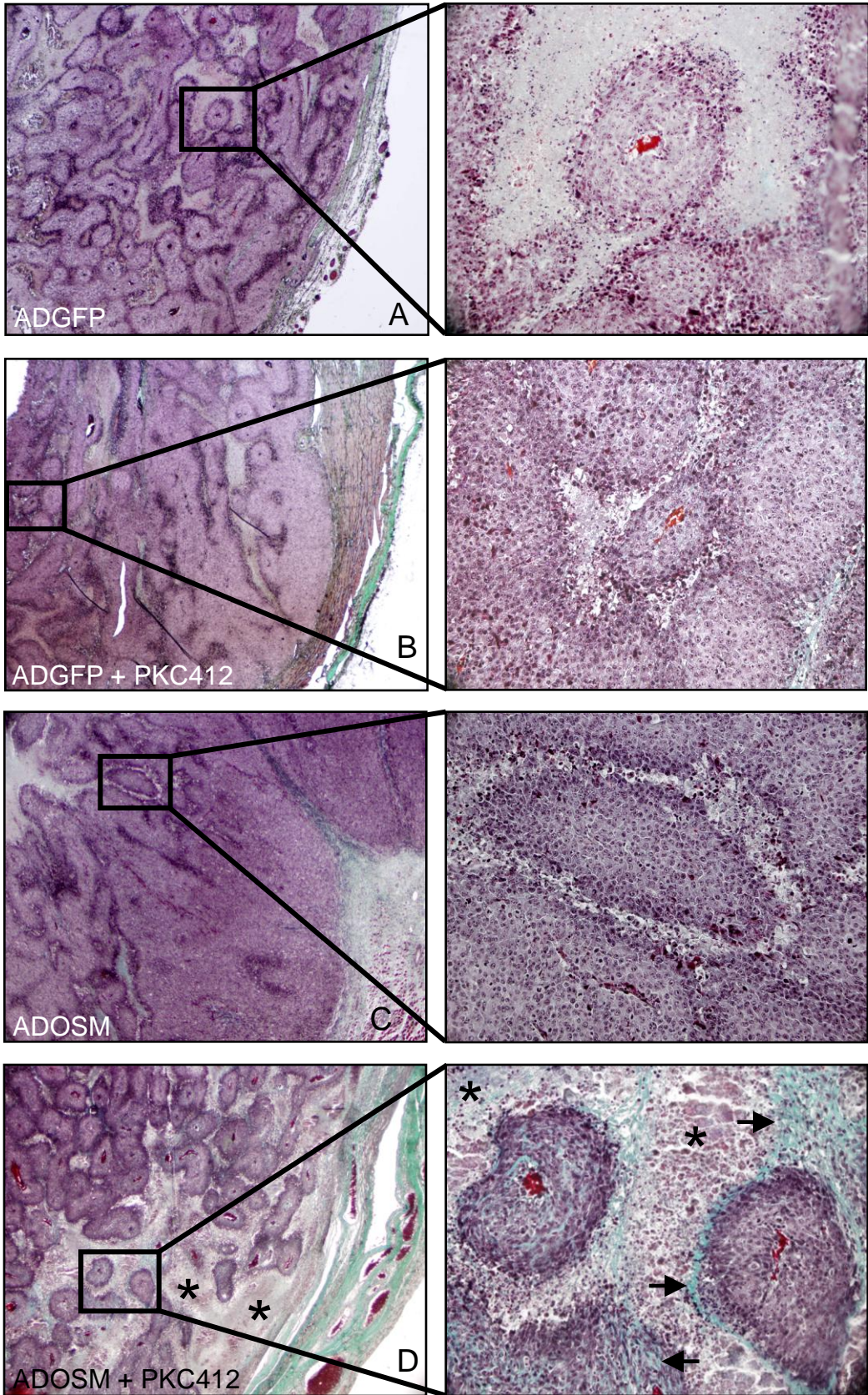
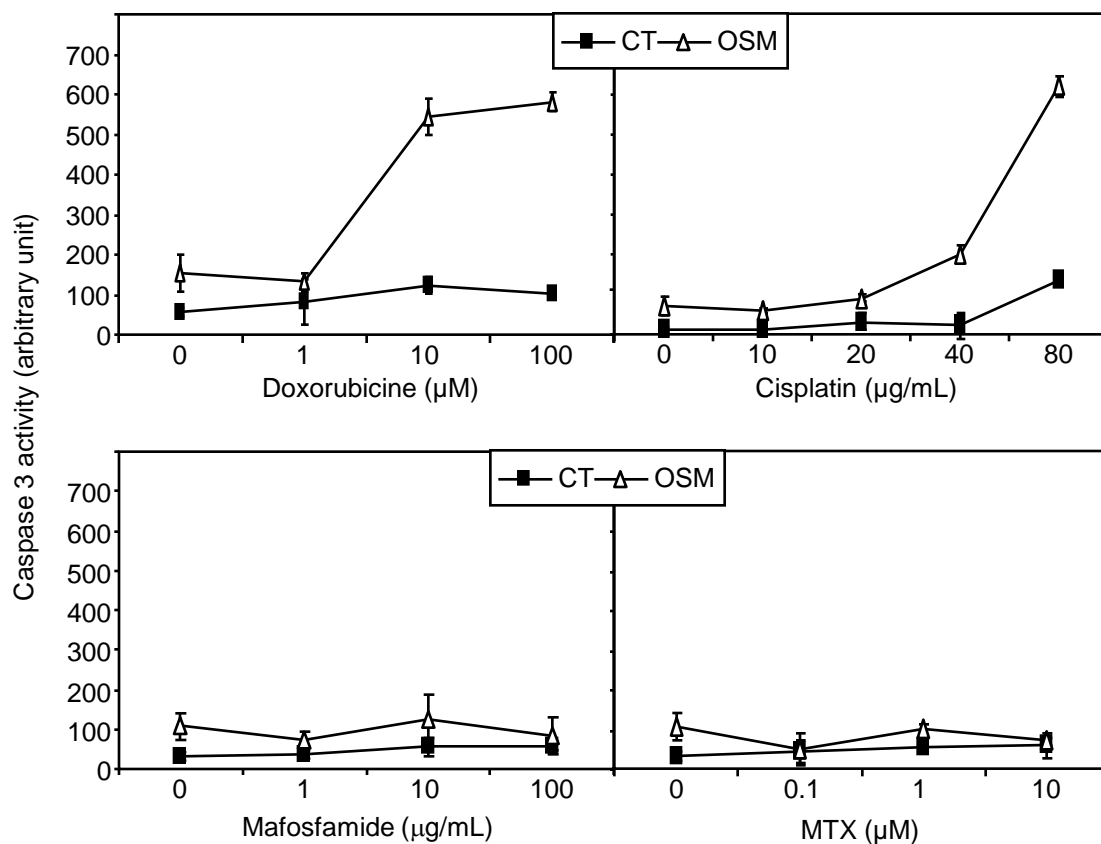


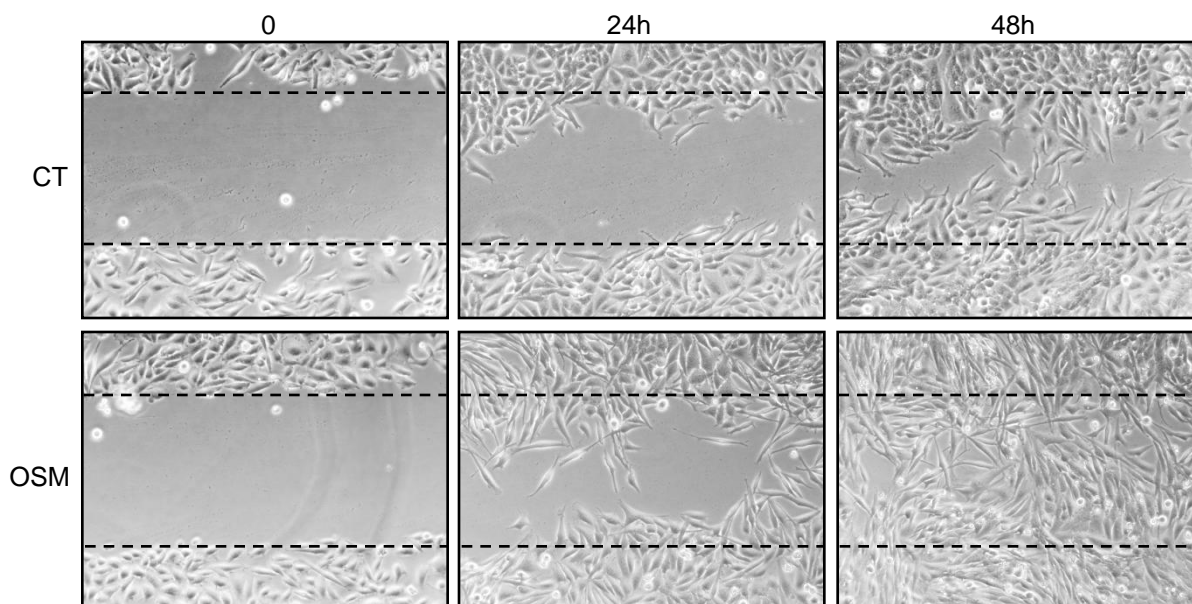
Figure 6

## Supplementary Fig S1



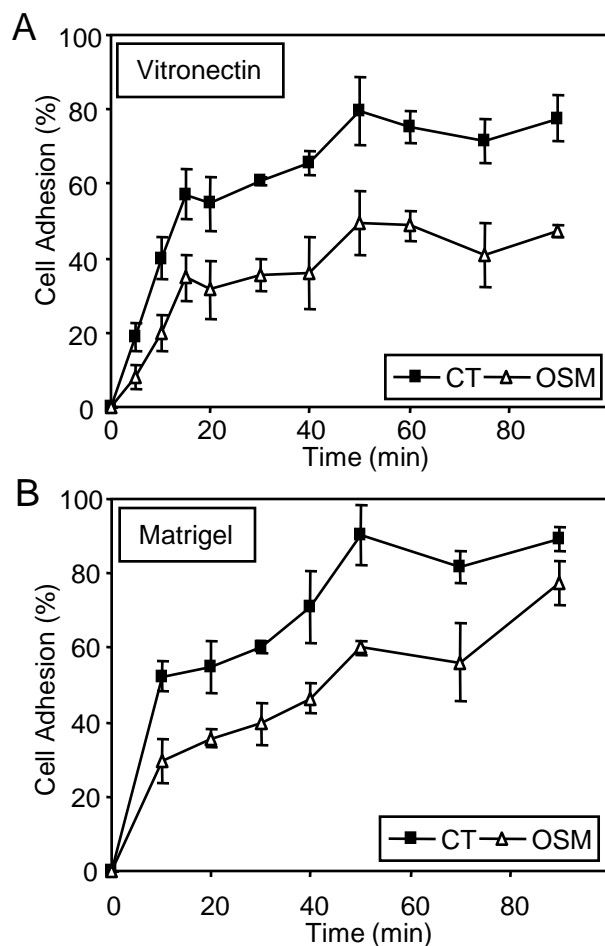
### Supp Fig S1: OSM induces caspase 3 activity in association with Doxorubicine or Cisplatin on OSRGA cells in vitro.

OSRGA cells were treated with OSM for 3 days, then increasing concentrations of indicated chemotherapeutic agent were added for the last 5h. Caspase 3 activity was determined on cell lysates by a fluorometric assay. Bars represent the mean  $\pm$  SD and similar results were observed in three independent experiments. MTX: Methotrexate.



**Supp Fig S2: OSM enhances motility of OSRGA cells in vitro.**

OSRGA cells were treated with OSM and a slit was performed on the cell monolayer. At indicated time, phase contrast photographs were taken. The horizontal hatched bars represent the original limit of the slit. Note also the modification of cell shape by OSM, the cells being more elongated. Original magnification, 100X.



**Supp Fig S3: OSM reduces adhesion of OSRGA cells to vitronectin.**

OSRGA cells were treated with OSM for 3 days, dissociated with EDTA, and tested for adhesion to vitronectin or matrigel-coated wells. Results are expressed as percentage of adherent cells.

## Complément de discussion à l'article 4

Les précédentes études *in vitro* indiquent que l'OSM semble avoir un effet biphasique sur l'ostéogenèse, stimulant les premières étapes de l'ostéogenèse sur des cellules précurseurs mais induisant une différenciation de type ostéocytaire sur des cellules plus matures et à plus long terme. De plus, l'OSM est capable d'augmenter l'expression de RANKL par les ostéoblastes, molécule pro-résorptive stimulant les ostéoclastes. Il en résulte une stimulation de la résorption, avec relargage de calcium, ces effets étant retrouvés avec les autres cytokines de la famille de l'IL-6, comme le LIF ou l'IL-11 ou l'IL6 associée à son récepteur soluble (Palmqvist et al., 2002). Plus récemment, le rôle de l'OSM sur le tissu osseux a été analysé chez des souris adultes déficientes pour OSMR. Ces dernières présentent une diminution de la résorption osseuse par les ostéoclastes ainsi que de la formation osseuse par les ostéoblastes, indiquant que l'OSM ou les autres cytokines utilisant cette chaîne réceptrice telle que l'IL-31 joue un rôle important dans le maintien d'un remodelage osseux normal (Walker, 2009). Dans notre étude, nous avons montré que la sur-expression systémique d'OSM exerce un effet important sur la biologie de l'os dans des conditions non cancéreuses. En effet, la production d'OSM réduit les concentrations sériques des marqueurs ostéoblastiques et ostéoclastiques, reflet d'une activité ostéoblastique et d'une activité ostéoclastique ralenties, affectant très probablement le remodelage osseux assuré par ces deux types cellulaires. Ces effets cellulaires se traduisent par une modification de la structure osseuse, puisque différentes mesures ont montré une réduction du volume osseux trabéculaire. Ces observations ressemblent à celles faites dans une pathologie osseuse bien connue : l'ostéoporose. Mais dans cette maladie, la perte de masse osseuse est principalement due à un remodelage osseux trop important et à une activité accrue des ostéoclastes, ce qui ne semble pas être le cas dans notre étude. La perte osseuse pourrait être due en partie à la diminution de l'activité des ostéoblastes et donc de la formation osseuse. De plus, il est possible que la première action de l'OSM soit une stimulation indirecte de la résorption osseuse par les ostéoclastes. Puis étant donné que les ostéoblastes sont nécessaires au maintien de l'activité des ostéoclastes, l'effet inhibiteur de l'OSM sur les ostéoblastes pourrait être à l'origine d'une diminution de l'activité ostéoclastique. Des analyses cinétiques plus poussées sont nécessaires pour répondre à ces questions.

Nous avons mis en évidence, dans l'article 3, que l'OSM est capable d'induire une différenciation terminale en cellules de type ostéocytaire. Il est donc possible que l'effet inhibiteur de l'OSM sur l'activité ostéoblastique soit en réalité dû, au moins en partie, à la



stimulation terminale des ostéoblastes en ostéocytes. Une première analyse histologique n'a pas montré de grosses variations dans le nombre d'ostéocytes et nous travaillons encore maintenant à la quantification précise des ostéocytes par histomorphométrie (voir article suivant). De plus, les ostéocytes expriment RANKL mais ne peuvent stimuler l'ostéoclastogénèse que par contact direct avec les précurseurs ostéoclastiques. Par conséquent, on peut se demander si les ostéocytes sont capables de soutenir la différenciation ostéoclastique *in vivo*. Dans ce contexte, l'induction d'une différenciation ostéocytaire par l'OSM pourrait être à l'origine d'une diminution de la formation des ostéoclastes.

Dans un cadre tumoral, la substance osseuse néoformée à la surface du tibia suite au développement tumoral est très différente lors d'un traitement à l'OSM. Elle ne se développe pas de façon uniforme et homogène (en feu d'herbe) autour de l'os, mais plutôt de manière anarchique. Ainsi, la surface de cet os ectopique est augmentée par rapport aux animaux non traités, et cet effet semble incriminer à nouveau une diminution d'activité ostéoblastique plutôt que l'activation des ostéoclastes. En effet, l'augmentation de la surface osseuse ectopique par l'OSM est insensible à l'acide zolédronique, un puissant inhibiteur des ostéoclastes utilisé notamment pour le traitement de l'ostéoporose. Ces résultats indiquent donc que l'OSM affecte le remodelage osseux dans des conditions physiologiques mais également lors du développement des ostéosarcomes pendant lequel la prolifération cellulaire et le remodelage sont très intenses. Cependant, ces effets de l'OSM seule sur le remodelage osseux ne semblent pas favoriser ou défavoriser le développement tumoral et nous n'avons pas observé d'effet pro-résorption suffisamment important pour stimuler le cercle vicieux entre dégradation osseuse et prolifération tumorale.

L'OSM seule n'a donc pas d'effet pro- ou anti-cancéreux dans le modèle d'ostéosarcome de rat que nous avons utilisé alors que cette cytokine inhibe la prolifération des cellules OSRGA en induisant l'expression de la protéine p21<sup>WAF1</sup> *in vitro* (Chipoy et al., 2004). Cependant, l'effet inhibiteur de l'OSM sur la prolifération de ces cellules *in vitro* n'a pu être observé qu'en l'absence de sérum ou en quantité très faible (Chipoy et al., 2004), suggérant que les facteurs de croissance présents dans le sérum pourrait empêcher l'action cytostatique de l'OSM *in vitro* et *in vivo*. Comme montré *in vitro*, l'OSM associée à un inhibiteur de kinases, le Midostaurin, est capable de prévenir la progression de la tumeur primaire *in vivo* alors que ces agents seuls n'ont pas d'effet anti-tumoral. Cet effet anti-tumoral semble être dû à une stimulation de l'apoptose dans les cellules cancéreuses. En effet,



une augmentation de la nécrose et de la fibrose au niveau de la tumeur est observée lorsque ces deux agents sont associés. Nous pouvons donc penser que, comme montré *in vitro*, l'OSM augmente le ratio Bax/Bcl-2 dans les cellules cancéreuses *in vivo*, les rendant plus sensibles à la mort cellulaire induite par le Midostaurin. L'OSM sensibilise également les cellules OSRGA à l'apoptose induite par la doxorubicine et le cisplatine, deux agents de chimiothérapie connus pour induire la mort de cellules issues d'ostéosarcome via p53 et la voie apoptotique mitochondriale (Ganjavi et al., 2006; Siddik, 2003).

Nous avons également montré *in vitro* que l'OSM augmente la migration et diminue l'adhérence des cellules OSRGA (figures S2 et S3), suggérant un rôle pro-métastatique de cette cytokine comme précédemment décrit avec des cellules issues de cancer du sein (Jorcyk et al., 2006). Cependant l'OSM est également capable d'induire l'expression de TIMP1 dans les poumons de souris (Kerr et al., 1999) et de réduire les métastases pulmonaires issues de mélanomes (Ouyang et al., 2006), suggérant que l'OSM pourrait inhiber les métastases pulmonaires dans notre modèle d'ostéosarcome. Cependant, nous avons observé que l'OSM seule n'a pas d'effet sur la dissémination métastatique alors qu'en association avec le Midostaurin, elle réduit la formation de métastases pulmonaires. Cet effet anti-métastatique est sans doute secondaire à la diminution des tumeurs osseuses primaires.

Il faut noter enfin que si le Midostaurin est bien toléré, de fortes doses d'AdOSM en i.v. (forte production d'OSM par le foie) aboutissent à de très sérieux effets indésirables. Les animaux présentent en quelques jours une inflammation généralisée avec conjonctivite, perte d'appétit et de poids (la température n'a pas été analysée) aboutissant à une mortalité de 90%. Les injections en i.m. semblent mieux tolérées car elles ne permettent qu'une production d'OSM moindre par le muscle tibial. Si l'OSM représente donc une molécule anti-cancéreuse intéressante, les doses et son mode d'administration doivent être étudiés de façon très précise.

**En conclusion, les expérimentations *in vitro* et *in vivo* indiquent que :**

- **l'OSM seule n'induit pas la mort cellulaire des ostéoblastes et des ostéosarcomes mais inhibe la formation osseuse par ces cellules.**
- **étant donné que l'OSM sensibilise à l'apoptose les ostéosarcomes présentant une p53 sauvage, l'utilisation d'inhibiteurs de kinases tels que le Midostaurin ou d'agents de chimiothérapie tels que la doxorubicine ou le cisplatine en association avec l'OSM pourrait représenter de nouveaux traitements anticancéreux.**

## **PARTIE II**

# **Effets de l'Interleukine-31 en comparaison des autres cytokines de la famille de l'Interleukine-6 sur la biologie de l'os**

## Introduction

Le tissu osseux est un tissu conjonctif complexe en perpétuel remaniement, reposant sur l'équilibre entre deux mécanismes: la formation et la résorption osseuse. Ce remodelage osseux, qui permet de préserver les propriétés biomécaniques du squelette et d'assurer l'homéostasie minérale, fait intervenir deux types cellulaires : les ostéoclastes et les ostéoblastes.

Les ostéoblastes sont des cellules ostéoformatrices, responsables de la synthèse des constituants de la matrice organique osseuse et de sa minéralisation. D'origine mésodermique, les progéniteurs ostéoblastiques sont des cellules mésenchymateuses (Owen, 1988). Responsable de la résorption osseuse, l'ostéoclaste est une grosse cellule multinucléée dérivant de la lignée hématopoïétique monocytaire (Suda et al., 1992). Ces deux types cellulaires communiquent entre eux via des interactions cellulaires ou des facteurs solubles, et contrôlent ainsi leur différenciation et leurs fonctions permettant de maintenir un remodelage osseux adapté.

Les cytokines de la famille de l'IL-6 sont capables de contrôler la différenciation et l'activité des ostéoblastes et des ostéoclastes grâce à une variété de mécanismes complexes, parfois contradictoires. Cette famille de cytokines est aujourd'hui constituée de dix membres : l'IL-6, l'IL-11, l'IL-27, l'IL-31, l'Oncostatine M (OSM), le leukemia inhibitory factor (LIF), le ciliary neurotrophic factor (CNTF), la cardiotrophine-1 (CT-1), la cardiotrophin-like cytokine (CLC) et la neuropoïétine (NP) (Chen and Benveniste, 2004). L'IL-6 favorise, en effet, la différenciation des cellules souches mésenchymateuses (MSC) en ostéoblastes lorsqu'elle est associée à son récepteur soluble (IL-6Rs)(Erices et al., 2002). De plus, cet effet est caractérisé par une augmentation de la production de RANKL par les ostéoblastes, stimulant ainsi l'ostéoclastogenèse et la résorption osseuse (Palmqvist et al., 2002). Cependant, l'IL-6 peut également directement inhiber la différenciation des monocytes en ostéoclastes au profit d'une différenciation macrophagique (Duplomb et al., 2008). L'OSM est également très active sur les cellules osseuses. En particulier, elle a des activités complexes et mal comprises sur la différenciation ostéoblastique, stimulant les premières étapes de l'ostéogenèse mais inhibant l'expression des marqueurs ostéoblastiques et la formation osseuse à des étapes plus tardives (Chipoy et al., 2004). Cet effet inhibiteur sur la formation osseuse peut s'expliquer en partie par l'induction d'une différenciation ostéocytaire par l'OSM (Brounais et al., 2009). De plus, comme l'IL-6 associée à son récepteur soluble, elle stimule la production de RANKL par les ostéoblastes, stimulant ainsi la résorption

osseuse (Palmqvist et al., 2002). Cependant à l'inverse de l'IL-6, l'OSM n'a pas d'action directe sur la différenciation ostéoclastique. Ces résultats indiquent que bien qu'elles soient redondantes, les cytokines de la famille de l'IL-6 ont également des activités spécifiques, notamment sur les cellules osseuses.

L'Interleukine-31 (IL-31) est une cytokine de la même famille récemment décrite et principalement produite par les lymphocytes T helper de type 2. L'IL-31 se lie à son récepteur de haute affinité composé de la sous-unité gp1 associée à la sous-unité OSMR et active deux principales voies de signalisation : la voie JAK/STAT3 et la voie des MAPKs. Cette cytokine est impliquée dans les pathologies inflammatoires telles que la dermatite atopique. En effet, des souris transgéniques surexprimant l'IL-31 développent un prurit, une kératinose, une alopécie ainsi que des lésions cutanées caractérisées par une infiltration de cellules inflammatoires et de mastocytes (Dillon et al., 2004). Un phénotype similaire est observé chez des patients atteints de dermatite atopique. Il a également été montré que l'IL-31 induit, dans des kératinocytes humains, l'expression de plusieurs chémokines telles que GRO1-a (Growth Regulated Oncogene 1), TARC (Thymus and Activation Regulated Chemokine) ou MDC (Macrophage-Derived Chemokine) (Dillon et al., 2004). De même, l'IL-31 est capable, dans des cultures de cellules épithéliales, d'augmenter l'expression de cytokines pro inflammatoires, de chémokines et de MMP (Matrix Metallo Proteinase) (Ip et al., 2007; Yagi et al., 2007) indiquant que cette cytokine pourrait fonctionner comme une cytokine pro-inflammatoire impliquée dans le recrutement de cellules polynucléaires, de monocytes et de cellules T au site inflammatoire *in vivo*. Une autre étude montre que l'IL-31 peut limiter les réponses inflammatoires de type 2 (Perrigou et al., 2007). Cependant, aucune étude n'a mis en évidence un effet de cette cytokine sur le tissu osseux.

Etant donné que l'IL-31 se fixe sur la même chaîne réceptrice que l'OSM et que cette dernière est très active sur les cellules osseuses, le but de notre étude a été de déterminer son action sur le remodelage osseux et plus particulièrement sur la différenciation ostéoblastique et ostéoclastique *in vitro* puis *in vivo*. De plus, nous avons comparé les effets de l'IL-31 à ceux des autres cytokines de la même famille et plus particulièrement à l'IL-6, qui est la cytokine de référence de cette famille, et à l'OSM, qui partage une chaîne réceptrice avec l'IL-31.

## **Matériel et méthodes**

### **Culture cellulaire / Réactifs**

#### Cellules CD14+

Les cellules CD14+ humaines ont été obtenues après centrifugation sur gradient de Ficoll (Sigma) des cellules mononucléées du sang périphériques (PBMC) donné par l'Établissement Français du Sang (EFS). Les cellules monocytaires positives pour le marqueur CD14 ont ensuite été isolées grâce à un tri sur billes magnétiques couplées à des anticorps anti-CD14 (Miltenyi Biotec) comme décrit précédemment (Duplomb et al., 2008).

#### Cellules souches mésenchymateuses humaines (MSC)

Les MSC humaines sont issues de la moelle osseuse (crête iliaque) de trois patients différents : 2 femmes de 54 et 88 ans et un homme de 67 ans (Dr. J. Delécrin, service d'orthopédie du CHU de Nantes). Aucune différence entre ces patients n'a été observée dans les résultats suivants.

La moelle osseuse totale a été centrifugée sur gradient de Ficoll, puis mise en culture durant 4 jours en milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Bio Whittaker), complété avec 10% de SVF et 1% d'une solution d'antibiotiques (pénicilline-streptomycine) à 5000 unités/mL (Invitrogen), à raison de 500.000 cellules /cm<sup>2</sup>. Seules les cellules ayant adhéré ont été gardées, permettant ainsi d'éliminer les cellules hématopoïétiques et de ne conserver que les MSC. Ces cellules adhérentes ont ensuite été cultivées dans du milieu DMEM additionné de 10 % de SVF, d'antibiotiques et de bFGF (1 ng/mL, R&D systems) comme facteur de prolifération. Les MSC ont été utilisées dans cette étude avec un nombre de passage inférieur à 4.

Par cytométrie en flux, ces MSC sont négatives pour les marqueurs hématopoïétiques CD45 et CD34 et positives pour les marqueurs mésenchymateux CD105 et CD90 (résultats non montrés).

#### Cellules CD11b

Les cellules CD11b murines ont été obtenues à partir des cellules de la moelle osseuse de souris C57/bl6 mâles âgées de 5 semaines (élevages Janvier). Les cellules monocytaires

positives pour le marqueur CD11b ont été isolées grâce à un tri sur billes magnétiques couplées à des anticorps anti-CD11b (Miltenyi Biotec). Ces cellules adhérentes ont ensuite été cultivées dans du milieu  $\alpha$ MEM (Minimum essential medium alpha, Invitrogen) additionné de 10 % de SVF (sérum de veau fœtal, Dominique Dutscher) et 1% d'une solution d'antibiotiques (pénicilline-streptomycine) à 5000 unités/mL.

#### Cellules de moelle osseuse de souris

Ces cellules ont été obtenues à partir de la moelle osseuse totale de souris C57/bl6 mâles âgées de 5 semaines (élevages Janvier). Ces cellules ont ensuite été cultivées dans du milieu  $\alpha$ MEM additionné de 10 % de SVF et 1% d'une solution d'antibiotiques (pénicilline-streptomycine) à 5000 unités/mL.

#### Cellules de calvaria de souris

Les cellules de calvaria de souris ont été obtenues à partir de souris C57/bl6 âgées de 4 jours par la technique de culture d'explant précédemment décrite (Brounais et al., 2009). Ces cellules ont ensuite été cultivées dans du milieu  $\alpha$ MEM additionné de 10 % de SVF et 1% d'une solution d'antibiotiques (pénicilline-streptomycine) à 5000 unités/mL et utilisées dès le premier passage.

Les différents types cellulaires ont été incubés dans une atmosphère humide à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>. Les manipulations ont été effectuées sous hotte à flux laminaire vertical. Tous les comptages cellulaires ont été réalisés après une coloration au bleu Trypan (Sigma).

#### Réactifs

Les molécules utilisées dans les différentes expérimentations sont: l'OSM murine et humaine, l'IL-6 humaine, le récepteur soluble humain de l'IL-6, l'IL-31 humaine, l'IL-11 humaine, l'IL-27 humaine (hétérodimère composé des protéines EBI3 (EBV Induced gene 3) et p40), le CNTF humain, la CT1 humaine, la CLC humaine associée à son récepteur soluble CLF1 (cytokine-like factor 1), le MCSF humain et murin (R&D systems), l'IL-31 murine (Peprotech ou produite par l'U564 à Angers), le LIF humain produit par l'U892 à Nantes ainsi que RANKL humain (Amgen), la dexaméthasone (Sigma) et la vitamine D3 (Hoffman La Roche).

## **Test de minéralisation**

### Cellules souches mésenchymateuses humaines

#### - Etape de prolifération

Les MSC ont étéensemencées en l'absence de bFGF à raison de 20000 cellules par puits en plaque 24 puits puis mises en culture pendant 4 jours. Cette étape de prolifération permet d'atteindre la confluence des cellules.

#### - Etape de différenciation

Les milieux ont ensuite été remplacés par du DMEM + 10% SVF + Dexaméthasone (Dex,  $10^{-7}$  M) + Vitamine D3 (VD3,  $10^{-8}$  M) + cytokines humaines précédemment citées à 100 ng/ml. Les cellules ont ensuite été remises en culture pendant 4 jours.

#### - Etape de minéralisation

Lors de cette étape, l'acide ascorbique (Vitamine C, 50 µg/mL, Sigma) et le β-glycérophosphate (2,16 mg/mL, Sigma) ont été ajoutés dans tous les puits sauf les contrôles négatifs (-Dex -VD3) en plus du milieu de différenciation (ci-dessus). La plaque a de nouveau été mise en culture pendant 14 jours, les milieux étant intégralement changés tous les 3 ou 4 jours.

#### - Révélation au rouge alizarine et quantification de la minéralisation

A l'issue de ces 22 jours, les puits ont été fixés avec de l'éthanol 70 % puis la matrice minéralisée a été mise en évidence par ajout d'une solution de rouge alizarine (40 mM, pH 7,4, Sigma-Aldrich) pendant 10 min.

Afin de quantifier la minéralisation, les puits ont ensuite été photographiés sous loupe binoculaire (Zeiss) puis une analyse d'image a été réalisée grâce au logiciel Qwin™ (Leica) afin de quantifier la surface minéralisée.

### Co-cultures MSC et CD14+

Pour ces expériences 20.000 MSC et 200.000 CD14+ ont étéensemencées dans 500 µL de DMEM + 10% SVF par puits, en plaque 24 puits. Après 3 jours de culture (étape de prolifération), et afin de ne pas perdre les CD14+ non adhérents, seuls 300 µL de milieu ont été prélevés dans chaque puits et remplacés par 125 µL de DMEM + 10% SVF et, selon les

conditions, 250  $\mu$ L de DMEM + 10% SVF +/- Dex et VD3 +/- cytokines (IL-6 ou IL-31 humaines), LPS ou RANKL à 100 ng/ml final. 375  $\mu$ L de milieu ont été ajoutés au lieu des 300  $\mu$ l prélevés afin de compenser l'évaporation observée dans des expériences préliminaires. Après 4 jours de culture (étape de différenciation), les milieux ont été changés de la même façon mais avec ajout de  $\beta$ -glycérophosphate et d'acide ascorbique (étape de minéralisation). Au 22<sup>ème</sup> jour de culture, les plaques ont été colorées au rouge alizarine comme décrit précédemment.

## **Différenciation ostéoclastique**

### Cellules CD14+ et cellules CD11b

Les cellules CD14+ ont étéensemencées en plaque 96 puits à raison de 45 000 cellules par puits dans un milieu composé de  $\alpha$ -MEM contenant 10% de SVF et 25 ng/mL de hM-CSF. Les cellules CD11b ont quant à elles étéensemencées à raison de 250000 cellules par puits en plaque 24 puits dans un milieu composé de  $\alpha$ -MEM contenant 10% de SVF et 25 ng/mL de mM-CSF. Après 3 jours de culture, les milieux ont été changés avec ajout ou non de 100 ng/ml de RANKL et ajout ou non de 100 ng/mL de cytokines (IL-6, IL-11, IL-27, IL31, LIF, CNTF, CT1, CLC et OSM humaines pour les cellules CD14+, IL-6 humaine, IL-31 et OSM murines pour les cellules CD11b). Les milieux ont ensuite été intégralement changés tous les 4 jours, la formation d'ostéoclastes apparaissant après environ 14 jours de culture. Les cellules multinucléées ont été comptées sous un microscope couplé à une caméra Olympus D70 (Hamburg, Germany) après une coloration TRAP suivant les indications du fournisseur (Leukocyte Acid Phosphatase Assay kit; Sigma) (Duplomb et al, 2008).

### Co-culture cellules de moelle osseuse et de calvaria de souris

Les cellules de moelle osseuse et de calvaria de souris ont étéensemencées en plaque 24 puits à raison de 400000 cellules et 20000 cellules par puits respectivement dans 500  $\mu$ L de milieu composé de  $\alpha$ -MEM contenant 10% de SVF. Le lendemain, 250  $\mu$ L de milieu ont été changés avec ajout ou non de d'IL-6 humaine, d'OSM murine, d'IL-31 murine, de RANKL humain (100 ng/mL) ou de VD3 ( $10^{-8}$  M). De même, 250  $\mu$ L de milieu ont été changés tous les 3 ou 4 jours, la formation d'ostéoclastes apparaissant après environ 14 jours de culture.



## Extraction des ARN totaux et RT-PCR

Les ARN totaux ont été extraits à l'aide du réactif TRIzol<sup>®</sup> (Invitrogen) suivant le protocole préconisé par le fournisseur. Brièvement, les ARN totaux ont été isolés dans la phase aqueuse de la solution TRIzol<sup>®</sup>/chloroforme suite à la lyse des cellules. Les ARN ont ensuite été respectivement précipités puis lavés par de l'isopropanol absolu et de l'éthanol 75%. Le culot d'ARN a finalement été repris dans 20 µL d'eau DNase et RNase free (Braun).

Les réactions de RT-PCR ont été effectuées respectivement à partir des mélanges réactionnels suivants :

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

pour les réactions de PCR : 2 µL de produit de RT, 2 µL d'amorces sens et anti-sens (10 pmoles/µL, Eurobio), 5 µL de tampon 10X (Applied Biosystem), 6 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM, Applied Biosystem), 2 µL de dNTP (10 mM, Eurobio), 0,25 µL de Ampli Taq gold (5 U/µl, Applied Biosystem) et 28,75 µL d'eau DNase et RNase free. Les réactions de PCR ont été réalisées à l'aide des couples d'amorces suivantes.

récepteur	espèce	amorces		conditions de PCR
gpl	homme	S	Fourni par l'Inserm U564, Angers	95°C(30s)/60°C(30s)/72°C(30s)
		AS		40 cycles
IL-6R	homme	S	ATGCTCCCGAATGATCACC	95°C(30s)/60°C(30s)/72°C(30s)
		AS	TCGGTATCGAAGCTGGAAC	40 cycles
OSMR	homme	S	GGAGACACGATGGGCTATGT	95°C(30s)/60°C(30s)/72°C(30s)
		AS	AAGGTTTTCCACGGTACTG	40 cycles
gp130	homme	S	AATGAAGCTGTCTTAGCGTGGGAC	95°C(30s)/60°C(30s)/72°C(30s)
		AS	GGCAATATGACTCTTGAAGGATC	40 cycles
gpl	souris	S	Fourni par l'Inserm U564, Angers	95°C(30s)/55°C(30s)/72°C(30s)
		AS		40 cycles
IL6R	souris	S	ACGCCTGGACAGAATCC	95°C(30s)/60°C(30s)/72°C(30s)
		AS	TGGTCGAGGTATTGTCA	40 cycles
OSMR	souris	S	ACTGCCTGGGGTGGTCTAA	95°C(30s)/60°C(30s)/72°C(30s)
		AS	GGTCATGATGGCATTGTGG	40 cycles
gp130	souris	S	TCCTTTGGAAGGTGGAGCTTG	95°C(30s)/60°C(30s)/72°C(30s)
		AS	AACTCGTGTGGAAGACATTGC	40 cycles
18S		S	TCAAGAACGAAAGTCGGAGGTTTCG	95°C(30s)/62°C(30s)/72°C(30s)
		AS	TTATGCTCAATCTCGGGTGGCTG	25 cycles

## Western Blot

Les cellules ont été cultivées pendant 2 heures en l'absence de SVF puis lysées avec un tampon RIPA comme décrit précédemment (Brounais et al., 2008a). Le dosage protéique de chaque échantillon a ensuite été réalisé selon la technique BCA (Sigma). Cinq  $\mu\text{g}$  de protéines ont été séparés par électrophorèse sur un gel SDS-PAGE 10% puis transférés sur une membrane Immobilon-P (Millipore). Les membranes ont ensuite été incubées avec les anticorps suivants : P-STAT3 (Tyr705)(Cell Signaling Technologies, Beverly, MA, USA), STAT3 (BD Biosciences) ou actine (Sigma) en PBS, 0.05% Tween 20 et 3% BSA à 4 °C pendant une nuit. Puis, les membranes ont été lavées et incubées avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase en PBS, 0.05% Tween 20 et 5% lait. Les protéines marquées ont été mises en évidence grâce à une solution ECL (BM chemiluminescence blotting substrate, Roche) contenant le substrat de l'enzyme peroxydase, le luminol selon les indications du fournisseur. La révélation a été effectuée avec une caméra G-box (Syngene).

## Expérimentations in vivo

### Injection des adénovirus

Les adénovirus utilisés pour les expérimentations *in vivo* sont les suivants :

- L'adénovirus contenant le transgène codant l'OSM murine a été fourni par le Docteur Carl D. Richards (Hamilton, Canada)(Kerr et al., 1999).
- L'adénovirus contenant le transgène codant l'IL-31 murine a été produit par l'U649 à Nantes à partir du plasmide pShuttle-CMV-mIL-31 fourni par l'U564 à Angers contenant le cDNA complet de l'IL-31 murine.
- L'adénovirus contenant le transgène codant l'IL-6 murine a été fourni par le Docteur Carl D. Richards (Braciak et al., 1993).
- L'adénovirus contenant le transgène codant GFP (green fluorescent protein) a été produit par l'U649 à Nantes.

Les souris C57/bl6 mâles âgées de 8 semaines ont été infectées par injection de différentes doses d'adénovirus ( $5 \cdot 10^7$  PFU ou  $5 \cdot 10^8$  PFU) soit au niveau du muscle tibial antérieur gauche (i.m.) soit dans le fût médullaire du tibia gauche (i.o.) à raison de 20  $\mu\text{L}$  en PBS.

Le poids des animaux a été mesuré trois fois par semaine jusqu'à leur sacrifice, 7 jours après l'injection des adénovirus.

#### Activité phosphatase alcaline

L'activité phosphatase alcaline a été mesurée à partir des sérums de souris prélevés 7 jours après injection des adénovirus en utilisant le p-nitrophenyl phosphate comme substrat comme décrit dans l'article 3 (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France). La production de p-nitrophenol par minute a été déterminée en mesurant l'absorbance à 405 nm.

#### Analyse de l'architecture osseuse

Les paramètres architecturaux ont été analysés grâce au système haute résolution à rayons X micro CT (SkyScan, Aartselaar, Belgique). Ces mesures ont été réalisées en collaboration avec Paul Pilet (INSERM U791). Le volume osseux rapporté au volume total trabéculaire (BV/TV), l'épaisseur des travées osseuses (Tb.Th.) et le nombre de travées osseuses (Tb. N.) ont ensuite été quantifiés grâce aux logiciels ANT (reconstruction 3D) et CTan (calculs des volumes osseux) et comparés entre groupe contrôle et groupe traité. Ces mesures ont été réalisées sur le tibia gauche des animaux au niveau de l'os spongieux sur 1,5 mm sous la plaque de croissance.

#### Analyses histomorphométriques

Les fémurs gauches des animaux ont été fixés (formaldéhyde 10%), décalcifiés (EDTA 4,13%, paraformaldéhyde 0,2%, pH 7,4) puis inclus en paraffine. Des sections longitudinales de 7µm ont ensuite été marquées soit pour la TRAP afin d'identifier les ostéoclastes soit pour la phosphatase alcaline pour mettre en évidence les ostéoblastes. Le marquage de la TRAP a été réalisé en incubant les coupes 1 heure en présence de 1 mg/mL de naphthol AS-TR phosphate, 60 mmol/L de NN-diméthylformamide, 100 mmol/L de sodium tartrate et 1 mg/mL de solution Fast red TR salt (pH 5,2). Le marquage de la phosphatase alcaline a été réalisé en incubant les coupes 1 heure en présence de 0,01% de naphthol AS-MX phosphate et de 0,24 mg/mL de solution Fast red TR salt (pH 8,6)(réactifs de Sigma).

Les analyses histomorphométriques ont été réalisées selon les directives précédemment décrites (Parfitt et al., 1987) et ont permis de déterminer la surface

ostéoblastique (Ob.S/TV) et la surface ostéoclastique (Oc.S/TV) grâce aux calculs suivants (Glorieux et al., 2000) :

Ob.S/TV (osteoblast surface/tissue volume) = (osteoblast perimeter/tissu area) x 1,2

Ob.S/TV (osteoclast surface/tissue volume) = (osteoclast perimeter/tissu area) x 1,2

### Analyse statistique

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  s.d. (standard deviation) pour les figures 1 à 3 et de moyenne  $\pm$  s.e.m. (standard error of the mean) pour les figures 4 à 6. Les effets considérés comme statistiquement significatifs ont été déterminés par un test ANOVA non apparié paramétrique avec un post-test de Tuckey ( $p \leq 0,05$  ; logiciel GraphPad In Stat v3.02)

## **Résultats**

### **Analyse de la réponse des MSC humaines, des cellules CD14+ et des cellules CD11b aux cytokines de la famille de l'IL-6.**

L'IL-6, l'OSM et l'IL-31, cytokines appartenant à la famille de l'IL-6, sont caractérisées par la présence dans leurs récepteurs d'une sous-unité commune : gp130 ou gpl (pour l'IL-31) ainsi que des sous unités OSMR, ou IL-6R. L'expression de ces transcrits a donc été recherchée dans les MSC humaines ainsi que dans les monocytes humains CD14+ et murins CD11b+. Les transcrits gpl ne sont pas détectés dans les MSC humaines, qui constituent notre modèle de différenciation ostéoblastique, alors que les transcrits OSMR et dans une moindre mesure, gp130, et IL-6R sont exprimés (figure 1A). Les cellules CD14+, utilisées dans notre modèle humain de différenciation ostéoclastique, n'expriment pas les transcrits OSMR, contrairement aux transcrits gp130, gpl et IL-6R qui ont tous pu être détectés (figure 1A). Cependant, il est important de préciser qu'un traitement de ces mêmes cellules CD14+ avec l'IL-31 pendant 3 jours de culture induit une faible mais détectable expression de l'OSMR (données non montrées). Les cellules CD11b+, utilisées dans notre modèle murin de différenciation ostéoclastique, expriment fortement les transcrits IL-6R et gp130 et plus faiblement gpl et OSMR (figure 1A). Les MSC humaines semblent donc pouvoir répondre à l'OSM et à l'IL-6 mais pas à l'IL-31. Les monocytes CD14+ semblent

quant à eux être sensibles uniquement à l'IL-6 alors que les cellules CD11b devraient être capables de répondre à ces trois cytokines.

La fixation de ces cytokines sur leur récepteur est connue pour activer fortement STAT3. La phosphorylation de ce facteur de transcription a donc été étudiée par Western Blot suite à un traitement de 15 minutes avec les différentes cytokines. Nous avons ainsi pu observer que l'OSM et, dans une moindre mesure, l'IL-6 induisent l'activation de STAT3 dans les MSC humaines alors que l'IL-31 n'a aucun effet (figure 1B). La phosphorylation de STAT3 dans les cellules CD14+ n'a pu être détectée qu'après traitement à l'IL-6 (figure 1C) alors que l'IL-6 et, plus faiblement, l'OSM activent ce facteur de transcription dans les cellules CD11b (figure 1D). Ces résultats confirment que les MSC sont plus sensibles à l'OSM qu'à l'IL-6 alors que cette dernière est beaucoup plus active sur les monocytes humains et murins que l'OSM. L'IL-31 quant à elle ne semble avoir aucun effet direct sur ces trois types cellulaires.

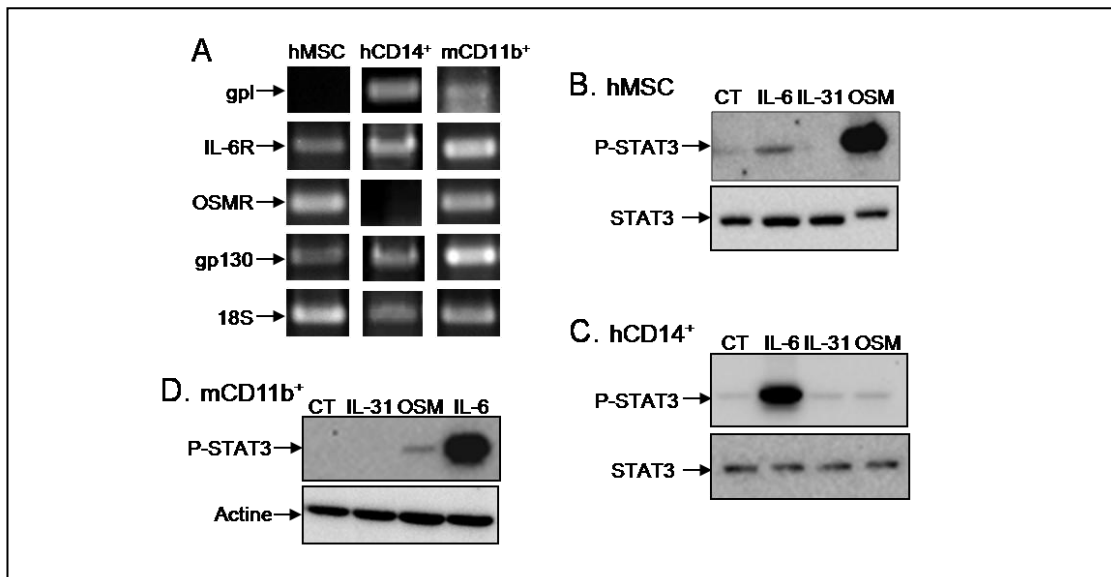


Figure 1: Sensibilité des MSC humaines, des cellules CD14+ et des cellules CD11b aux cytokines de la famille de l'IL-6.

A : Analyse transcriptionnelle des chaînes réceptrices de récepteurs aux cytokines de la famille de l'IL-6 par RT-PCR semi-quantitative. Les ARN totaux ont été extraits des différents types cellulaires et analysés par RT-PCR avec des amorces spécifiques des ADNc indiqués.

B : Les lysats protéiques de MSC humaines traitées 15 minutes avec 100 ng/mL des cytokines indiquées ont été analysés par Western Blot pour phospho-STAT3 (Tyr 705; P-STAT3) et STAT3 total (STAT3).

C : Les lysats protéiques de monocytes CD14+ humains traités 15 minutes avec 100 ng/mL des cytokines indiquées ont été analysés par Western Blot pour phospho-STAT3 (Tyr 705; P-STAT3) et STAT3 total (STAT3).

D : Les lysats protéiques de monocytes CD11b murins traités 15 minutes avec 100 ng/mL des cytokines indiquées ont été analysés par Western Blot pour phospho-STAT3 (Tyr 705; P-STAT3) et l'actine.

### **Effets de l'IL-31 sur la différenciation ostéoblastique en comparaison des autres cytokines de la même famille.**

Les cytokines de la famille de l'IL-6 contrôlent la différenciation et l'activité des ostéoblastes grâce à une variété de mécanismes complexes, parfois contradictoires. Afin de savoir si l'IL-31 est également capable d'agir sur le remodelage osseux et plus particulièrement sur la différenciation ostéoblastique à partir de MSC humaines *in vitro*, des tests de minéralisation ont été réalisés, en présence ou non de monocytes CD14+.

Dans un premier temps, l'effet direct des différentes cytokines de la famille de l'IL-6 a été étudié sur les MSC pures. Les résultats indiquent qu'aucune cytokine de cette famille

n'exerce d'effet inhibiteur sur la différenciation des MSC humaines en ostéoblastes. A l'inverse, seules l'OSM et l'IL-6 associée à son récepteur soluble sont capables de favoriser la différenciation / minéralisation des MSC de façon significative (figure 2A et B). L'IL-31 ainsi que les autres cytokines de cette famille n'ont pas d'effet direct sur la minéralisation.

Les cellules hématopoïétiques sont capables de contrôler la formation osseuse par les ostéoblastes. En effet, les ostéoclastes, issus de la moelle osseuse, traités par RANKL produisent des taux élevés de Wnt10b et de BMP6 qui stimulent la différenciation de MSC humaines en cellules ostéoblastiques capables de former des nodules minéralisés *in vitro* (Pederson et al., 2008). De même, l'ephrinB2, exprimée à la surface des ostéoclastes après traitement par RANKL, a un effet stimulateur sur la formation osseuse par les ostéoblastes qui expriment à leur surface le récepteur EphB4 (Zhao et al., 2006). De plus, comme suggéré dans certaines études non publiées, les LPS pourraient également contrôler la différenciation ostéoblastique via les cellules hématopoïétiques (Nicolaidou et al., 2009). Nous avons donc voulu savoir si, comme RANK et les LPS, les cytokines de la famille de l'IL-6 avaient un effet indirect sur la différenciation de MSC humaines en cellules ostéoblastiques. Pour cela, un test de minéralisation a été réalisé sur des co-cultures MSC / cellules CD14+. L'effet stimulateur de l'OSM et de l'IL-6 associée à son récepteur soluble n'est pas modifié par la présence de cellules CD14+ (données non montrées). De plus, seuls les LPS et RANKL augmentent la différenciation / minéralisation des MSC, uniquement en présence des cellules CD14+. En effet, l'IL-6 seule et l'IL-31 ne semblent pas avoir d'effet sur les cellules CD14+ pour favoriser la différenciation / minéralisation des MSC (figure 2C).

Parmi les cytokines de la famille de l'IL-6 étudiées, seules l'OSM et l'IL-6 associée à son récepteur soluble favorisent la différenciation ostéoblastique par un effet direct sur les MSC humaines. L'IL-6 seule et l'IL-31 n'ont aucun effet direct ou indirect sur la différenciation des MSC en cellules ostéoblastiques.

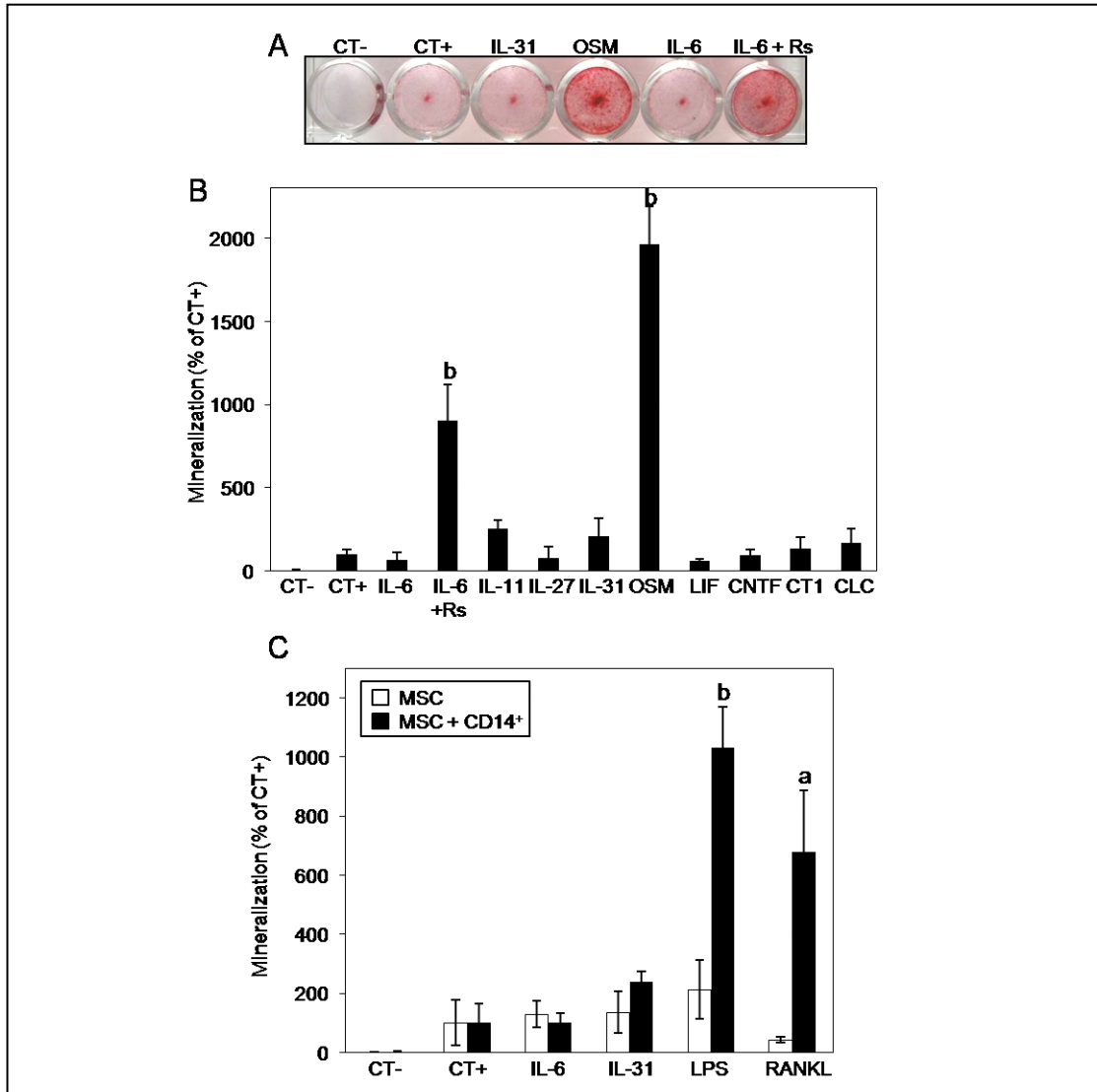


Figure 2 : Effets des cytokines de la famille de l'IL-6 sur la différenciation ostéoblastique.

La différenciation / minéralisation des MSC humaines est induite selon le protocole décrit dans le matériel et méthodes.

A : Photos représentatives de puits après coloration au rouge alizarine.

B : Quantification de la minéralisation des MSC seules après traitement avec les cytokines indiquées (100 ng/mL).

C : Quantification de la minéralisation des MSC seules ou en co-culture avec des monocytes CD14+ après les traitements indiqués (100 ng/mL).

Pour la quantification, les résultats sont présentés en % du contrôle positif  $\pm$  s.d. ( $3 \leq n \leq 5$ ).

a,  $p \leq 0,05$ ; b,  $p \leq 0,001$  par rapport au contrôle positif.



### **Effets de l'IL-31 sur la différenciation ostéoclastique en comparaison des autres cytokines de la même famille.**

Dans un premier temps, l'effet direct des différentes cytokines de la famille de l'IL-6 a été étudié sur les cellules CD14<sup>+</sup> humaines cultivées en présence de hM-CSF et de RANKL. Les résultats indiquent qu'aucune cytokine de cette famille n'exerce d'effet stimulateur sur la différenciation des monocytes en ostéoclastes. En revanche, comme cela a déjà été montré, l'IL-6 et l'IL-27 inhibent la différenciation ostéoclastique (Duplomb et al., 2008; Kamiya et al., 2007). L'IL-31 et l'OSM (non montrée) ne modifient pas la formation des ostéoclastes (figure 3A). De même, dans un modèle d'ostéoclastogenèse murin, seule l'IL-6 inhibe la différenciation des monocytes CD11b en ostéoclastes (l'IL-27 n'a pas été testée). En effet, l'IL-31 et l'OSM n'ont pas d'effet sur la différenciation ostéoclastique (figure 3B).

Enfin, étant donné que l'IL-6 et l'OSM ont une action indirecte sur la différenciation ostéoclastique, nous avons recherché s'il en était de même pour l'IL-31. Pour cela, un test d'ostéoclastogenèse utilisant des cellules de la moelle osseuse de souris (comme source de précurseurs ostéoclastiques) associées à des cellules de calvaria de souris (comme source d'ostéoblastes) a été réalisé comme précédemment décrit (Richards et al., 2000). Nous avons observé que seul RANKL permet la formation d'ostéoclastes à partir de cellules de la moelle osseuse en l'absence de cellules de calvaria. Cet effet de RANKL n'est pas modifié par l'ajout de cellules de calvaria. Cela nous a également permis de confirmer que, comme la vitamine D3, l'OSM et l'IL-6 augmentent la différenciation ostéoclastique uniquement lorsqu'une coculture de cellules de moelle osseuse et de cellules de calvaria est utilisée. L'IL-31 semble aussi avoir un effet stimulateur mais non significatif sur la formation d'ostéoclastes en présence de cellules de calvaria (figure 3C). L'OSM et l'IL-6 ont donc un effet stimulateur indirect sur la différenciation ostéoclastique vraisemblablement en induisant la production de RANKL par les cellules de calvaria comme cela a déjà été mis en évidence (Palmqvist et al., 2002). L'IL-31 pourrait également agir de façon indirecte sur la formation des ostéoclastes mais plus faiblement que l'OSM et l'IL-6. Pour confirmer cela, il sera nécessaire de déterminer si l'IL-31 peut induire la production de RANKL par les cellules ostéoblastiques.

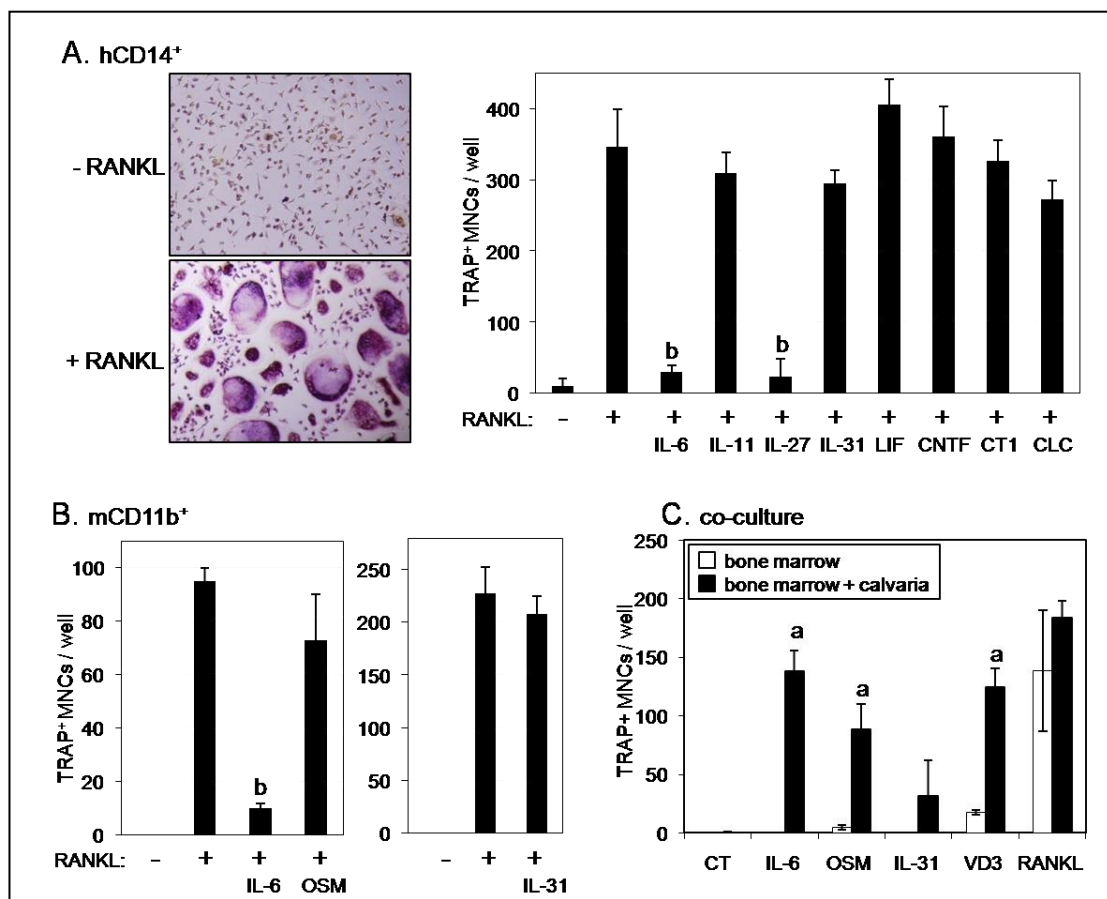


Figure 3 : Effets des cytokines de la famille de l'IL-6 sur la différenciation ostéoclastique.

Les tests d'ostéoclastogenèse sur les monocytes humains CD14<sup>+</sup> et murins CD11b ainsi que dans un système de co-culture moelle osseuse / calvaria de souris ont été réalisés selon les protocoles décrits dans le matériel et méthodes.

A : Photos de cellules mono et multinucléées après coloration TRAP mettant en évidence les ostéoclastes. Comptage du nombre de cellules multinucléées TRAP<sup>+</sup> (TRAP<sup>+</sup> MNCs) après 14 jours de culture en présence de hM-CSF, de hRANKL et des cytokines indiquées (100 ng/mL).

B : Comptage du nombre de cellules multinucléées TRAP<sup>+</sup> (TRAP<sup>+</sup> MNCs) après 14 jours de culture en présence de mM-CSF, de hRANKL et des cytokines indiquées (100 ng/mL).

C : Comptage du nombre de cellules multinucléées TRAP<sup>+</sup> (TRAP<sup>+</sup> MNCs) après 14 jours de culture en présence des traitements indiqués.

Le nombre de cellules multinucléées est présenté sous forme de moyenne  $\pm$  s.d. (n = 3). Pour les figures A et B : b,  $p \leq 0,001$  par rapport à RANKL seul. Pour la figure C : a,  $p \leq 0,05$  par rapport à la moelle osseuse seule.

### **Toxicité associée à l'AdOSM, AdIL-31 et AdIL-6.**

Les cytokines de la famille de l'IL-6 et plus particulièrement, l'IL-6 et l'OSM, sont capables de contrôler la différenciation et l'activité des ostéoblastes et des ostéoclastes grâce à une variété de mécanismes complexes, parfois contradictoires. Les expérimentations *in vitro* semblent montrer que l'IL-31, quant à elle, n'a pas d'effet direct sur la différenciation ostéoblastique et ostéoclastique. Cependant, un effet indirect de cette cytokine sur l'ostéoclastogenèse est possible, comme suggéré par les expériences de co-culture entre moelle osseuse et calvaria. C'est pourquoi, afin d'étudier son éventuel rôle indirect sur le remodelage osseux et de mieux comprendre l'action de l'OSM et de l'IL-6 sur le tissu osseux, ces trois cytokines ont été administrées sous forme d'adénovirus à des souris.

Tout d'abord, des doses croissantes ( $5.10^7$  à  $5.10^8$  PFU) d'AdGFP, d'AdOSM, d'AdIL-31 ou d'AdIL-6 ont été injectées dans le muscle tibial antérieur (i.m.) de souris. La toxicité a été évaluée par le suivi de la mortalité et du poids des animaux trois fois par semaine. Cela a permis de constater que l'injection intramusculaire d'AdIL-31 et d'AdIL-6 n'entraîne aucune mortalité. En revanche, l'injection intramusculaire d'AdOSM est toxique de manière dose-dépendante : nulle avec l'injection  $5.10^7$  PFU, la mortalité atteint 25% avec  $5.10^8$  PFU après 7 jours (figure 4A). De plus, seul l'AdOSM est associé à une perte de poids dose-dépendante des animaux 2 jours après l'injection, en corrélation avec une diminution de l'activité phosphatase alcaline sérique après 7 jours (figure 4A). De plus, l'expression des transcrits OSM, IL-31 et IL-6 a pu être vérifiée par RT-PCR 7 jours après les injections sur les ARN extraits du muscle injecté (données non montrées).

Des doses croissantes ( $5.10^7$  à  $5.10^8$  PFU) d'AdGFP, d'AdOSM ou d'AdIL-31 ont également été injectées dans le fût médullaire du tibia gauche (i.o.) de souris et la toxicité a été évaluée comme précédemment. Nous avons alors observé que l'injection intra-osseuse d'AdOSM est associée à une toxicité de manière dose-dépendante et plus importante que suite à l'injection intramusculaire puisque la mortalité atteint 100% avec  $5.10^8$  PFU. De nouveau, cette toxicité se traduit par une perte de poids des animaux 2 jours après l'injection ainsi qu'une diminution de l'activité phosphatase alcaline après 7 jours (figure 4B). L'injection d'AdIL-31 n'est pas toxique même à la plus forte dose puisqu'elle n'est pas associée à une mortalité des animaux ni à une perte de poids ou une diminution de l'activité phosphatase alcaline (figure 4B).

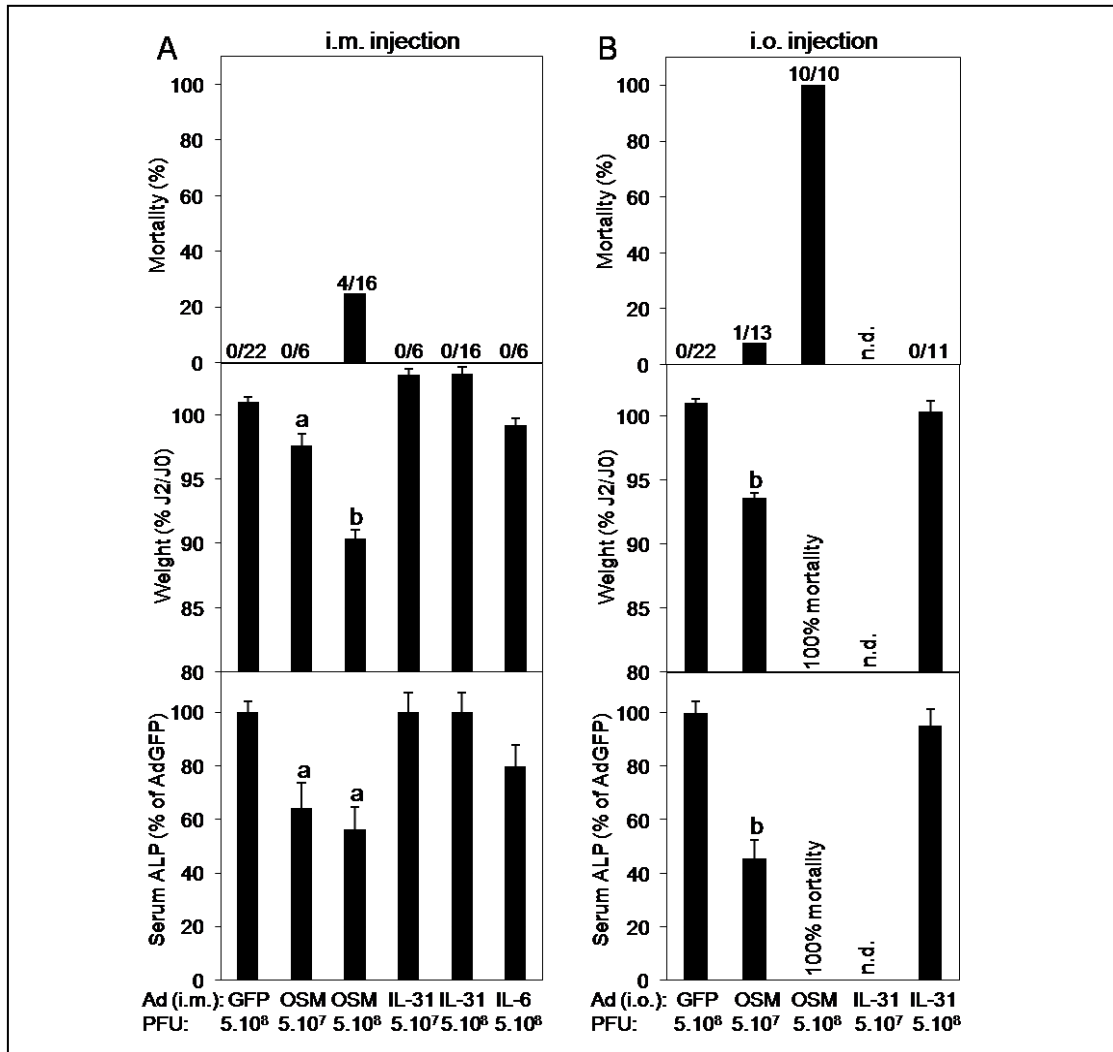


Figure 4 : toxicité associée à l'AdOSM, AdIL-31 et AdIL-6.

A : Des doses croissantes ( $5.10^7$  à  $5.10^8$  PFU) d'AdGFP, AdOSM, AdIL-31 ou AdIL-6 ont été injectées dans le muscle tibial antérieur (i.m.) comme indiqué. La toxicité a été évaluée par le suivi de la mortalité et du poids des animaux trois fois par semaine. La mortalité globale est présentée ici à J7 post-injection. Le poids des animaux est ici présenté en % du poids à J2 post-injection / J0. L'ALP a également été dosée dans les sérums prélevés à J7 et est présentée en % du contrôle AdGFP.

B : Les adénovirus ont été injectés en intra-tibial (i.o.) comme indiqué. La toxicité a été évaluée comme décrit en A.

Pour la mortalité, l'incidence globale sur toutes les expérimentations est présentée (n compris entre 6 et 22). Pour le poids et l'ALP, les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  s.e.m. ( $6 \leq n \leq 22$ ). a,  $p \leq 0,05$ ; b,  $p \leq 0,001$  vs. AdGFP. n.d.: non réalisé.

## **Effets de l'AdOSM, l'AdIL-31 et l'AdIL-6 sur le tissu osseux**

Afin d'évaluer l'impact de ces trois cytokines sur l'architecture osseuse, le tibia gauche des animaux a été prélevé 7 jours après injection des adénovirus et analysé par microscanner.

Seule l'IL-31 à  $5.10^8$  PFU modifie significativement l'architecture osseuse après injection intramusculaire. En effet, les mesures du volume osseux trabéculaire des tibias (BV/TV, figure 5A et 5E) montrent qu'en présence d'IL-31, ce volume trabéculaire est significativement réduit. Alors que l'épaisseur des travées (Tb.Th) n'est pas modifiée de façon significative par l'IL-31 (figure 5C), le nombre de ces travées (Tb.N) est significativement diminué (figure 5D). L'injection intramusculaire d'AdOSM semble également réduire légèrement le volume osseux trabéculaire mais de façon non significative alors que l'IL-6 n'a pas d'effet (figure 5A).

Suite à l'injection intra-osseuse, aucune cytokine n'est capable de réduire le volume osseux trabéculaire. Au contraire, l'OSM augmente ce volume osseux trabéculaire (figure 5B et 5E) en corrélation avec une augmentation de l'épaisseur des travées osseuses (figure 5C) sans modification du nombre de ces travées (figure 5D). De plus, aucune différence n'a été observée au niveau de la corticale osseuse quelque soit le mode d'injection. Ces résultats indiquent que l'IL-31 et l'OSM ont des effets différents sur le remodelage osseux trabéculaire. De plus, l'effet de ces cytokines semble dépendre de la dose ainsi que du mode d'injection des adénovirus.

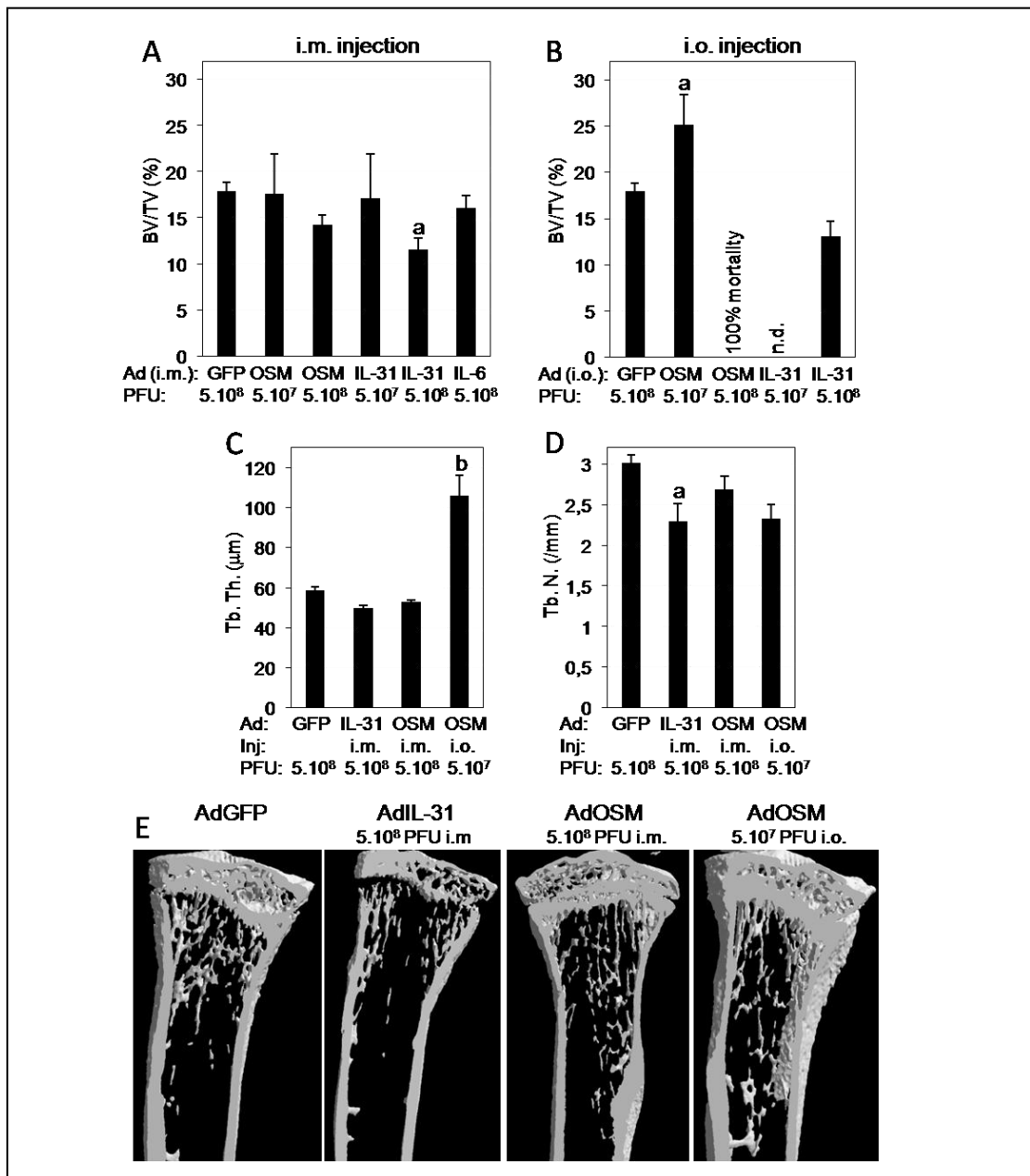


Figure 5 : effets de l'AdOSM, AdIL-31 et AdIL-6 sur le tissu osseux.

Les tibias ont été prélevés 7 jours après les injections indiquées et analysés par micro-scanner.

A et B : volume osseux/volume total trabéculaire (BV/TV).

C : épaisseur des travées osseuses (Tb. Th.).

D : nombre des travées osseuses (Tb. N.).

E : coupes longitudinales représentatives des tibias.

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  s.e.m. ( $3 \leq n \leq 10$ ). a,  $p \leq 0,05$ ;

b,  $p \leq 0,001$  vs. AdGFP. n.d.: non réalisé.

## **Effets de l'AdOSM et l'AdIL-31 sur les cellules osseuses**

Afin de comprendre les mécanismes impliqués dans la perte osseuse trabéculaire observée suite à l'injection intramusculaire d'AdIL-31, le fémur gauche des souris prélevé 7 jours après l'injection a été analysé par histomorphométrie. Le marquage phosphatase alcaline, spécifique des ostéoblastes, a révélé que l'IL-31 et l'OSM n'ont pas d'effet significatif sur la surface ostéoblastique trabéculaire (figure 6A). Cependant, bien que nous ne l'ayons pas quantifié, nous avons pu observer qu'en présence d'OSM, la quantité d'ostéoblastes semble être augmentée au niveau de l'épiphyse du fémur (figure 6A, flèche) alors qu'aucune différence ne semble apparaître suite à l'injection d'AdIL31. Le marquage TRAP, spécifique des ostéoclastes, a permis de mettre en évidence une augmentation significative de la surface ostéoclastique trabéculaire suite à l'injection d'AdIL-31 alors que l'AdOSM n'a pas d'effet significatif (figure 6B). Cela pourrait expliquer, au moins en partie, la perte osseuse trabéculaire induite suite à l'injection intramusculaire d'AdIL-31. Cette analyse devra néanmoins être confirmée sur un nombre plus important d'animaux et également être réalisée suite à l'injection intra-osseuse des adénovirus.

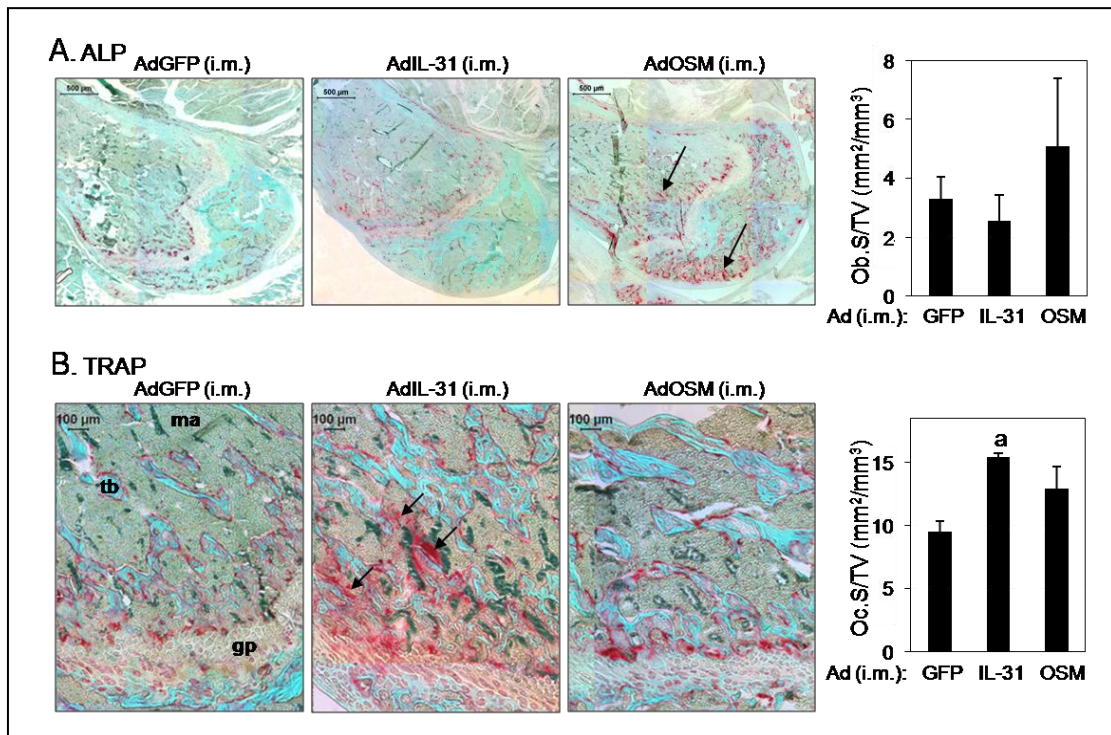


Figure 6 : effets de l'AdOSM et AdIL-31 sur les cellules osseuses.

Les fémurs ont été prélevés 7 jours après les injections indiquées ( $5 \cdot 10^8$  PFU) et analysés par histomorphométrie.

A : images représentatives après marquage ALP des ostéoblastes et quantification de la surface ostéoblastique trabéculaire (Ob.S/TV).

B : images représentatives après marquage TRAP des ostéoclastes et quantification de la surface ostéoclastique trabéculaire (Oc.S/TV).

gp: growth plate; tb: trabecular bone; ma: marrow. Les flèches indiquent des zones denses en ostéoblastes et ostéoclastes respectivement.

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  s.e.m. (n = 4 dans chaque groupe). a,  $p \leq 0,05$  vs. AdGFP.



## Discussion / conclusion

Cette étude nous a permis de mettre en évidence que bien que les cytokines de la famille de l'IL-6 partage des sous-unités réceptrices communes, ces cytokines ont des effets propres à chacune d'entre elles, en particulier au niveau du tissu osseux. En effet, l'IL-31 a une action différente de l'OSM et de l'IL-6 sur le remodelage osseux. Dans nos études *in vitro*, seules l'IL-6, l'IL-27 et l'OSM montrent des activités sur les cellules osseuses.

Tout d'abord, les cytokines de la famille de l'IL-6 contrôlent la différenciation et l'activité des ostéoblastes grâce à une variété de mécanismes. L'OSM est la cytokine la plus active sur la différenciation ostéoblastique puisqu'elle stimule fortement la formation d'ostéoblastes à partir des MSC, comme précédemment montré (Chipoy et al., 2004). En effet, les MSC possèdent les chaînes réceptrices nécessaires à la transduction des signaux médiés par l'OSM et l'IL-6 (gp130, OSMR et IL-6R) mais pas par l'IL-31. Cependant, seule l'OSM induit une phosphorylation importante du facteur de transcription STAT3 dans ces cellules. A l'inverse, bien que les MSC possèdent les chaînes réceptrices gp130 et IL-6R, l'IL-6 seule n'a pas d'effet direct sur la différenciation ostéoblastique contrairement à l'OSM et l'IL-6 associée à son récepteur soluble qui sont capables de favoriser la formation d'ostéoblastes (Chipoy et al., 2004; Erices et al., 2002; Malaval et al., 2005). De plus, nous n'avons détecté qu'une faible activation de STAT3 par l'IL-6 indiquant que la quantité d'IL-6R exprimé à la surface de ces cellules est faible, comme montré précédemment (Erices et al., 2002) et sans doute insuffisante pour stimuler leur différenciation en ostéoblastes. Il serait donc nécessaire d'associer l'IL-6 à son récepteur soluble pour augmenter l'activation de STAT3 et donc la réponse à cette cytokine. Enfin, les MSC n'exprimant pas gp1, l'IL-31 n'est pas capable de transduire un signal dans ces cellules et n'a par conséquent aucun effet direct sur la différenciation ostéoblastique.

L'ajout de monocytes ne modifie pas l'action de ces cytokines indiquant que l'OSM et l'IL-6 associée à son récepteur soluble n'ont qu'un effet direct sur les MSC alors que l'IL-31 et l'IL-6 seule n'agissent ni sur les MSC ni sur les monocytes pour favoriser la différenciation ostéoblastique. Les cytokines de la famille de l'IL-6 ne semblent donc pas avoir les mêmes effets stimulateurs indirects sur la formation des ostéoblastes que RANKL ou les LPS. Cependant, nous n'avons utilisé que des monocytes comme source de cellules hématopoïétiques. Il serait donc intéressant d'étudier l'effet de ces cytokines sur la différenciation ostéoblastique en présence de lymphocytes par exemple. En effet, l'IL-6 est

déjà connue pour favoriser la différenciation des lymphocytes Th17 (Veldhoen et al., 2006). L'IL-17 alors produite par ces lymphocytes différenciés est capable d'augmenter l'expression de la phosphatase alcaline et la formation de nodules minéralisés par les MSC humaines, indiquant une stimulation de la différenciation ostéoblastique (Huang et al., 2009). De plus, l'effet indirect des autres cytokines de cette famille sur la formation des ostéoblastes devra être déterminé.

Les cytokines de la famille de l'IL-6 sont également très actives sur la différenciation ostéoclastique soit en agissant directement sur les précurseurs ostéoclastiques soit en induisant la production de RANKL par les ostéoblastes. Nous avons observé qu'aucune des cytokines de cette famille n'exerce d'effet stimulateur direct sur la différenciation des monocytes en ostéoclastes. En revanche, comme cela a déjà été montré, l'IL-6 et l'IL-27 inhibent la différenciation ostéoclastique. Cet effet de l'IL-6 peut être corrélé à l'expression des chaînes réceptrices gp130 et IL-6R et à une forte activation de STAT3 dans les monocytes humains et murins. Récemment, il a été montré que cette action inhibitrice directe de l'IL-6 permet de limiter, *in vivo*, la formation d'ostéoclastes et la perte osseuse inflammatoire induite par des particules de titane (Darowish et al., 2009). De même, l'IL-27 joue un rôle anti-inflammatoire et réduit l'ostéolyse dans un modèle d'arthrite (Furukawa et al., 2009). L'OSM et l'IL-31 n'ont quant à elles pas d'effet direct sur la différenciation ostéoclastique puisque ces deux cytokines n'activent pas ou très peu STAT3 dans les monocytes humains et murins. En effet, si les monocytes humains CD14<sup>+</sup> n'expriment pas OSMR et donc ne semblent pas capables de répondre à l'OSM et à l'IL-31, les cellules CD11b<sup>+</sup> murines possèdent les chaînes réceptrices nécessaires à la fixation de ces deux cytokines. Cependant, il est possible qu'une stimulation de ces cellules permette l'expression des chaînes réceptrices non détectées dans les cellules CD14<sup>+</sup>. En effet, Dillon et ses collaborateurs ont montré que bien qu'indétectable dans les monocytes frais issus du sang périphérique, l'ARNm humain gp1 est augmenté dans ces cellules lorsqu'elles sont cultivées en présence d'IFN $\gamma$ . De même, l'expression de la chaîne OSMR peut être induite dans les monocytes après traitement aux LPS (Dillon et al., 2004). Il semble donc que certains monocytes, en fonction de leur état de stimulation, soient capables de répondre à l'IL-31. C'est pourquoi, il serait intéressant d'analyser l'expression des chaînes réceptrices de l'IL-31 après stimulation de nos cellules (par MCSF, RANKL, IL-31), en particulier des monocytes humains CD14<sup>+</sup>.

Nous avons réalisé un test d'ostéoclastogenèse sur une co-culture cellules de la moelle osseuse (source de précurseurs ostéoclastiques) / cellules de calvaria (source d'ostéoblastes) de souris pour étudier l'effet indirect de ces trois cytokines sur la formation des ostéoclastes.

En présence de cellules ostéoblastiques, l'IL-6, l'OSM et dans une moindre mesure, l'IL-31 sont capables de stimuler la formation d'ostéoclastes vraisemblablement en induisant la production de RANKL par les cellules de calvaria comme cela a déjà été mis en évidence (Palmqvist et al., 2002).

Ces résultats confirment que les cytokines de la famille de l'IL-6 sont très actives sur le remodelage osseux *in vitro*. En effet, l'OSM augmente fortement la différenciation ostéoblastique alors que l'IL-6 seule n'a pas d'effet. A l'inverse, si l'OSM n'a pas d'effet direct sur la différenciation ostéoclastique, l'IL-6 l'inhibe fortement. En revanche, ces deux cytokines sont capables de stimuler la formation d'ostéoclastes si des cellules ostéoblastiques sont présentes. *In vitro*, l'IL-31 semble beaucoup moins active sur les cellules osseuses que l'OSM et l'IL-6. En effet, elle n'est pas capable de moduler la différenciation ostéoblastique et son action sur la différenciation ostéoclastique est très faible et uniquement indirecte.

Afin de confirmer un éventuel rôle indirect de l'IL-31 sur le remodelage osseux et de mieux comprendre l'action de l'OSM et de l'IL-6 sur le tissu osseux, ces trois cytokines ont été administrées sous forme d'adénovirus à des souris mâles âgées de 8 semaines. Cette étude préliminaire a permis de confirmer que ces cytokines agissent de façon différente *in vivo*. Tout d'abord, l'OSM est la plus toxique de ces cytokines quelque soit le mode d'injection puisque son administration est associée à une mortalité avec les plus fortes doses d'adénovirus et une perte de poids, comme précédemment observé chez le rat (Brounais et al., 2008a). Cependant, cette toxicité peut être gérée en diminuant les doses d'AdOSM. L'IL-31 et l'IL-6 sont mieux tolérées même aux plus fortes doses. Il serait intéressant de doser ces trois cytokines au niveau sérique pour voir si la différence de toxicité est liée à une quantité produite différente. Malheureusement, il n'existe pour l'instant aucun kit ELISA pour l'OSM ou l'IL-31 murines.

L'activité phosphate alcaline est diminuée en présence d'OSM, en corrélation avec la perte de poids. Etant donné que nous dosons l'activité phosphatase alcaline sérique totale, il semblerait que cette diminution soit plus liée à une toxicité hépatique et donc une diminution de l'activité phosphatase alcaline hépatique qu'à une diminution de l'activité phosphatase alcaline osseuse. Un dosage d'autres marqueurs ostéoblastiques (ALP osseuse, ostéocalcine, études en cours) et/ou l'analyse histologique (voir ci-dessous) pourrait donner des renseignements sur l'action de ces cytokines sur l'activité des ostéoblastes.

Bien que l'IL-31 ne soit que très peu active sur les cellules osseuses *in vitro*, seule l'AdIL-31 à  $5.10^8$  PFU modifie l'architecture osseuse après injection intramusculaire

puisque'une réduction significative du volume osseux trabéculaire est observée. Cet effet est lié à une diminution du nombre de travées osseuses, leur épaisseur n'étant pas modifiée de façon significative par l'IL-31. Les analyses histomorphométriques ont montré que l'IL-31 ne modifie pas la surface ostéoblastique trabéculaire mais augmente significativement la surface ostéoclastique. Cette augmentation du nombre d'ostéoclastes pourrait être à l'origine, au moins en partie, de la perte osseuse trabéculaire induite par l'AdIL-31. Cependant, les expérimentations *in vitro* ne nous ont pas permis de déterminer par quel mécanisme l'IL-31 pouvait augmenter l'activité ostéoclastique. Etant donné que cette cytokine n'est que très peu active sur les cellules osseuses, il est possible qu'elle agisse de manière indirecte sur le remodelage osseux. Dans ce sens, nous avons observé une légère stimulation de l'ostéoclastogenèse dans des co-cultures entre moelle osseuse et calvaria, mais de très nombreux types cellulaires différents sont alors présents. Il serait donc intéressant de déterminer les cibles de l'IL-31 *in vivo* responsables de la perte osseuse trabéculaire observée. De plus, cet effet de l'IL-31 n'est pas retrouvé suite à l'injection intra-osseuse de l'AdIL-31. Cela confirmerait l'hypothèse d'un effet indirect nécessitant une production systémique de cette cytokine. Actuellement, l'hypothèse d'une cible monocytaire (voir ci-dessus) ou lymphocytaire est la plus intéressante.

L'injection intramusculaire d'AdOSM semble également réduire légèrement le volume osseux trabéculaire mais de façon non significative, contrairement à ce qui avait été observé chez le rat où la perte osseuse était plus importante (Brounais et al., 2008a). Cependant, l'injection d'AdOSM avait été réalisée chez des rats plus jeunes (pré-pubères) avec, par conséquent, un modelage et un remodelage osseux plus intense. Une analyse des effets de l'OSM sur la plaque de croissance et le modelage osseux est maintenant nécessaire. Nous pouvons donc penser que chez la souris adulte de 8 semaines, la faible perte osseuse observée est plus liée à une toxicité de l'OSM et une inflammation généralisée qu'à un effet direct de cette cytokine sur les cellules osseuses. Des analyses complémentaires sont donc nécessaires : effet de l'OSM à plus long terme, sur des souris pré-pubères, analyse plus précise de la toxicité sur le foie, le système nerveux...

Au contraire, l'injection intra-osseuse d'AdOSM est à l'origine d'une augmentation du volume osseux trabéculaire associée à une augmentation de l'épaisseur des travées osseuses. Cet effet pourrait être dû à une production locale d'OSM plus importante. Cette cytokine, alors directement au contact des précurseurs ostéoblastiques serait capable de stimuler leur différenciation en ostéoblastes matures et ainsi la formation osseuse. Cette stimulation de la différenciation ostéoblastique serait plus importante que l'effet indirect de l'OSM sur la

formation des ostéoclastes, induisant ainsi une augmentation du volume osseux trabéculaire. Cette hypothèse devra être confirmée par analyse histomorphométrique. De plus, cet effet local de l'OSM confirme les résultats obtenus par de Hooge et ses collaborateurs. En effet, l'injection d'un adénovirus codant l'OSM murine au niveau du genou de souris induit une inflammation localisée mais également une formation osseuse associée à la présence de plusieurs couches de cellules de type ostéoblastique (de Hooge et al., 2002).

Les premières expérimentations réalisées avec l'AdIL-6, injecté en intra-musculaire, ne montrent aucun effet de cette cytokine, bien qu'elle soit active, *in vitro*, sur les cellules osseuses. Cependant, comme pour l'OSM, il se peut que la production d'IL-6 au niveau du tissu osseux soit trop faible. Il est donc nécessaire de ré-évaluer son action suite à une injection intra-osseuse d'AdIL-6. Il est également possible que l'utilisation du récepteur soluble de l'IL-6 soit nécessaire pour observer un effet *in vivo* sur les cellules osseuses, comme nous l'avons montré *in vitro*, en particulier lors de la différenciation ostéoblastique. Il serait donc intéressant d'étudier l'effet de la protéine de fusion, Hyper-IL-6, associant l'IL-6 à son récepteur soluble. En effet, cette protéine est 100 fois plus active sur les hépatocytes pour induire la production des protéines de la phase aigüe de l'inflammation *in vivo*, car ces cellules expriment plus de gp130 que de IL-6R à leur surface (Peters et al., 1998a). Elle devrait, par conséquent, être également active sur les autres types cellulaires exprimant peu ou pas IL-6R comme les MSC.

En conclusion, ces résultats préliminaires confirment que les cytokines de la famille de l'IL-6 ont des activités différentes sur le remodelage osseux. *In vivo*, l'IL-31, après injection intra-musculaire, réduit le volume osseux trabéculaire en association avec une augmentation de l'activité des ostéoclastes. A l'inverse, l'OSM, lorsqu'elle est produite localement, augmente le volume osseux trabéculaire. Ces résultats pourraient nous permettre de mieux comprendre les pathologies ostéolytiques inflammatoires et le rôle potentiel de l'IL-31 dans l'arthrite rhumatoïde par exemple doit maintenant être analysé.

# **CONCLUSION GENERALE**

## Rôle de l'OSM

Le tissu osseux est un tissu conjonctif complexe en perpétuel remaniement, reposant sur l'équilibre de deux mécanismes: la formation et la résorption osseuse. Tout déséquilibre entre ces processus est à l'origine de pathologies qui peuvent être ostéocondensantes ou ostéolytiques, bénignes ou malignes. L'ostéosarcome est une tumeur maligne caractérisée par l'élaboration d'os ou de substance ostéoïde par les cellules tumorales (Schajowicz, 1993). Les traitements actuels, qui consistent en une résection chirurgicale de la tumeur et en une polychimiothérapie (associant principalement le méthotrexate, le cisplatine, la doxorubicine et l'ifosfamide), ont permis d'améliorer les taux de survie des patients. Mais la forte toxicité des molécules de chimiothérapie utilisées, souvent mal tolérées chez les jeunes patients, dont la médiane d'âge est de 18 ans, ainsi que le mauvais pronostic associé à la détection de métastases pulmonaires, font qu'il est nécessaire de développer de nouvelles thérapies des ostéosarcomes.

L'OSM est une cytokine de la famille de l'IL-6 initialement identifiée par sa capacité à inhiber la prolifération tumorale des cellules de la lignée de mélanome A375. De plus, de nombreuses études ont démontré un effet anti-prolifératif de l'OSM, notamment sur des lignées cellulaires issues de tumeurs solides comme le mélanome (Horn et al., 1990), le cancer du sein (Grant and Begley, 1999), le gliome (Halfter et al., 1998), l'hépatocarcinome (Klausen et al., 2000) ou l'ostéosarcome (Bellido et al., 1997), faisant de cette cytokine un candidat intéressant pour l'élaboration de nouveaux traitements de l'ostéosarcome. La première partie de ce travail de thèse a donc consisté à étudier les effets de l'OSM sur la prolifération, la différenciation et la viabilité des cellules tumorales issues d'ostéosarcomes mais aussi des cellules osseuses saines environnantes.

Nous avons tout d'abord analysé les effets de l'OSM sur la viabilité des cellules osseuses tumorales ou non. Il est apparu que cette cytokine a la capacité de sensibiliser les cellules d'ostéosarcomes, mais également d'autres types de cellules tumorales (issues de carcinomes coliques ou mammaires par exemple), à l'apoptose induite par divers agents de mort, tels que la Staurosporine, les UV ou la privation de sérum. Cet effet sensibilisateur est médié par une augmentation du ratio Bax / Bcl-2, et nécessite l'activation des facteurs de transcription p53 et STAT5. Le rôle crucial de p53 dans l'effet pro-apoptotique de l'OSM est appuyé par le fait qu'aucune cellule ayant une p53 déficiente (nulle ou mutée), n'est sensible à l'apoptose induite par l'OSM et la Sts. Malheureusement, environ 50% des ostéosarcomes

humains présentent une p53 déficiente, ce qui crée une résistance innée à cette combinaison OSM+Sts. L'objectif serait alors de réinduire une protéine p53 fonctionnelle dans ces cellules tumorales afin de les sensibiliser à ce traitement. Nos premiers tests dans ce sens ont échoué car la sur-expression de p53 entraîne rapidement la mort des cellules d'ostéosarcome. Un système de production inductible devra sans doute être utilisé.

L'induction d'apoptose observée avec la combinaison OSM+Sts a conduit à l'élaboration d'un protocole d'expérimentation animale utilisant le modèle d'ostéosarcome de rat OSRGA correspondant à la lignée cellulaire testée *in vitro*. L'OSM associé à un analogue de la Sts, le Midostaurin (Novartis Pharma), est capable de prévenir la progression de la tumeur primaire alors que ces agents seuls n'ont pas d'effet sur le développement tumoral. Cette bithérapie originale associant une cytokine pro-inflammatoire à un inhibiteur de kinases limite également le développement des métastases pulmonaires, bien que l'OSM possède certaines caractéristiques pro-métastatiques (perte d'adhésion des cellules, augmentation de la migration, l'effet sur l'angiogenèse n'ayant pas été étudié). En fait, cet effet anti-tumoral sur la tumeur primaire et sa dissémination métastatique semble être dû à une stimulation de l'apoptose dans les cellules cancéreuses. En effet, une augmentation de la nécrose et de la fibrose au niveau de la tumeur est observée lorsque ces deux agents sont associés. L'OSM sensibilise également les cellules OSRGA à l'apoptose induite par la doxorubicine et le cisplatine, deux agents de chimiothérapie connus pour induire la mort de cellules issues d'ostéosarcome via p53 et la voie apoptotique mitochondriale (Ganjavi et al., 2006; Siddik, 2003).

L'OSM possède donc des propriétés particulières qui en font un agent potentiel de thérapie des ostéosarcomes. Cependant, cette molécule présente une toxicité élevée empêchant toute utilisation à forte dose. Dans le futur, il est probable que la combinaison de différentes approches thérapeutiques constitue le meilleur traitement des ostéosarcomes. Ainsi, une association entre l'OSM et une molécule de chimiothérapie "classique" utilisée à faible dose pourrait constituer une thérapie prometteuse des ostéosarcomes présentant une p53 sauvage. Une meilleure gestion des effets indésirables de l'OSM passera sans doute par une meilleure connaissance de sa toxicité (hépatique, rénale, système nerveux ?) et par une administration plus locale, utilisant par exemple des perfusions loco-régionales ou le ciblage de l'os ou des cellules tumorales. Dans ce sens, les perfusions de membres avec le TNF $\alpha$  ont montré une diminution importante de la toxicité tout en gardant l'effet anti-cancéreux de cette cytokine (Lejeune et al., 2006). De même, des nanoparticules couplées à des anticorps



spécifiques permettent maintenant d'apporter une protéine thérapeutique à une cellule donnée (Singh and Lillard, 2009). On peut noter également qu'une thérapie génique utilisant un promoteur spécifique du tissu osseux est théoriquement envisageable.

Il serait également possible d'administrer l'OSM en combinaison avec une molécule anti-résorptive, limitant la perte de substance osseuse associée à l'ostéosarcome. En effet, étant donné que les tumeurs osseuses sont caractérisées par l'existence d'un cercle vicieux entre prolifération tumorale et résorption osseuse, de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant les molécules impliquées dans la résorption osseuse sont actuellement en développement. Une récente revue fait état de l'avancement des recherches sur les molécules impliquées dans la différenciation et l'activité des ostéoclastes et leur rôle dans l'ostéolyse maligne associée aux cancers (Brounais et al., 2009, en annexe). Brièvement, l'élucidation des mécanismes d'action de la molécule pro-résorptive RANKL et son interaction avec son récepteur RANK et son récepteur leurre OPG a permis l'élaboration d'inhibiteurs pharmacologiques de RANKL. Ainsi, un anticorps monoclonal anti-RANKL, nommé Denosumab (Amgen), est actuellement en essais cliniques pour le traitement des pathologies osseuses associées au cancer. De même, des peptides mimétiques de l'OPG ont récemment été développés afin de limiter l'ostéolyse maligne. Enfin, le blocage de la résorption osseuse par des agents spécifiques tels que les bisphosphonates, les inhibiteurs de la cathepsine K ou des voies de signalisation activées lors de la différenciation et l'activation des ostéoclastes est également une stratégie prometteuse pour le traitement des ostéosarcomes.

Les ostéosarcomes représentent la majorité des tumeurs osseuses primitives, qui regroupent également les sarcomes d'Ewing (dérivant des MSC) et les chondrosarcomes (dérivant des chondrocytes). Ces sarcomes osseux sont proches des ostéosarcomes de par leur origine cellulaire et pourraient répondre à l'OSM d'une façon similaire. L'étude de ces cancers *in vitro* et dans des modèles pré-cliniques a été initiée au laboratoire et indique que si les chondrosarcomes se comportent de la même façon que les ostéosarcomes vis-à-vis de l'OSM, le développement des sarcomes d'Ewing pourrait être quant à lui stimulé par cette cytokine.

Avant d'envisager l'utilisation de l'OSM comme potentiel agent thérapeutique dans le cadre de l'ostéosarcome, il était nécessaire de préciser son rôle sur le remodelage osseux et plus particulièrement sur la différenciation ostéoblastique. Nous avons montré pour la première fois qu'un traitement à long terme avec l'OSM semble induire un phénotype

ostéocytaire dans les cellules d'ostéosarcome et de calvaria de rat. Ainsi, des changements morphologiques (formes allongées et/ou étoilées), l'induction de plusieurs marqueurs ostéocytaires tels que la sclérostine, Phex et/ou E11 et l'expression d'hémi-canaux fonctionnels, ont été observés à des taux variables selon les modèles cellulaires, et plus particulièrement sur les cellules de calvaria. Ces résultats suggèrent que les cellules ostéoblastiques normales seraient capables d'atteindre un stade ostéocytaire plus avancé que les cellules transformées et pourraient donc représenter un nouvel outil pour générer des ostéocytes en culture. Ce résultat est important car l'obtention d'ostéocytes en culture pose toujours problème et la biologie de ces cellules est encore mal connue.

La différenciation ostéocytaire est associée à une mort cellulaire programmée puisqu'environ 65% des ostéoblastes meurent par apoptose et seuls 10% à 30% se différencient en ostéocytes (Franz-Odenaal et al., 2006). Or, l'OSM sensibilise les cellules d'ostéosarcome et de calvaria à l'apoptose induite par la Sts. Cet effet pourrait donc être en lien avec l'induction d'une différenciation de type ostéocytaire dans ces cellules.

Il reste à déterminer si l'induction d'une différenciation ostéocytaire par l'OSM a un impact physiologique *in vivo*. Pour cela, il serait intéressant d'évaluer le nombre d'ostéocytes dans les souris déficientes pour l'OSMR ou les souris transgéniques surexprimant l'OSM, afin de déterminer si cette cytokine est nécessaire à la différenciation des ostéoblastes en ostéocytes. Pour le moment, nous ne pouvons qu'émettre des hypothèses aux vues des résultats que nous avons obtenus *in vivo* chez le rat et chez la souris suite à l'injection d'un AdOSM. En effet, chez le rat pré-pubère, la sur-production systémique d'OSM, suite à l'injection intra-musculaire d'AdOSM, induit une diminution du volume osseux trabéculaire en relation avec une réduction des activités ostéoblastiques et ostéoclastiques (mais ces dernières n'ont été analysées qu'indirectement aux niveaux de marqueurs sériques). Il est possible que cet effet inhibiteur de l'OSM sur l'activité ostéoblastique soit en réalité dû, au moins en partie, à la stimulation de la différenciation terminale des ostéoblastes en ostéocytes. Il serait donc intéressant d'analyser les ostéocytes par histomorphométrie suite à un traitement par cette cytokine. De plus, les ostéocytes expriment RANKL mais ne peuvent stimuler l'ostéoclastogénèse que par contact direct avec les précurseurs ostéoclastiques (Zhao et al., 2002). Par conséquent, on peut se demander si les ostéocytes sont capables de soutenir la différenciation ostéoclastique *in vivo*. Dans ce contexte, l'induction d'une différenciation ostéocytaire pourrait être à l'origine d'une diminution de la formation des ostéoclastes, expliquant la perte des marqueurs ostéoclastiques sériques. De même, l'injection intramusculaire d'AdOSM chez la souris pubère semble réduire légèrement le volume osseux

trabéculaire mais de façon non significative. Cette différence pourrait être liée à l'âge des animaux utilisés, et donc à des composantes de croissance et de remodelage osseux différentes, d'autant plus importantes et donc variables que les animaux sont jeunes. Cependant, on peut également penser que les pertes osseuses observées sont plus liées à une toxicité de l'OSM et une inflammation généralisée qu'à un effet direct de cette cytokine sur les cellules osseuses. L'étude des effets de l'OSM sur le tissu osseux par une approche de sur-production systémique se révèle donc très complexe. Des analyses complémentaires sur la toxicité, les doses, la cinétique, l'âge et le sexe des animaux sont nécessaires.

Au contraire de l'injection i.m., l'injection intra-osseuse d'AdOSM chez la souris est à l'origine d'une augmentation du volume osseux trabéculaire. Cet effet pourrait être dû à une production locale d'OSM plus importante, permettant une stimulation de l'ostéogenèse plus forte et donc une formation osseuse accrue. Cette hypothèse doit être confirmée par des analyses histomorphométriques, mais si elle est exacte, elle implique que l'OSM dans ces conditions a un effet plus important sur la formation des ostéoblastes que sur la différenciation ostéocytaire ou ostéoclastique observée *in vitro* et qui ne peuvent que favoriser une perte osseuse. Cependant, il ne s'agit ici que d'une étude préliminaire et nous n'avons pour l'instant émis que des hypothèses concernant le mode d'action de l'OSM. De plus, bien que l'effet local de l'OSM soit le contraire de son effet systémique, les résultats obtenus confirment des données de la littérature. En effet, la surexpression locale de l'OSM au niveau de l'os, soit par méthode adénovirale (de Hooge et al., 2002) soit par transgénèse (Malik et al., 1995), induit une formation osseuse avec augmentation des ostéoblastes. De même, des souris adultes déficientes pour l'OSMR ont un nombre réduit d'ostéoblastes (Walker, 2009). Le rôle majeur de l'OSM semble donc être de stimuler l'ostéogenèse à partir des précurseurs ostéoblastiques comme les MSC. Cependant, cet effet pourrait être masqué ou contre-balancé dans différentes conditions par l'induction de la différenciation ostéocytaire, de la résorption osseuse via la production de RANKL par les ostéoblastes et par la toxicité de cette cytokine à l'origine d'une inflammation généralisée. Concernant les ostéolyses associées au développement des ostéosarcomes, la sur-expression de l'OSM et son effet potentiel sur l'ostéoclastogenèse ne semble pas exacerber le cercle vicieux entre résorption osseuse et prolifération tumorale.

## Rôle de l'IL-31

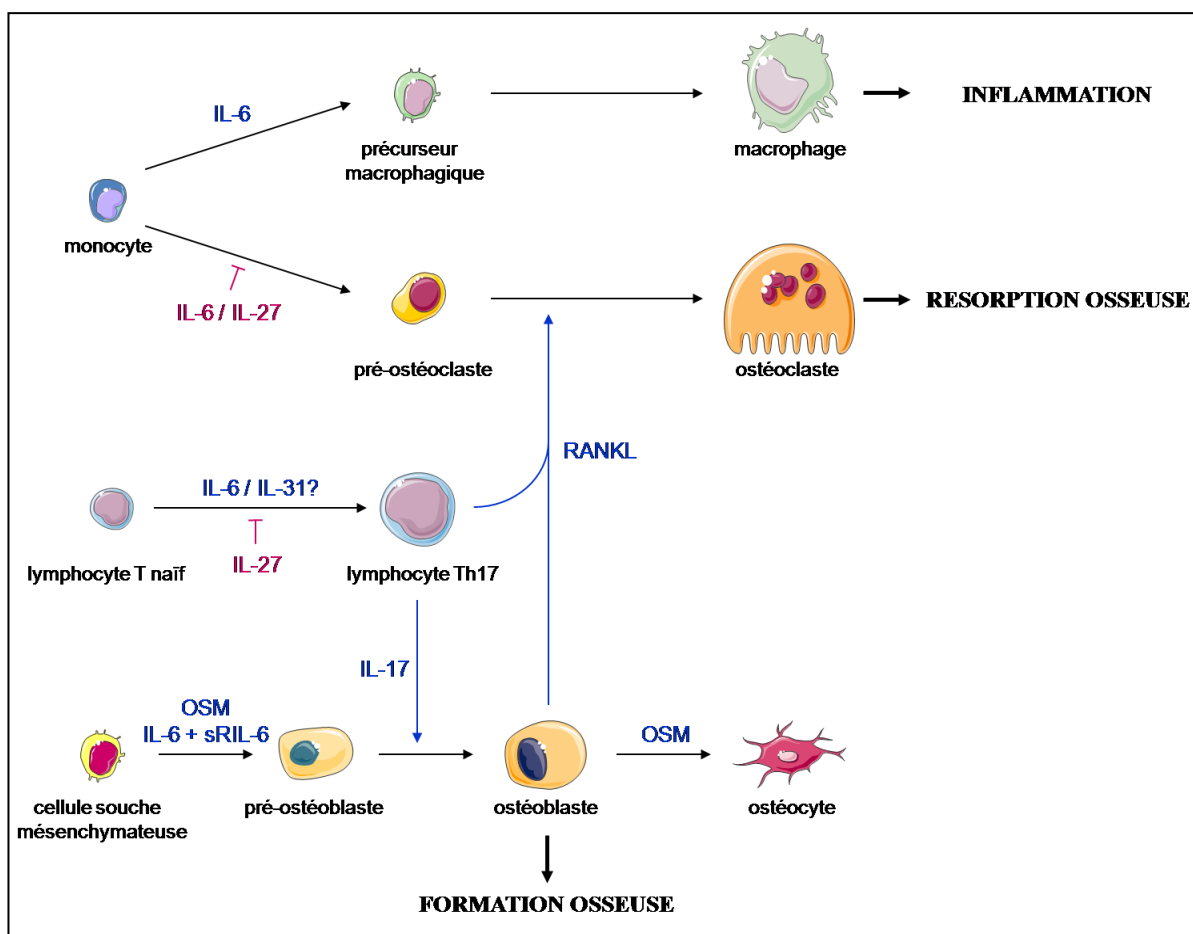
La première partie de ce travail nous a permis de confirmer que l'OSM, comme les autres cytokines de la famille de l'IL-6, est un régulateur important de la physiopathologie osseuse. C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés, dans un second temps, à l'IL-31, une cytokine de la famille de l'IL-6 utilisant la même chaîne réceptrice que l'OSM, et pour laquelle aucune étude sur le tissu osseux n'a été réalisée. Nous avons donc comparé les effets de cette cytokine à ceux de l'IL-6 et de l'OSM sur le remodelage osseux et plus particulièrement sur la différenciation ostéoblastique et ostéoclastique *in vitro* puis *in vivo*.

Cette étude nous a permis de mettre en évidence que les cytokines de la famille de l'IL-6 sont très actives sur le remodelage osseux *in vitro* mais présentent des mécanismes d'action différents. En effet, l'OSM augmente fortement la différenciation ostéoblastique alors que l'IL-6 n'a d'effet qu'en présence de son récepteur soluble. A l'inverse, si l'OSM n'a pas d'effet direct sur la différenciation ostéoclastique, l'IL-6 l'inhibe fortement. En revanche, ces deux cytokines sont capables de stimuler la formation d'ostéoclastes de façon indirecte vraisemblablement en induisant la production de RANKL par les cellules ostéoblastiques (Richards et al., 2000). *In vitro*, l'IL-31 semble beaucoup moins active sur les cellules osseuses que l'OSM et l'IL-6. En effet, elle n'est pas capable de moduler la différenciation ostéoblastique et son action sur la différenciation ostéoclastique est très faible et uniquement indirecte (figure 27).

Afin de confirmer un éventuel rôle indirect de l'IL-31 sur le remodelage osseux et de mieux comprendre l'action de l'OSM et de l'IL-6 sur le tissu osseux, ces trois cytokines ont été administrées sous forme d'adénovirus à des souris mâles âgées de 8 semaines. Cette étude préliminaire a permis de confirmer que ces cytokines agissent de façon différente *in vivo*. Tout d'abord, l'OSM est la plus toxique de ces cytokines quelque soit le mode d'injection. Ensuite, bien que l'IL-31 ne soit que très peu active sur les cellules osseuses *in vitro*, cette cytokine induit une réduction du volume osseux trabéculaire en association avec une augmentation de l'activité des ostéoclastes. Cependant, cet effet de l'IL-31 n'est pas retrouvé lorsque cette cytokine est produite localement. Au contraire, seule la production locale d'OSM entraîne une modification significative de l'architecture osseuse se traduisant par une augmentation du volume osseux trabéculaire. Les premières expérimentations réalisées avec l'AdIL-6, injecté en intra-musculaire, ne montrent aucun effet de cette cytokine, bien qu'elle soit active, *in vitro*, sur les cellules osseuses. Nous n'avons pas encore élucidés les

mécanismes d'action de ces cytokines *in vivo* mais différentes hypothèses peuvent être émises. Tout d'abord, il est possible que la production locale d'OSM et d'IL-6 soit nécessaire à leur action sur les cellules osseuses. Des injections intraosseuses d'AdIL-6 sont donc maintenant nécessaires. Cependant, étant donné que les précurseurs ostéoblastiques expriment peu de récepteurs solubles à l'IL-6, il est également possible que l'utilisation du récepteur soluble de l'IL-6 soit nécessaire pour observer un effet *in vivo* sur les cellules osseuses, comme nous l'avons montré *in vitro*, en particulier lors de la différenciation ostéoblastique. Il serait donc intéressant d'étudier l'effet de la protéine de fusion, Hyper-IL-6, associant l'IL-6 à son récepteur soluble (Peters et al., 1998a). Concernant l'IL-31, les expérimentations *in vitro* ne nous ont pas permis de déterminer par quel mécanisme elle peut augmenter l'activité ostéoclastique. Étant donné que cette cytokine n'est que très peu active sur les cellules osseuses et que la production locale n'a pas d'effet, il est possible qu'elle agisse de manière indirecte sur le remodelage osseux. Il serait donc intéressant de déterminer les cibles de l'IL-31 *in vivo* responsables de la perte osseuse trabéculaire observée. L'IL-6 est capable de favoriser la différenciation des lymphocytes Th17 (Veldhoen et al., 2006) qui vont alors produire de l'IL-17, cytokine connue pour induire la différenciation ostéoblastique (Huang et al., 2009). Les lymphocytes Th17 expriment également RANKL et pourraient donc participer à l'ostéoclastogénèse (Adamopoulos and Bowman, 2008). Enfin, l'IL-31 est déjà connue pour agir sur les lymphocytes, notamment en limitant spécifiquement les réponses inflammatoires de type Th2 (Perrigou et al., 2007). Une première cible de l'IL-31 à étudier serait donc le lymphocyte, en particulier le lymphocyte Th17.

L'IL-31 est donc une cytokine originale qui ne semble avoir qu'un effet indirect sur le remodelage osseux alors que l'OSM et l'IL-6 sont capables de moduler la différenciation et l'activation des ostéoblastes et des ostéoclastes. Cependant, ces cytokines pourraient également avoir une action indirecte sur le remodelage osseux, en agissant par exemple sur les lymphocytes Th17. Les modifications de l'architecture osseuse observées *in vivo* sont donc la résultante de l'action de ces cytokines sur ces différentes cibles qu'ils restent à identifier dans le cas de l'IL-31. Les mécanismes d'action des autres cytokines de la famille de l'IL-6 sur le remodelage osseux *in vivo* ne sont pas totalement élucidés. Par exemple, nous avons confirmé que l'IL-27 inhibe l'ostéoclastogénèse *in vitro* alors qu'elle n'a pas d'effet sur l'ostéoblastogénèse. De plus, il a récemment été montré que l'IL-27 inhibe la production d'IL-17 par les lymphocytes T (Murugaiyan et al., 2009), suggérant un rôle inhibiteur potentiel de l'IL-27 sur l'ostéoblastogénèse, de façon indirecte (figure 27). C'est pourquoi, il est nécessaire de déterminer l'action de cette cytokine sur l'architecture osseuse *in vivo*.



*Figure 27 : Activités biologiques des cytokines de la famille de l'IL-6 sur la physiologie osseuse.*

*L'IL-6 associée à son récepteur soluble et l'OSM semblent avoir un effet biphasique sur la différenciation ostéoblastique. L'OSM induit une différenciation terminale des ostéoblastes en cellules de type ostéocytaire.*

*L'IL-6 et l'OSM induisent la production de RANKL par les cellules ostéoblastiques et ainsi stimulent la résorption osseuse. De plus, l'IL-6 et l'IL-27 inhibe directement la différenciation ostéoclastique induite par RANKL.*

*L'IL-6 induit la différenciation des lymphocytes Th17 alors que l'IL-27 l'inhibe. D'une part, les lymphocytes Th17 expriment RANKL et peuvent donc avoir une action directe sur l'ostéoclastogénèse. D'autre part, l'IL-17 produite par ces cellules stimule la différenciation ostéoblastique.*

*L'IL-31 n'a qu'un effet indirect sur le remodelage osseux mais sa cible reste à identifier.*

Cette étude nous a permis de confirmer que certaines cytokines de la famille de l'IL-6, comme l'IL-6, l'IL-27, l'OSM et l'IL-31, sont actives sur le remodelage osseux physiologique et pathologique, comme montré pour l'OSM dans le cadre du développement d'un ostéosarcome. Il serait intéressant d'approfondir les connaissances sur l'implication de l'OSM et de l'IL-31 dans les pathologies inflammatoires associées à un remodelage osseux pathologique telle que l'arthrite rhumatoïde, le myélome multiple ou la maladie de Paget, pour lesquelles l'implication de l'IL-6 a déjà été mise en évidence (Fonseca et al., 2009). En particulier, l'arthrite rhumatoïde est une maladie auto-immune caractérisée par une hyperplasie synoviale associée à une destruction de l'os et du cartilage au niveau des articulations atteintes. Un taux élevé d'IL-6 a pu être mis en évidence au niveau de la synovie et du sérum des patients atteints d'arthrite rhumatoïde, en corrélation avec la sévérité de la maladie (Houssiau et al., 1988; Madhok et al., 1993). C'est pourquoi, une thérapie anti-IL-6 utilisant un anticorps monoclonal humanisé anti-IL-6R, le Tocilizumab, a été développée pour le traitement de cette pathologie. Deux essais cliniques de phase III, OPTION Trial (Smolen et al., 2008) et TOWARD Trial (Genovese et al., 2008), ont ainsi montré que le Tocilizumab, en monothérapie ou combinée avec du méthotrexate ou des DMARDs (Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs) était efficace pour le traitement de l'arthrite rhumatoïde, en particulier chez les patients réfractaires aux anticorps anti-TNF. L'OSM est également sur-exprimée dans la l'arthrite rhumatoïde (Hui et al., 1997) mais son rôle est encore controversé. Quant à l'IL-31, aucune donnée n'a été communiquée pour l'instant dans le cadre des pathologies ostéoarticulaires.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



- Adamopoulos, I. E., and Bowman, E. P. (2008). Immune regulation of bone loss by Th17 cells. *Arthritis Res Ther* 10, 225.
- Adams, J. M., and Cory, S. (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281, 1322-1326.
- Akatsu, T., Ono, K., Katayama, Y., Tamura, T., Nishikawa, M., Kugai, N., Yamamoto, M., and Nagata, N. (1998). The mouse mammary tumor cell line, MMT060562, produces prostaglandin E2 and leukemia inhibitory factor and supports osteoclast formation in vitro via a stromal cell-dependent pathway. *J Bone Miner Res* 13, 400-408.
- Alapetite, C., and Blay, J. (2001). Traitement non chirurgicaux des tumeurs des os: chimiothérapie et radiothérapie. *Encycl Méd Chir* 7p: 14-702.
- Ameaglio, F., Bonifati, C., Fazio, M., Mussi, A., Trento, E., Cordial Fei, P., Donati, P., Pimpinelli, F., D'Auria, L., and Carducci, M. (1997). Interleukin-11 production is increased in organ cultures of lesional skin of patients with active plaque-type psoriasis as compared with nonlesional and normal skin. Similarity to interleukin-1 beta, interleukin-6 and interleukin-8. *Arch Dermatol Res* 289, 399-403.
- Amin, A. R., Ichigotani, Y., Oo, M. L., Biswas, M. H., Yuan, H., Huang, P., Mon, N. N., and Hamaguchi, M. (2003). The PLC-PKC cascade is required for IL-1beta-dependent Erk and Akt activation: their role in proliferation. *Int J Oncol* 23, 1727-1731.
- Arita, K., South, A. P., Hans-Filho, G., Sakuma, T. H., Lai-Cheong, J., Clements, S., Odashiro, M., Odashiro, D. N., Hans-Neto, G., Hans, N. R., *et al.* (2008). Oncostatin M receptor-beta mutations underlie familial primary localized cutaneous amyloidosis. *Am J Hum Genet* 82, 73-80.
- Atreya, R., and Neurath, M. F. (2008). Signaling molecules: the pathogenic role of the IL-6/STAT-3 trans signaling pathway in intestinal inflammation and in colonic cancer. *Curr Drug Targets* 9, 369-374.
- Auernhammer, C. J., Dorn, F., Vlotides, G., Hengge, S., Kopp, F. B., Spoettl, G., Cengic, N., Engelhardt, D., and Weber, M. M. (2004). The oncostatin M receptor/gp130 ligand murine oncostatin M induces apoptosis in adrenocortical Y-1 tumor cells. *J Endocrinol* 180, 479-486.
- Auguste, P., Guillet, C., Fourcin, M., Olivier, C., Veziers, J., Pouplard-Barthelaix, A., and Gascan, H. (1997). Signaling of type II oncostatin M receptor. *J Biol Chem* 272, 15760-15764.
- Bacci, G., Briccoli, A., Rocca, M., Ferrari, S., Donati, D., Longhi, A., Bertoni, F., Bacchini, P., Giacomini, S., Forni, C., *et al.* (2003). Neoadjuvant chemotherapy for osteosarcoma of the extremities with metastases at presentation: recent experience at the Rizzoli Institute in 57 patients treated with cisplatin, doxorubicin, and a high dose of methotrexate and ifosfamide. *Ann Oncol* 14, 1126-1134.
- Barton, B. E., and Murphy, T. F. (2001). Cancer cachexia is mediated in part by the induction of IL-6-like cytokines from the spleen. *Cytokine* 16, 251-257.
- Battle, T. E., and Frank, D. A. (2002). The role of STATs in apoptosis. *Curr Mol Med* 2, 381-392.
- Baumann, H., and Gauldie, J. (1994). The acute phase response. *Immunol Today* 15, 74-80.
- Baumann, H., Wang, Y., Richards, C. D., Jones, C. A., Black, T. A., and Gross, K. W. (2000). Endotoxin-induced renal inflammatory response. Oncostatin M as a major mediator of suppressed renin expression. *J Biol Chem* 275, 22014-22019.

- Bellido, T., Borba, V. Z., Roberson, P., and Manolagas, S. C. (1997). Activation of the Janus kinase/STAT (signal transducer and activator of transcription) signal transduction pathway by interleukin-6-type cytokines promotes osteoblast differentiation. *Endocrinology* *138*, 3666-3676.
- Bellido, T., O'Brien, C. A., Roberson, P. K., and Manolagas, S. C. (1998). Transcriptional activation of the p21(WAF1,CIP1,SDI1) gene by interleukin-6 type cytokines. A prerequisite for their pro-differentiating and anti-apoptotic effects on human osteoblastic cells. *J Biol Chem* *273*, 21137-21144.
- Bilsborough, J., Leung, D. Y., Maurer, M., Howell, M., Boguniewicz, M., Yao, L., Storey, H., LeCiel, C., Harder, B., and Gross, J. A. (2006). IL-31 is associated with cutaneous lymphocyte antigen-positive skin homing T cells in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* *117*, 418-425.
- Blackwell, A. (1995). Sarcome des tissus mous et ostéosarcomes. Standard-Options-Recommendations.
- Blair, H. C., Kahn, A. J., Crouch, E. C., Jeffrey, J. J., and Teitelbaum, S. L. (1986). Isolated osteoclasts resorb the organic and inorganic components of bone. *J Cell Biol* *102*, 1164-1172.
- Blais, M. E., Louis, I., and Perreault, C. (2006). T-cell development: an extrathymic perspective. *Immunol Rev* *209*, 103-114.
- Blanchard, F., Duplomb, L., Baud'huin, M., and Brounais, B. (2009). The dual role of IL-6-type cytokines on bone remodeling and bone tumors. *Cytokine Growth Factor Rev* *20*, 19-28.
- Blanchard, F., Wang, Y., Kinzie, E., Duplomb, L., Godard, A., and Baumann, H. (2001). Oncostatin M regulates the synthesis and turnover of gp130, leukemia inhibitory factor receptor alpha, and oncostatin M receptor beta by distinct mechanisms. *J Biol Chem* *276*, 47038-47045.
- Bode, J. G., Ludwig, S., Freitas, C. A., Schaper, F., Ruhl, M., Melmed, S., Heinrich, P. C., and Haussinger, D. (2001). The MKK6/p38 mitogen-activated protein kinase pathway is capable of inducing SOCS3 gene expression and inhibits IL-6-induced transcription. *Biol Chem* *382*, 1447-1453.
- Bonewald, L. F., and Johnson, M. L. (2008). Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone* *42*, 606-615.
- Boniface, K., Diveu, C., Morel, F., Pedretti, N., Froger, J., Ravon, E., Garcia, M., Venereau, E., Preisser, L., Guignouard, E., *et al.* (2007). Oncostatin M secreted by skin infiltrating T lymphocytes is a potent keratinocyte activator involved in skin inflammation. *J Immunol* *178*, 4615-4622.
- Bonifati, C., Mussi, A., D'Auria, L., Carducci, M., Trento, E., Cordiali-Fei, P., and Ameglio, F. (1998). Spontaneous release of leukemia inhibitory factor and oncostatin-M is increased in supernatants of short-term organ cultures from lesional psoriatic skin. *Arch Dermatol Res* *290*, 9-13.
- Bossi, G., and Sacchi, A. (2007). Restoration of wild-type p53 function in human cancer: relevance for tumor therapy. *Head Neck* *29*, 272-284.
- Braciak, T. A., Mittal, S. K., Graham, F. L., Richards, C. D., and Gauldie, J. (1993). Construction of recombinant human type 5 adenoviruses expressing rodent IL-6 genes. An approach to investigate in vivo cytokine function. *J Immunol* *151*, 5145-5153.

- Brodie, C., and Blumberg, P. M. (2003). Regulation of cell apoptosis by protein kinase c delta. *Apoptosis* 8, 19-27.
- Brounais, B., Chipoy, C., Mori, K., Charrier, C., Battaglia, S., Pilet, P., Richards, C. D., Heymann, D., Redini, F., and Blanchard, F. (2008a). Oncostatin M induces bone loss and sensitizes rat osteosarcoma to the antitumor effect of Midostaurin in vivo. *Clin Cancer Res* 14, 5400-5409.
- Brounais, B., David, E., Chipoy, C., Trichet, V., Ferre, V., Charrier, C., Duplomb, L., Berreur, M., Redini, F., Heymann, D., and Blanchard, F. (2009). Long term oncostatin M treatment induces an osteocyte-like differentiation on osteosarcoma and calvaria cells. *Bone* 44, 830-839.
- Brounais, B., Ruiz, C., Rousseau, J., Lamoureux, F., Blanchard, F., Heymann, D., and Redini, F. (2008b). Novel anti-cancer strategy in bone tumors by targeting molecular and cellular modulators of bone resorption. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 3, 178-186.
- Brown, T. J., Rowe, J. M., Liu, J. W., and Shoyab, M. (1991). Regulation of IL-6 expression by oncostatin M. *J Immunol* 147, 2175-2180.
- Broxmeyer, H. E., Li, J., Hangoc, G., Cooper, S., Tao, W., Mantel, C., Graham-Evans, B., Ghilardi, N., and de Sauvage, F. J. (2007). Regulation of myeloid progenitor cell proliferation/survival by IL-31 receptor and IL-31. *Exp Hematol* 35, 78-86.
- Burfoot, M. S., Rogers, N. C., Watling, D., Smith, J. M., Pons, S., Paonessaw, G., Pellegrini, S., White, M. F., and Kerr, I. M. (1997). Janus kinase-dependent activation of insulin receptor substrate 1 in response to interleukin-4, oncostatin M, and the interferons. *J Biol Chem* 272, 24183-24190.
- Candelieri, G. A., Liu, F., and Aubin, J. E. (2001). Individual osteoblasts in the developing calvaria express different gene repertoires. *Bone* 28, 351-361.
- Capasso, L. L. (2005). Antiquity of cancer. *Int J Cancer* 113, 2-13.
- Chambers, T. J. (1988). The regulation of osteoclastic development and function. *Ciba Found Symp* 136, 92-107.
- Chambers, T. J., and Fuller, K. (1985). Bone cells predispose bone surfaces to resorption by exposure of mineral to osteoclastic contact. *J Cell Sci* 76, 155-165.
- Chatterjee-Kishore, M., Wright, K. L., Ting, J. P., and Stark, G. R. (2000). How Stat1 mediates constitutive gene expression: a complex of unphosphorylated Stat1 and IRF1 supports transcription of the LMP2 gene. *Embo J* 19, 4111-4122.
- Chattopadhyay, S., Tracy, E., Liang, P., Robledo, O., Rose-John, S., and Baumann, H. (2007). Interleukin-31 and oncostatin-M mediate distinct signaling reactions and response patterns in lung epithelial cells. *J Biol Chem* 282, 3014-3026.
- Chauveinc, L., Mosseri, V., Quintana, E., Desjardins, L., Schlienger, P., Doz, F., and Dutrillaux, B. (2001). Osteosarcoma following retinoblastoma: age at onset and latency period. *Ophthalmic Genet* 22, 77-88.
- Chavassieux, P. (2003). *Histologie et cytologie de l'os normal.*, Vol 14-002-A-10.
- Chen, S. H., and Benveniste, E. N. (2004). Oncostatin M: a pleiotropic cytokine in the central nervous system. *Cytokine Growth Factor Rev* 15, 379-391.
- Chipoy, C., Berreur, M., Couillaud, S., Pradal, G., Vallette, F., Colombeix, C., Redini, F., Heymann, D., and Blanchard, F. (2004). Downregulation of osteoblast markers and induction

of the glial fibrillary acidic protein by oncostatin M in osteosarcoma cells require PKCdelta and STAT3. *J Bone Miner Res* 19, 1850-1861.

Chung, C. D., Liao, J., Liu, B., Rao, X., Jay, P., Berta, P., and Shuai, K. (1997). Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science* 278, 1803-1805.

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

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

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

Collin, P., Guenther, H. L., and Fleisch, H. (1992). Constitutive expression of osteoclast-stimulating activity by normal clonal osteoblast-like cells: effects of parathyroid hormone and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Endocrinology* 131, 1181-1187.

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

Cvitkovic E., D. J., Armand J.P. and Khoury S. (1993). "Handbook of chemotherapy in clinical oncology. Scientific Communication International: 221-345.

Dambacher, J., Beigel, F., Seiderer, J., Haller, D., Goke, B., Auernhammer, C. J., and Brand, S. (2007). Interleukin 31 mediates MAP kinase and STAT1/3 activation in intestinal epithelial cells and its expression is upregulated in inflammatory bowel disease. *Gut* 56, 1257-1265.

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

Darowish, M., Rahman, R., Li, P., Bukata, S. V., Gelinas, J., Huang, W., Flick, L. M., Schwarz, E. M., and O'Keefe, R. J. (2009). Reduction of particle-induced osteolysis by interleukin-6 involves anti-inflammatory effect and inhibition of early osteoclast precursor differentiation. *Bone*.

Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., and Greenberg, M. E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231-241.

de Hooge, A. S., van de Loo, F. A., Bennink, M. B., Arntz, O. J., Fiselier, T. J., Franssen, M. J., Joosten, L. A., Van Lent, P. L., Richards, C. D., and van den Berg, W. B. (2003). Growth plate damage, a feature of juvenile idiopathic arthritis, can be induced by adenoviral gene transfer of oncostatin M: a comparative study in gene-deficient mice. *Arthritis Rheum* 48, 1750-1761.

de Hooge, A. S., van de Loo, F. A., Bennink, M. B., de Jong, D. S., Arntz, O. J., Lubberts, E., Richards, C. D., and van den Berg, W. B. (2002). Adenoviral transfer of murine oncostatin M elicits periosteal bone apposition in knee joints of mice, despite synovial inflammation and up-regulated expression of interleukin-6 and receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand. *Am J Pathol* 160, 1733-1743.

de la Mata, J., Uy, H. L., Guise, T. A., Story, B., Boyce, B. F., Mundy, G. R., and Roodman, G. D. (1995). Interleukin-6 enhances hypercalcemia and bone resorption mediated by parathyroid hormone-related protein in vivo. *J Clin Invest* 95, 2846-2852.

- Debierre-Grockiego, F. (2004). Anti-apoptotic role of STAT5 in haematopoietic cells and in the pathogenesis of malignancies. *Apoptosis* 9, 717-728.
- Deller, M. C., Hudson, K. R., Ikemizu, S., Bravo, J., Jones, E. Y., and Heath, J. K. (2000). Crystal structure and functional dissection of the cytostatic cytokine oncostatin M. *Structure* 8, 863-874.
- Dempster, D. W., Hughes-Begos, C. E., Plavetic-Chee, K., Brandao-Burch, A., Cosman, F., Nieves, J., Neubort, S., Lu, S. S., Iida-Klein, A., Arnett, T., and Lindsay, R. (2005). Normal human osteoclasts formed from peripheral blood monocytes express PTH type 1 receptors and are stimulated by PTH in the absence of osteoblasts. *J Cell Biochem* 95, 139-148.
- Desandes, E., Clavel, J., Berger, C., Bernard, J. L., Blouin, P., de Lumley, L., Demeocq, F., Freycon, F., Gembara, P., Goubin, A., *et al.* (2004). Cancer incidence among children in France, 1990-1999. *Pediatr Blood Cancer* 43, 749-757.
- Dillon, S. R., Sprecher, C., Hammond, A., Bilsborough, J., Rosenfeld-Franklin, M., Presnell, S. R., Haugen, H. S., Maurer, M., Harder, B., Johnston, J., *et al.* (2004). Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice. *Nat Immunol* 5, 752-760.
- Ding, C., Parameswaran, V., Udayan, R., Burgess, J., and Jones, G. (2008). Circulating levels of inflammatory markers predict change in bone mineral density and resorption in older adults: a longitudinal study. *J Clin Endocrinol Metab* 93, 1952-1958.
- Diveu, C., Lak-Hal, A. H., Froger, J., Ravon, E., Grimaud, L., Barbier, F., Hermann, J., Gascan, H., and Chevalier, S. (2004). Predominant expression of the long isoform of GP130-like (GPL) receptor is required for interleukin-31 signaling. *Eur Cytokine Netw* 15, 291-302.
- Diveu, C., Lelievre, E., Perret, D., Lak-Hal, A. H., Froger, J., Guillet, C., Chevalier, S., Rousseau, F., Wesa, A., Preisser, L., *et al.* (2003). GPL, a novel cytokine receptor related to GP130 and leukemia inhibitory factor receptor. *J Biol Chem* 278, 49850-49859.
- Douglas, A. M., Grant, S. L., Goss, G. A., Clouston, D. R., Sutherland, R. L., and Begley, C. G. (1998). Oncostatin M induces the differentiation of breast cancer cells. *Int J Cancer* 75, 64-73.
- Dreuw, A., Radtke, S., Pflanz, S., Lippok, B. E., Heinrich, P. C., and Hermanns, H. M. (2004). Characterization of the signaling capacities of the novel gp130-like cytokine receptor. *J Biol Chem* 279, 36112-36120.
- Duplomb, L., Baud'huin, M., Charrier, C., Berreur, M., Trichet, V., Blanchard, F., and Heymann, D. (2008). Interleukin-6 inhibits receptor activator of nuclear factor kappaB ligand-induced osteoclastogenesis by diverting cells into the macrophage lineage: key role of Serine727 phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 3. *Endocrinology* 149, 3688-3697.
- Entz-Werle, N., Marcellin, L., Gaub, M. P., Guerin, E., Schneider, A., Berard-Marec, P., Kalifa, C., Brugiere, L., Pacquement, H., Schmitt, C., *et al.* (2005a). Prognostic significance of allelic imbalance at the c-kit gene locus and c-kit overexpression by immunohistochemistry in pediatric osteosarcomas. *J Clin Oncol* 23, 2248-2255.
- Entz-Werle, N., Stoetzel, C., Berard-Marec, P., Kalifa, C., Brugiere, L., Pacquement, H., Schmitt, C., Tabone, M. D., Gentet, J. C., Quillet, R., *et al.* (2005b). Frequent genomic abnormalities at TWIST in human pediatric osteosarcomas. *Int J Cancer* 117, 349-355.
- Erices, A., Conget, P., Rojas, C., and Minguell, J. J. (2002). Gp130 activation by soluble interleukin-6 receptor/interleukin-6 enhances osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 280, 24-32.

- Ernst, M., Najdovska, M., Grail, D., Lundgren-May, T., Buchert, M., Tye, H., Matthews, V. B., Armes, J., Bhathal, P. S., Hughes, N. R., *et al.* (2008). STAT3 and STAT1 mediate IL-11-dependent and inflammation-associated gastric tumorigenesis in gp130 receptor mutant mice. *J Clin Invest* 118, 1727-1738.
- Eskes, R., Desagher, S., Antonsson, B., and Martinou, J. C. (2000). Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol* 20, 929-935.
- Fleischer, A., Ghadiri, A., Dessauge, F., Duhamel, M., Rebollo, M. P., Alvarez-Franco, F., and Rebollo, A. (2006). Modulating apoptosis as a target for effective therapy. *Mol Immunol* 43, 1065-1079.
- Fonseca, J. E., Santos, M. J., Canhao, H., and Choy, E. (2009). Interleukin-6 as a key player in systemic inflammation and joint destruction. *Autoimmun Rev* 8, 538-542.
- Franz-Odenaal, T. A., Hall, B. K., and Witten, P. E. (2006). Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn* 235, 176-190.
- Fuchs, B., and Pritchard, D. J. (2002). Etiology of osteosarcoma. *Clin Orthop Relat Res*, 40-52.
- Furukawa, M., Takaishi, H., Takito, J., Yoda, M., Sakai, S., Hikata, T., Hakozi, A., Uchikawa, S., Matsumoto, M., Chiba, K., *et al.* (2009). IL-27 Abrogates Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand-Mediated Osteoclastogenesis of Human Granulocyte-Macrophage Colony-Forming Unit Cells through STAT1-Dependent Inhibition of c-Fos. *J Immunol*.
- Ganjavi, H., Gee, M., Narendran, A., Parkinson, N., Krishnamoorthy, M., Freedman, M. H., and Malkin, D. (2006). Adenovirus-mediated p53 gene therapy in osteosarcoma cell lines: sensitization to cisplatin and doxorubicin. *Cancer Gene Ther* 13, 415-419.
- Garcia, R., Bowman, T. L., Niu, G., Yu, H., Minton, S., Muro-Cacho, C. A., Cox, C. E., Falcone, R., Fairclough, R., Parsons, S., *et al.* (2001). Constitutive activation of Stat3 by the Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells. *Oncogene* 20, 2499-2513.
- Garman, R. D., Jacobs, K. A., Clark, S. C., and Raulet, D. H. (1987). B-cell-stimulatory factor 2 (beta 2 interferon) functions as a second signal for interleukin 2 production by mature murine T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 7629-7633.
- Gearing, D. P., and Bruce, A. G. (1992). Oncostatin M binds the high-affinity leukemia inhibitory factor receptor. *New Biol* 4, 61-65.
- Genetos, D. C., Kephart, C. J., Zhang, Y., Yellowley, C. E., and Donahue, H. J. (2007). Oscillating fluid flow activation of gap junction hemichannels induces ATP release from MLO-Y4 osteocytes. *J Cell Physiol* 212, 207-214.
- Genovese, M. C., McKay, J. D., Nasonov, E. L., Mysler, E. F., da Silva, N. A., Alecock, E., Woodworth, T., and Gomez-Reino, J. J. (2008). Interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab reduces disease activity in rheumatoid arthritis with inadequate response to disease-modifying antirheumatic drugs: the tocilizumab in combination with traditional disease-modifying antirheumatic drug therapy study. *Arthritis Rheum* 58, 2968-2980.
- Ghilardi, N., Li, J., Hongo, J. A., Yi, S., Gurney, A., and de Sauvage, F. J. (2002). A novel type I cytokine receptor is expressed on monocytes, signals proliferation, and activates STAT-3 and STAT-5. *J Biol Chem* 277, 16831-16836.

- Giovannini, M., Djabali, M., McElligott, D., Selleri, L., and Evans, G. A. (1993). Tandem linkage of genes coding for leukemia inhibitory factor (LIF) and oncostatin M (OSM) on human chromosome 22. *Cytogenet Cell Genet* 64, 240-244.
- Glorieux, F. H., Travers, R., Taylor, A., Bowen, J. R., Rauch, F., Norman, M., and Parfitt, A. M. (2000). Normative data for iliac bone histomorphometry in growing children. *Bone* 26, 103-109.
- Glowacki, J., Rey, C., Glimcher, M. J., Cox, K. A., and Lian, J. (1991). A role for osteocalcin in osteoclast differentiation. *J Cell Biochem* 45, 292-302.
- Goswami, S., Gupta, A., and Sharma, S. K. (1998). Interleukin-6-mediated autocrine growth promotion in human glioblastoma multiforme cell line U87MG. *J Neurochem* 71, 1837-1845.
- Gotzos, B., Schöni-Affolter, F., and Celio, M. (2007). Os compact et spongieux
- Grant, S. L., and Begley, C. G. (1999). The oncostatin M signalling pathway: reversing the neoplastic phenotype? *Mol Med Today* 5, 406-412.
- Grant, S. L., Douglas, A. M., Goss, G. A., and Begley, C. G. (2001). Oncostatin M and leukemia inhibitory factor regulate the growth of normal human breast epithelial cells. *Growth Factors* 19, 153-162.
- Green, D. R., and Evan, G. I. (2002). A matter of life and death. *Cancer Cell* 1, 19-30.
- Grenier, A., Dehoux, M., Boutten, A., Arce-Vicioso, M., Durand, G., Gougerot-Pocidalò, M. A., and Chollet-Martin, S. (1999). Oncostatin M production and regulation by human polymorphonuclear neutrophils. *Blood* 93, 1413-1421.
- Grigoriadis, A. E., Schellander, K., Wang, Z. Q., and Wagner, E. F. (1993). Osteoblasts are target cells for transformation in c-fos transgenic mice. *J Cell Biol* 122, 685-701.
- Grimstad, O., Sawanobori, Y., Vestergaard, C., Bilborough, J., Olsen, U. B., Gronhøj-Larsen, C., and Matsushima, K. (2009). Anti-interleukin-31-antibodies ameliorate scratching behaviour in NC/Nga mice: a model of atopic dermatitis. *Exp Dermatol* 18, 35-43.
- Guinebretière JM, L. C. A., Le péchoux C, Missenard G, Bonvalot S, Terrier P and Vanel D (2001). Ostéosarcome de forme commune. *Encycl Méd Chir* 13p: 14-704.
- Guschin, D., Rogers, N., Briscoe, J., Witthuhn, B., Watling, D., Horn, F., Pellegrini, S., Yasukawa, K., Heinrich, P., Stark, G. R., and et al. (1995). A major role for the protein tyrosine kinase JAK1 in the JAK/STAT signal transduction pathway in response to interleukin-6. *Embo J* 14, 1421-1429.
- Haan, C., Hermanns, H. M., Heinrich, P. C., and Behrmann, I. (2000). A single amino acid substitution (Trp(666)-->Ala) in the interbox1/2 region of the interleukin-6 signal transducer gp130 abrogates binding of JAK1, and dominantly impairs signal transduction. *Biochem J* 349, 261-266.
- Hadjiargyrou, M., Rightmire, E. P., Ando, T., and Lombardo, F. T. (2001). The E11 osteoblastic lineage marker is differentially expressed during fracture healing. *Bone* 29, 149-154.
- Halfter, H., Friedrich, M., Resch, A., Kullmann, M., Stogbauer, F., Ringelstein, E. B., and Hengst, L. (2006). Oncostatin M induces growth arrest by inhibition of Skp2, Cks1, and cyclin A expression and induced p21 expression. *Cancer Res* 66, 6530-6539.

- Halfter, H., Lotfi, R., Westermann, R., Young, P., Ringelstein, E. B., and Stogbauer, F. T. (1998). Inhibition of growth and induction of differentiation of glioma cell lines by oncostatin M (OSM). *Growth Factors* 15, 135-147.
- Hauben, E. I., Arends, J., Vandenbroucke, J. P., van Asperen, C. J., Van Marck, E., and Hogendoorn, P. C. (2003). Multiple primary malignancies in osteosarcoma patients. Incidence and predictive value of osteosarcoma subtype for cancer syndromes related with osteosarcoma. *Eur J Hum Genet* 11, 611-618.
- Hauschka, P. V., Mavrakos, A. E., Iafrazi, M. D., Doleman, S. E., and Klagsbrun, M. (1986). Growth factors in bone matrix. Isolation of multiple types by affinity chromatography on heparin-Sepharose. *J Biol Chem* 261, 12665-12674.
- Heath, C., and Cross, N. C. (2004). Critical role of STAT5 activation in transformation mediated by ZNF198-FGFR1. *J Biol Chem* 279, 6666-6673.
- Heinrich, P. C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H. M., Muller-Newen, G., and Schaper, F. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 374, 1-20.
- Heinrich, P. C., Behrmann, I., Muller-Newen, G., Schaper, F., and Graeve, L. (1998). Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 334 ( Pt 2), 297-314.
- Hermanns, H. M., Radtke, S., Schaper, F., Heinrich, P. C., and Behrmann, I. (2000). Non-redundant signal transduction of interleukin-6-type cytokines. The adapter protein Shc is specifically recruited to the oncostatin M receptor. *J Biol Chem* 275, 40742-40748.
- Heymann, D., and Lepreux, S. (2008). Le tissu osseux, In *Histologie - Bases fondamentales* OmniScience, ed.
- Hill, P. A. (1998). Bone remodelling. *Br J Orthod* 25, 101-107.
- Hintzen, C., Evers, C., Lippok, B. E., Volkmer, R., Heinrich, P. C., Radtke, S., and Hermanns, H. M. (2008). Box 2 region of the oncostatin M receptor determines specificity for recruitment of Janus kinases and STAT5 activation. *J Biol Chem* 283, 19465-19477.
- Hirano, T. (1998). Interleukin 6 and its receptor: ten years later. *Int Rev Immunol* 16, 249-284.
- Hirano, T., Taga, T., Nakano, N., Yasukawa, K., Kashiwamura, S., Shimizu, K., Nakajima, K., Pyun, K. H., and Kishimoto, T. (1985). Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2). *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 5490-5494.
- Hirano, T., Yasukawa, K., Harada, H., Taga, T., Watanabe, Y., Matsuda, T., Kashiwamura, S., Nakajima, K., Koyama, K., Iwamatsu, A., and et al. (1986). Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 324, 73-76.
- Hoffman, R. C., Moy, F. J., Price, V., Richardson, J., Kaubisch, D., Frieden, E. A., Krakover, J. D., Castner, B. J., King, J., March, C. J., and Powers, R. (1996). Resonance assignments for Oncostatin M, a 24-kDa alpha-helical protein. *J Biomol NMR* 7, 273-282.
- Holtrop, M. E., and King, G. J. (1977). The ultrastructure of the osteoclast and its functional implications. *Clin Orthop Relat Res* 123, 177-196.



- Horn, D., Fitzpatrick, W. C., Gompper, P. T., Ochs, V., Bolton-Hansen, M., Zarling, J., Malik, N., Todaro, G. J., and Linsley, P. S. (1990). Regulation of cell growth by recombinant oncostatin M. *Growth Factors* 2, 157-165.
- Horwood, N. J., Elliott, J., Martin, T. J., and Gillespie, M. T. (1998). Osteotropic agents regulate the expression of osteoclast differentiation factor and osteoprotegerin in osteoblastic stromal cells. *Endocrinology* 139, 4743-4746.
- Houssiau, F. A., Devogelaer, J. P., Van Damme, J., de Deuxchaisnes, C. N., and Van Snick, J. (1988). Interleukin-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides. *Arthritis Rheum* 31, 784-788.
- Hsu, H., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., Solovyev, I., Colombero, A., Timms, E., Tan, H. L., Elliott, G., Kelley, M. J., Sarosi, I., *et al.* (1999). Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3540-3545.
- Huang, H., Kim, H. J., Chang, E. J., Lee, Z. H., Hwang, S. J., Kim, H. M., Lee, Y., and Kim, H. H. (2009). IL-17 stimulates the proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells: implications for bone remodeling. *Cell Death Differ*.
- Hughes, D. E., Salter, D. M., and Simpson, R. (1994). CD44 expression in human bone: a novel marker of osteocytic differentiation. *J Bone Miner Res* 9, 39-44.
- Hui, W., Bell, M., and Carroll, G. (1997). Detection of oncostatin M in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 56, 184-187.
- Hui, W., Cawston, T. E., Richards, C. D., and Rowan, A. D. (2005). A model of inflammatory arthritis highlights a role for oncostatin M in pro-inflammatory cytokine-induced bone destruction via RANK/RANKL. *Arthritis Res Ther* 7, R57-64.
- Hui, W., Rowan, A. D., Richards, C. D., and Cawston, T. E. (2003). Oncostatin M in combination with tumor necrosis factor alpha induces cartilage damage and matrix metalloproteinase expression in vitro and in vivo. *Arthritis Rheum* 48, 3404-3418.
- Hutt, J. A., and DeWille, J. W. (2002). Oncostatin M induces growth arrest of mammary epithelium via a CCAAT/enhancer-binding protein delta-dependent pathway. *Mol Cancer Ther* 1, 601-610.
- Ihn, H., and Tamaki, K. (2000). Oncostatin M stimulates the growth of dermal fibroblasts via a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *J Immunol* 165, 2149-2155.
- Ikebuchi, K., Wong, G. G., Clark, S. C., Ihle, J. N., Hirai, Y., and Ogawa, M. (1987). Interleukin 6 enhancement of interleukin 3-dependent proliferation of multipotential hemopoietic progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 9035-9039.
- Ip, W. K., Wong, C. K., Li, M. L., Li, P. W., Cheung, P. F., and Lam, C. W. (2007). Interleukin-31 induces cytokine and chemokine production from human bronchial epithelial cells through activation of mitogen-activated protein kinase signalling pathways: implications for the allergic response. *Immunology* 122, 532-541.
- Ishihara, K., and Hirano, T. (2002). IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 13, 357-368.
- Ito, Y., Matsui, T., Kamiya, A., Kinoshita, T., and Miyajima, A. (2000). Retroviral gene transfer of signaling molecules into murine fetal hepatocytes defines distinct roles for the STAT3 and ras pathways during hepatic development. *Hepatology* 32, 1370-1376.

- Itoh, S., Udagawa, N., Takahashi, N., Yoshitake, F., Narita, H., Ebisu, S., and Ishihara, K. (2006). A critical role for interleukin-6 family-mediated Stat3 activation in osteoblast differentiation and bone formation. *Bone* 39, 505-512.
- Jain, N., Zhang, T., Kee, W. H., Li, W., and Cao, X. (1999). Protein kinase C delta associates with and phosphorylates Stat3 in an interleukin-6-dependent manner. *J Biol Chem* 274, 24392-24400.
- Jamal, H. H., and Aubin, J. E. (1996). CD44 expression in fetal rat bone: in vivo and in vitro analysis. *Exp Cell Res* 223, 467-477.
- Jawa, R. S., Chattopadhyay, S., Tracy, E., Wang, Y., Huntoon, K., Dayton, M. T., and Baumann, H. (2008). Regulated expression of the IL-31 receptor in bronchial and alveolar epithelial cells, pulmonary fibroblasts, and pulmonary macrophages. *J Interferon Cytokine Res* 28, 207-219.
- Jilka, R. L., Weinstein, R. S., Bellido, T., Parfitt, A. M., and Manolagas, S. C. (1998). Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. *J Bone Miner Res* 13, 793-802.
- Jimi, E., Nakamura, I., Amano, H., Taguchi, Y., Tsurukai, T., Tamura, M., Takahashi, N., and Suda, T. (1996). Osteoclast function is activated by osteoblastic cells through a mechanism involving cell-to-cell contact. *Endocrinology* 137, 2187-2190.
- Johnstone, R. W., Frew, A. J., and Smyth, M. J. (2008). The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy. *Nat Rev Cancer* 8, 782-798.
- Jorcyk, C. L., Holzer, R. G., and Ryan, R. E. (2006). Oncostatin M induces cell detachment and enhances the metastatic capacity of T-47D human breast carcinoma cells. *Cytokine* 33, 323-336.
- Kamiya, S., Nakamura, C., Fukawa, T., Ono, K., Ohwaki, T., Yoshimoto, T., and Wada, S. (2007). Effects of IL-23 and IL-27 on osteoblasts and osteoclasts: inhibitory effects on osteoclast differentiation. *J Bone Miner Metab* 25, 277-285.
- Kashkar, H., Wiegmann, K., Yazdanpanah, B., Haubert, D., and Kronke, M. (2005). Acid sphingomyelinase is indispensable for UV light-induced Bax conformational change at the mitochondrial membrane. *J Biol Chem* 280, 20804-20813.
- Kelekar, A., and Thompson, C. B. (1998). Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol* 8, 324-330.
- Kerr, C., Langdon, C., Graham, F., Gauldie, J., Hara, T., and Richards, C. D. (1999). Adenovirus vector expressing mouse oncostatin M induces acute-phase proteins and TIMP-1 expression in vivo in mice. *J Interferon Cytokine Res* 19, 1195-1205.
- Kishimoto, T. (1989). The biology of interleukin-6. *Blood* 74, 1-10.
- Kishimoto, T. (2006). Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine. *Arthritis Res Ther* 8 Suppl 2, S2.
- Kishimoto, T., Akira, S., and Taga, T. (1992). Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines. *Science* 258, 593-597.
- Klausen, P., Pedersen, L., Jurlander, J., and Baumann, H. (2000). Oncostatin M and interleukin 6 inhibit cell cycle progression by prevention of p27kip1 degradation in HepG2 cells. *Oncogene* 19, 3675-3683.

- Knothe Tate, M. L., Adamson, J. R., Tami, A. E., and Bauer, T. W. (2004). The osteocyte. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 1-8.
- Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R. T., Gao, Y. H., Inada, M., *et al.* (1997). Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89, 755-764.
- Kopf, M., Baumann, H., Freer, G., Freudenberg, M., Lamers, M., Kishimoto, T., Zinkernagel, R., Bluethmann, H., and Kohler, G. (1994). Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature* 368, 339-342.
- Kortylewski, M., Heinrich, P. C., Mackiewicz, A., Schniertshauer, U., Klingmuller, U., Nakajima, K., Hirano, T., Horn, F., and Behrmann, I. (1999). Interleukin-6 and oncostatin M-induced growth inhibition of human A375 melanoma cells is STAT-dependent and involves upregulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27/Kip1. *Oncogene* 18, 3742-3753.
- Korzus, E., Nagase, H., Rydell, R., and Travis, J. (1997). The mitogen-activated protein kinase and JAK-STAT signaling pathways are required for an oncostatin M-responsive element-mediated activation of matrix metalloproteinase 1 gene expression. *J Biol Chem* 272, 1188-1196.
- Kwan Tat, S., Padrines, M., Theoleyre, S., Heymann, D., and Fortun, Y. (2004). IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev* 15, 49-60.
- Lacey, D. L., Timms, E., Tan, H. L., Kelley, M. J., Dunstan, C. R., Burgess, T., Elliott, R., Colombero, A., Elliott, G., Scully, S., *et al.* (1998). Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93, 165-176.
- Lacrouette, A., Lartigue, A., Nguyen, J. M., Barbieux, I., Pandolfino, M. C., Paris, F., Khammari, A., Dreno, B., Jacques, Y., Blanchard, F., and Godard, A. (2008). Relationship between responsiveness of cancer cells to Oncostatin M and/or IL-6 and survival of stage III melanoma patients treated with tumour-infiltrating lymphocytes. *J Pathol* 216, 451-459.
- Lacrouette, A., Nguyen, J. M., Pandolfino, M. C., Khammari, A., Dreno, B., Jacques, Y., Godard, A., and Blanchard, F. (2007). Loss of oncostatin M receptor beta in metastatic melanoma cells. *Oncogene* 26, 881-892.
- Lakkakorpi, P. T., and Vaananen, H. K. (1996). Cytoskeletal changes in osteoclasts during the resorption cycle. *Microsc Res Tech* 33, 171-181.
- Langdon, C., Kerr, C., Hassen, M., Hara, T., Arsenault, A. L., and Richards, C. D. (2000). Murine oncostatin M stimulates mouse synovial fibroblasts in vitro and induces inflammation and destruction in mouse joints in vivo. *Am J Pathol* 157, 1187-1196.
- Langdon, C., Kerr, C., Tong, L., and Richards, C. D. (2003). Oncostatin M regulates eotaxin expression in fibroblasts and eosinophilic inflammation in C57BL/6 mice. *J Immunol* 170, 548-555.
- Lei, Z., Liu, G., Huang, Q., Lv, M., Zu, R., Zhang, G. M., Feng, Z. H., and Huang, B. (2008). SCF and IL-31 rather than IL-17 and BAFF are potential indicators in patients with allergic asthma. *Allergy* 63, 327-332.
- Lejeune, F. J., Lienard, D., Matter, M., and Ruegg, C. (2006). Efficiency of recombinant human TNF in human cancer therapy. *Cancer Immun* 6, 6.

- Li, W. Q., Dehnade, F., and Zafarullah, M. (2001). Oncostatin M-induced matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 genes expression in chondrocytes requires Janus kinase/STAT signaling pathway. *J Immunol* *166*, 3491-3498.
- Lindberg, R. A., Juan, T. S., Welcher, A. A., Sun, Y., Cupples, R., Guthrie, B., and Fletcher, F. A. (1998). Cloning and characterization of a specific receptor for mouse oncostatin M. *Mol Cell Biol* *18*, 3357-3367.
- Linnet, M. S., Ries, L. A., Smith, M. A., Tarone, R. E., and Devesa, S. S. (1999). Cancer surveillance series: recent trends in childhood cancer incidence and mortality in the United States. *J Natl Cancer Inst* *91*, 1051-1058.
- Link, M. P., Goorin, A. M., Miser, A. W., Green, A. A., Pratt, C. B., Belasco, J. B., Pritchard, J., Malpas, J. S., Baker, A. R., Kirkpatrick, J. A., and et al. (1986). The effect of adjuvant chemotherapy on relapse-free survival in patients with osteosarcoma of the extremity. *N Engl J Med* *314*, 1600-1606.
- Linsley, P. S., Kallestad, J., Ochs, V., and Neubauer, M. (1990). Cleavage of a hydrophilic C-terminal domain increases growth-inhibitory activity of oncostatin M. *Mol Cell Biol* *10*, 1882-1890.
- Liu, B., Liao, J., Rao, X., Kushner, S. A., Chung, C. D., Chang, D. D., and Shuai, K. (1998a). Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 10626-10631.
- Liu, F., Aubin, J. E., and Malaval, L. (2002). Expression of leukemia inhibitory factor (LIF)/interleukin-6 family cytokines and receptors during in vitro osteogenesis: differential regulation by dexamethasone and LIF. *Bone* *31*, 212-219.
- Liu, J., Hadjokas, N., Mosley, B., Estrov, Z., Spence, M. J., and Vestal, R. E. (1998b). Oncostatin M-specific receptor expression and function in regulating cell proliferation of normal and malignant mammary epithelial cells. *Cytokine* *10*, 295-302.
- Lopez-Guerrero, J. A., Lopez-Gines, C., Pellin, A., Carda, C., and Llombart-Bosch, A. (2004). Deregulation of the G1 to S-phase cell cycle checkpoint is involved in the pathogenesis of human osteosarcoma. *Diagn Mol Pathol* *13*, 81-91.
- Lu, C., Sheehan, C., Rak, J. W., Chambers, C. A., Hozumi, N., and Kerbel, R. S. (1996). Endogenous interleukin 6 can function as an in vivo growth- stimulatory factor for advanced-stage human melanoma cells. *Clin Cancer Res* *2*, 1417-1425.
- Lu, Y., Fukuyama, S., Yoshida, R., Kobayashi, T., Saeki, K., Shiraishi, H., Yoshimura, A., and Takaesu, G. (2006). Loss of SOCS3 Gene Expression Converts STAT3 Function from Anti-apoptotic to Pro-apoptotic. *J Biol Chem* *281*, 36683-36690.
- Lu, Y., Zhang, J., Dai, J., Dehne, L. A., Mizokami, A., Yao, Z., and Keller, E. T. (2004). Osteoblasts induce prostate cancer proliferation and PSA expression through interleukin-6-mediated activation of the androgen receptor. *Clin Exp Metastasis* *21*, 399-408.
- Lynch, H. T., Deters, C. A., Hogg, D., Lynch, J. F., Kinarsky, Y., and Gatalica, Z. (2003). Familial sarcoma: challenging pedigrees. *Cancer* *98*, 1947-1957.
- Madhok, R., Crilly, A., Watson, J., and Capell, H. A. (1993). Serum interleukin 6 levels in rheumatoid arthritis: correlations with clinical and laboratory indices of disease activity. *Ann Rheum Dis* *52*, 232-234.
- Malaval, L., and Aubin, J. E. (2001). Biphasic effects of leukemia inhibitory factor on osteoblastic differentiation. *J Cell Biochem Suppl Suppl* *36*, 63-70.

- Malaval, L., Chenu, C., and Delmas, P. D. (1996). Protéine de l'os : maladies systémiques osseuses de l'adulte. D Kuntz, édition Flammarion, 17-35.
- Malaval, L., Liu, F., Vernallis, A. B., and Aubin, J. E. (2005). GP130/OSMR is the only LIF/IL-6 family receptor complex to promote osteoblast differentiation of calvaria progenitors. *J Cell Physiol* 204, 585-593.
- Malik, N., Haugen, H. S., Modrell, B., Shoyab, M., and Clegg, C. H. (1995). Developmental abnormalities in mice transgenic for bovine oncostatin M. *Mol Cell Biol* 15, 2349-2358.
- Malik, N., Kallestad, J. C., Gunderson, N. L., Austin, S. D., Neubauer, M. G., Ochs, V., Marquardt, H., Zarling, J. M., Shoyab, M., Wei, C. M., and et al. (1989). Molecular cloning, sequence analysis, and functional expression of a novel growth regulator, oncostatin M. *Mol Cell Biol* 9, 2847-2853.
- Manolagas, S. C. (2000). Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 21, 115-137.
- Marie, P. J. (2008). Transcription factors controlling osteoblastogenesis. *Arch Biochem Biophys* 473, 98-105.
- Marieb, E. (1998). *Human Anatomy and Physiology*, 4<sup>TH</sup> edition edn.
- McCabe, L. R., Banerjee, C., Kundu, R., Harrison, R. J., Dobner, P. R., Stein, J. L., Lian, J. B., and Stein, G. S. (1996). Developmental expression and activities of specific fos and jun proteins are functionally related to osteoblast maturation: role of Fra-2 and Jun D during differentiation. *Endocrinology* 137, 4398-4408.
- Meyer, T., Begitt, A., Lodige, I., van Rossum, M., and Vinkemeier, U. (2002). Constitutive and IFN-gamma-induced nuclear import of STAT1 proceed through independent pathways. *Embo J* 21, 344-354.
- Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P., and Moll, U. M. (2003). p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell* 11, 577-590.
- Miyajima, A., Kinoshita, T., Tanaka, M., Kamiya, A., Mukoyama, Y., and Hara, T. (2000). Role of Oncostatin M in hematopoiesis and liver development. *Cytokine Growth Factor Rev* 11, 177-183.
- Modur, V., Feldhaus, M. J., Weyrich, A. S., Jicha, D. L., Prescott, S. M., Zimmerman, G. A., and McIntyre, T. M. (1997). Oncostatin M is a proinflammatory mediator. In vivo effects correlate with endothelial cell expression of inflammatory cytokines and adhesion molecules. *J Clin Invest* 100, 158-168.
- Morgan, H., Tumber, A., and Hill, P. A. (2004). Breast cancer cells induce osteoclast formation by stimulating host IL-11 production and downregulating granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *Int J Cancer* 109, 653-660.
- Morikawa, Y., Tamura, S., Minehata, K., Donovan, P. J., Miyajima, A., and Senba, E. (2004). Essential function of oncostatin m in nociceptive neurons of dorsal root ganglia. *J Neurosci* 24, 1941-1947.
- Mosende, C., Gutierrez, M., Caparros, B., and Rosen, G. (1977). Combination chemotherapy with bleomycin, cyclophosphamide and dactinomycin for the treatment of osteogenic sarcoma. *Cancer* 40, 2779-2786.
- Mosley, B., De Imus, C., Friend, D., Boiani, N., Thoma, B., Park, L. S., and Cosman, D. (1996). Dual oncostatin M (OSM) receptors. Cloning and characterization of an alternative

signaling subunit conferring OSM-specific receptor activation. *J Biol Chem* 271, 32635-32643.

Mukouyama, Y., Hara, T., Xu, M., Tamura, K., Donovan, P. J., Kim, H., Kogo, H., Tsuji, K., Nakahata, T., and Miyajima, A. (1998). In vitro expansion of murine multipotential hematopoietic progenitors from the embryonic aorta-gonad-mesonephros region. *Immunity* 8, 105-114.

Mule, J. J., McIntosh, J. K., Jablons, D. M., and Rosenberg, S. A. (1990). Antitumor activity of recombinant interleukin 6 in mice. *J Exp Med* 171, 629-636.

Munoz-Fernandez, M. A., Cano, E., O'Donnell, C. A., Doyle, J., Liew, F. Y., and Fresno, M. (1994). Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), interferon-gamma, and interleukin-6 but not TNF-beta induce differentiation of neuroblastoma cells: the role of nitric oxide. *J Neurochem* 62, 1330-1336.

Murakami, M., Narazaki, M., Hibi, M., Yawata, H., Yasukawa, K., Hamaguchi, M., Taga, T., and Kishimoto, T. (1991). Critical cytoplasmic region of the interleukin 6 signal transducer gp130 is conserved in the cytokine receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 11349-11353.

Murugaiyan, G., Mittal, A., Lopez-Diego, R., Maier, L. M., Anderson, D. E., and Weiner, H. L. (2009). IL-27 is a key regulator of IL-10 and IL-17 production by human CD4+ T cells. *J Immunol* 183, 2435-2443.

Nagai, Y., Yamato, H., Akaogi, K., Hirose, K., Ueyama, Y., Ikeda, K., Matsumoto, T., Fujita, T., and Ogata, E. (1998). Role of interleukin-6 in uncoupling of bone in vivo in a human squamous carcinoma coproducing parathyroid hormone-related peptide and interleukin-6. *J Bone Miner Res* 13, 664-672.

Naitoh, Y., Fukata, J., Tominaga, T., Nakai, Y., Tamai, S., Mori, K., and Imura, H. (1988). Interleukin-6 stimulates the secretion of adrenocorticotrophic hormone in conscious, freely-moving rats. *Biochem Biophys Res Commun* 155, 1459-1463.

Naka, T., Narazaki, M., Hirata, M., Matsumoto, T., Minamoto, S., Aono, A., Nishimoto, N., Kajita, T., Taga, T., Yoshizaki, K., *et al.* (1997). Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature* 387, 924-929.

Nakagawa, N., Kinoshita, M., Yamaguchi, K., Shima, N., Yasuda, H., Yano, K., Morinaga, T., and Higashio, K. (1998). RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 253, 395-400.

Nakamura, K., Nonaka, H., Saito, H., Tanaka, M., and Miyajima, A. (2004). Hepatocyte proliferation and tissue remodeling is impaired after liver injury in oncostatin M receptor knockout mice. *Hepatology* 39, 635-644.

Nakashima, K., Wiese, S., Yanagisawa, M., Arakawa, H., Kimura, N., Hisatsune, T., Yoshida, K., Kishimoto, T., Sendtner, M., and Taga, T. (1999). Developmental requirement of gp130 signaling in neuronal survival and astrocyte differentiation. *J Neurosci* 19, 5429-5434.

Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J. M., Behringer, R. R., and de Crombrughe, B. (2002). The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108, 17-29.

Narazaki, M., Witthuhn, B. A., Yoshida, K., Silvennoinen, O., Yasukawa, K., Ihle, J. N., Kishimoto, T., and Taga, T. (1994). Activation of JAK2 kinase mediated by the interleukin 6 signal transducer gp130. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 2285-2289.

- Ndubuisi, M. I., Guo, G. G., Fried, V. A., Etlinger, J. D., and Sehgal, P. B. (1999). Cellular physiology of STAT3: Where's the cytoplasmic monomer? *J Biol Chem* 274, 25499-25509.
- Neis, M. M., Peters, B., Dreuw, A., Wenzel, J., Bieber, T., Mauch, C., Krieg, T., Stanzel, S., Heinrich, P. C., Merk, H. F., *et al.* (2006). Enhanced expression levels of IL-31 correlate with IL-4 and IL-13 in atopic and allergic contact dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 118, 930-937.
- Neuner, P., Urbanski, A., Trautinger, F., Moller, A., Kirnbauer, R., Kapp, A., Schopf, E., Schwarz, T., and Luger, T. A. (1991). Increased IL-6 production by monocytes and keratinocytes in patients with psoriasis. *J Invest Dermatol* 97, 27-33.
- Nicholson, S. E., De Souza, D., Fabri, L. J., Corbin, J., Willson, T. A., Zhang, J. G., Silva, A., Asimakis, M., Farley, A., Nash, A. D., *et al.* (2000). Suppressor of cytokine signaling-3 preferentially binds to the SHP-2-binding site on the shared cytokine receptor subunit gp130. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6493-6498.
- Nicolaidou, V., Copeb, A., and Horwood, N. (2009). Monocytes control mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts *Bone Volume 44, Supplement 1*, S48.
- Niu, G., Heller, R., Catlett-Falcone, R., Coppola, D., Jaroszeski, M., Dalton, W., Jove, R., and Yu, H. (1999). Gene therapy with dominant-negative Stat3 suppresses growth of the murine melanoma B16 tumor in vivo. *Cancer Res* 59, 5059-5063.
- Noma, T., Mizuta, T., Rosen, A., Hirano, T., Kishimoto, T., and Honjo, T. (1987). Enhancement of the interleukin 2 receptor expression on T cells by multiple B-lymphotropic lymphokines. *Immunol Lett* 15, 249-253.
- Nosaka, K., Miyamoto, T., Sakai, T., Mitsuya, H., Suda, T., and Matsuoka, M. (2002). Mechanism of hypercalcemia in adult T-cell leukemia: overexpression of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand on adult T-cell leukemia cells. *Blood* 99, 634-640.
- Novotny-Diermayr, V., Zhang, T., Gu, L., and Cao, X. (2002). Protein kinase C delta associates with the interleukin-6 receptor subunit glycoprotein (gp) 130 via Stat3 and enhances Stat3-gp130 interaction. *J Biol Chem* 277, 49134-49142.
- O'Hara, K. A., Kedda, M. A., Thompson, P. J., and Knight, D. A. (2003). Oncostatin M: an interleukin-6-like cytokine relevant to airway remodelling and the pathogenesis of asthma. *Clin Exp Allergy* 33, 1026-1032.
- Okaya, A., Kitanaka, J., Kitanaka, N., Satake, M., Kim, Y., Terada, K., Sugiyama, T., Takemura, M., Fujimoto, J., Terada, N., *et al.* (2005). Oncostatin M inhibits proliferation of rat oval cells, OC15-5, inducing differentiation into hepatocytes. *Am J Pathol* 166, 709-719.
- Ouyang, L., Shen, L. Y., Li, T., and Liu, J. (2006). Inhibition effect of Oncostatin M on metastatic human lung cancer cells 95-D in vitro and on murine melanoma cells B16BL6 in vivo. *Biomed Res* 27, 197-202.
- Owen, M. (1988). Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci Suppl* 10, 63-76.
- Pacifici, R. (1998). Cytokines, estrogen, and postmenopausal osteoporosis--the second decade. *Endocrinology* 139, 2659-2661.
- Palmqvist, P., Persson, E., Conaway, H. H., and Lerner, U. H. (2002). IL-6, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M stimulate bone resorption and regulate the expression of receptor activator of NF-kappa B ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF-kappa B in mouse calvariae. *J Immunol* 169, 3353-3362.

- Palumbo, C. (1986). A three-dimensional ultrastructural study of osteoid-osteocytes in the tibia of chick embryos. *Cell Tissue Res* 246, 125-131.
- Papachristou, D. J., Batistatou, A., Sykiotis, G. P., Varakis, I., and Papavassiliou, A. G. (2003). Activation of the JNK-AP-1 signal transduction pathway is associated with pathogenesis and progression of human osteosarcomas. *Bone* 32, 364-371.
- Parfitt, A. M., Drezner, M. K., Glorieux, F. H., Kanis, J. A., Malluche, H., Meunier, P. J., Ott, S. M., and Recker, R. R. (1987). Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 2, 595-610.
- Park, J. Y., and Pillinger, M. H. (2007). Interleukin-6 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Bull NYU Hosp Jt Dis* 65 *Suppl 1*, S4-10.
- Pederson, L., Ruan, M., Westendorf, J. J., Khosla, S., and Oursler, M. J. (2008). Regulation of bone formation by osteoclasts involves Wnt/BMP signaling and the chemokine sphingosine-1-phosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 20764-20769.
- Pelletier, J. P., and Martel-Pelletier, J. (2003). Oncostatin M: foe or friend? *Arthritis Rheum* 48, 3301-3303.
- Perrigoue, J. G., Li, J., Zaph, C., Goldschmidt, M., Scott, P., de Sauvage, F. J., Pearce, E. J., Ghilardi, N., and Artis, D. (2007). IL-31-IL-31R interactions negatively regulate type 2 inflammation in the lung. *J Exp Med* 204, 481-487.
- Perrigoue, J. G., Zaph, C., Guild, K., Du, Y., and Artis, D. (2009). IL-31-IL-31R interactions limit the magnitude of Th2 cytokine-dependent immunity and inflammation following intestinal helminth infection. *J Immunol* 182, 6088-6094.
- Peters, M., Blinn, G., Solem, F., Fischer, M., Meyer zum Buschenfelde, K. H., and Rose-John, S. (1998a). In vivo and in vitro activities of the gp130-stimulating designer cytokine Hyper-IL-6. *J Immunol* 161, 3575-3581.
- Peters, M., Muller, A. M., and Rose-John, S. (1998b). Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor: direct stimulation of gp130 and hematopoiesis. *Blood* 92, 3495-3504.
- Philip T, B. J., Brunat-Mentigny M, Carrie C, Chauvot P, and Farsi F, (2000). Standards, options, recommandations (SOR) pour le diagnostic, le traitement et la surveillance de l'ostéosarcome. *Bull Cancer* 86: 159-176.
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., and Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-147.
- Propper, D. J., McDonald, A. C., Man, A., Thavasu, P., Balkwill, F., Braybrooke, J. P., Caponigro, F., Graf, P., Dutreix, C., Blackie, R., *et al.* (2001). Phase I and pharmacokinetic study of PKC412, an inhibitor of protein kinase C. *J Clin Oncol* 19, 1485-1492.
- Queen, M. M., Ryan, R. E., Holzer, R. G., Keller-Peck, C. R., and Jorcyk, C. L. (2005). Breast cancer cells stimulate neutrophils to produce oncostatin M: potential implications for tumor progression. *Cancer Res* 65, 8896-8904.
- Richards, C. D. (2004). Matrix catabolism in arthritis: priming the guns with oncostatin M. *J Rheumatol* 31, 2326-2328.
- Richards, C. D., Brown, T. J., Shoyab, M., Baumann, H., and Gauldie, J. (1992). Recombinant oncostatin M stimulates the production of acute phase proteins in HepG2 cells and rat primary hepatocytes in vitro. *J Immunol* 148, 1731-1736.



- Richards, C. D., Kerr, C., Tanaka, M., Hara, T., Miyajima, A., Pennica, D., Botelho, F., and Langdon, C. M. (1997). Regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in fibroblasts and acute phase proteins in hepatocytes in vitro by mouse oncostatin M, cardiotrophin-1, and IL-6. *J Immunol* *159*, 2431-2437.
- Richards, C. D., Langdon, C., Botelho, F., Brown, T. J., and Agro, A. (1996). Oncostatin M inhibits IL-1-induced expression of IL-8 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by synovial and lung fibroblasts. *J Immunol* *156*, 343-349.
- Richards, C. D., Langdon, C., Deschamps, P., Pennica, D., and Shaughnessy, S. G. (2000). Stimulation of osteoclast differentiation in vitro by mouse oncostatin M, leukaemia inhibitory factor, cardiotrophin-1 and interleukin 6: synergy with dexamethasone. *Cytokine* *12*, 613-621.
- Richards, C. D., Shoyab, M., Brown, T. J., and Gauldie, J. (1993). Selective regulation of metalloproteinase inhibitor (TIMP-1) by oncostatin M in fibroblasts in culture. *J Immunol* *150*, 5596-5603.
- Rios, H. F., Ye, L., Dusevich, V., Eick, D., Bonewald, L. F., and Feng, J. Q. (2005). DMP1 is essential for osteocyte formation and function. *J Musculoskelet Neuronal Interact* *5*, 325-327.
- Rodan, G. A., and Martin, T. J. (1981). Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption--a hypothesis. *Calcif Tissue Int* *33*, 349-351.
- Rose, T. M., and Bruce, A. G. (1991). Oncostatin M is a member of a cytokine family that includes leukemia-inhibitory factor, granulocyte colony-stimulating factor, and interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci U S A* *88*, 8641-8645.
- Rose, T. M., Lagrou, M. J., Fransson, I., Werelius, B., Delattre, O., Thomas, G., de Jong, P. J., Todaro, G. J., and Dumanski, J. P. (1993). The genes for oncostatin M (OSM) and leukemia inhibitory factor (LIF) are tightly linked on human chromosome 22. *Genomics* *17*, 136-140.
- Rousselle, A. V., and Heymann, D. (2002). Osteoclastic acidification pathways during bone resorption. *Bone* *30*, 533-540.
- Ruchon, A. F., Tenenhouse, H. S., Marcinkiewicz, M., Siegfried, G., Aubin, J. E., DesGroseillers, L., Crine, P., and Boileau, G. (2000). Developmental expression and tissue distribution of Phex protein: effect of the Hyp mutation and relationship to bone markers. *J Bone Miner Res* *15*, 1440-1450.
- Ruoslahti, E. (1991). Integrins. *J Clin Invest* *87*, 1-5.
- Rutkowski, P., Kaminska, J., Kowalska, M., Ruka, W., and Steffen, J. (2003). Cytokine and cytokine receptor serum levels in adult bone sarcoma patients: correlations with local tumor extent and prognosis. *J Surg Oncol* *84*, 151-159.
- Sandberg, A. A., and Bridge, J. A. (2003). Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: osteosarcoma and related tumors. *Cancer Genet Cytogenet* *145*, 1-30.
- Schajowicz, F. (1993). "Histological typing of bone tumor" Springer-Verlag(2nd ed):10-13.
- Schneider, P., and Tschopp, J. (2000). Apoptosis induced by death receptors. *Pharm Acta Helv* *74*, 281-286.
- Schulz, F., Marenholz, I., Folster-Holst, R., Chen, C., Sternjak, A., Baumgrass, R., Esparza-Gordillo, J., Gruber, C., Nickel, R., Schreiber, S., *et al.* (2007). A common haplotype of the IL-31 gene influencing gene expression is associated with nonatopic eczema. *J Allergy Clin Immunol* *120*, 1097-1102.

- Schulze, E., Witt, M., Kasper, M., Lowik, C. W., and Funk, R. H. (1999). Immunohistochemical investigations on the differentiation marker protein E11 in rat calvaria, calvaria cell culture and the osteoblastic cell line ROS 17/2.8. *Histochem Cell Biol* *111*, 61-69.
- Schuringa, J. J., Dekker, L. V., Vellenga, E., and Kruijer, W. (2001). Sequential activation of Rac-1, SEK-1/MKK-4, and protein kinase Cdelta is required for interleukin-6-induced STAT3 Ser-727 phosphorylation and transactivation. *J Biol Chem* *276*, 27709-27715.
- Schuringa, J. J., Jonk, L. J., Dokter, W. H., Vellenga, E., and Kruijer, W. (2000). Interleukin-6-induced STAT3 transactivation and Ser727 phosphorylation involves Vav, Rac-1 and the kinase SEK-1/MKK-4 as signal transduction components. *Biochem J* *347 Pt 1*, 89-96.
- Siddik, Z. H. (2003). Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* *22*, 7265-7279.
- Sims, N. A., and Gooi, J. H. (2008). Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Semin Cell Dev Biol* *19*, 444-451.
- Sims, N. A., Jenkins, B. J., Quinn, J. M., Nakamura, A., Glatt, M., Gillespie, M. T., Ernst, M., and Martin, T. J. (2004). Glycoprotein 130 regulates bone turnover and bone size by distinct downstream signaling pathways. *J Clin Invest* *113*, 379-389.
- Singh, R., and Lillard, J. W., Jr. (2009). Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Exp Mol Pathol* *86*, 215-223.
- Smolen, J. S., Beaulieu, A., Rubbert-Roth, A., Ramos-Remus, C., Rovensky, J., Alecock, E., Woodworth, T., and Alten, R. (2008). Effect of interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis (OPTION study): a double-blind, placebo-controlled, randomised trial. *Lancet* *371*, 987-997.
- Smyth, D. C., Kerr, C., and Richards, C. D. (2006). Oncostatin M-induced IL-6 expression in murine fibroblasts requires the activation of protein kinase Cdelta. *J Immunol* *177*, 8740-8747.
- Sonkoly, E., Muller, A., Lauerma, A. I., Pivarcsi, A., Soto, H., Kemeny, L., Alenius, H., Dieu-Nosjean, M. C., Meller, S., Rieker, J., *et al.* (2006). IL-31: a new link between T cells and pruritus in atopic skin inflammation. *J Allergy Clin Immunol* *117*, 411-417.
- Stahl, N., Farruggella, T. J., Boulton, T. G., Zhong, Z., Darnell, J. E., Jr., and Yancopoulos, G. D. (1995). Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science* *267*, 1349-1353.
- Stahle-Backdahl, M., Sandstedt, B., Bruce, K., Lindahl, A., Jimenez, M. G., Vega, J. A., and Lopez-Otin, C. (1997). Collagenase-3 (MMP-13) is expressed during human fetal ossification and re-expressed in postnatal bone remodeling and in rheumatoid arthritis. *Lab Invest* *76*, 717-728.
- Starr, R., Willson, T. A., Viney, E. M., Murray, L. J., Rayner, J. R., Jenkins, B. J., Gonda, T. J., Alexander, W. S., Metcalf, D., Nicola, N. A., and Hilton, D. J. (1997). A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* *387*, 917-921.
- Stephanou, A., Brar, B. K., Knight, R. A., and Latchman, D. S. (2000). Opposing actions of STAT-1 and STAT-3 on the Bcl-2 and Bcl-x promoters. *Cell Death Differ* *7*, 329-330.
- Strand, K., Murray, J., Aziz, S., Ishida, A., Rahman, S., Patel, Y., Cardona, C., Hammond, W. P., Savidge, G., and Wijelath, E. S. (2000). Induction of the urokinase plasminogen activator system by oncostatin M promotes endothelial migration. *J Cell Biochem* *79*, 239-248.

- Suda, T., Takahashi, N., and Martin, T. J. (1992). Modulation of osteoclast differentiation. *Endocr Rev* 13, 66-80.
- Suda, T., Takahashi, N., Udagawa, N., Jimi, E., Gillespie, M. T., and Martin, T. J. (1999). Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 20, 345-357.
- Suda, T., Udagawa, N., Nakamura, I., Miyaura, C., and Takahashi, N. (1995). Modulation of osteoclast differentiation by local factors. *Bone* 17, 87S-91S.
- Sutherland, M. K., Geoghegan, J. C., Yu, C., Turcott, E., Skonier, J. E., Winkler, D. G., and Latham, J. A. (2004). Sclerostin promotes the apoptosis of human osteoblastic cells: a novel regulation of bone formation. *Bone* 35, 828-835.
- Swaminathan, R. (2001). Biochemical markers of bone turnover. *Clin Chim Acta* 313, 95-105.
- Taga, T. (1996). Gp130, a shared signal transducing receptor component for hematopoietic and neuropoietic cytokines. *J Neurochem* 67, 1-10.
- Taga, T., Hibi, M., Hirata, Y., Yamasaki, K., Yasukawa, K., Matsuda, T., Hirano, T., and Kishimoto, T. (1989). Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell* 58, 573-581.
- Tai, G., Polak, J. M., Bishop, A. E., Christodoulou, I., and Buttery, L. D. (2004). Differentiation of osteoblasts from murine embryonic stem cells by overexpression of the transcriptional factor osterix. *Tissue Eng* 10, 1456-1466.
- Takahashi-Tezuka, M., Yoshida, Y., Fukada, T., Ohtani, T., Yamanaka, Y., Nishida, K., Nakajima, K., Hibi, M., and Hirano, T. (1998). Gab1 acts as an adapter molecule linking the cytokine receptor gp130 to ERK mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol* 18, 4109-4117.
- Takahashi, N., Akatsu, T., Udagawa, N., Sasaki, T., Yamaguchi, A., Moseley, J. M., Martin, T. J., and Suda, T. (1988). Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. *Endocrinology* 123, 2600-2602.
- Takai, Y., Wong, G. G., Clark, S. C., Burakoff, S. J., and Herrmann, S. H. (1988). B cell stimulatory factor-2 is involved in the differentiation of cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 140, 508-512.
- Takaoka, A., Arai, I., Sugimoto, M., Honma, Y., Futaki, N., Nakamura, A., and Nakaike, S. (2006). Involvement of IL-31 on scratching behavior in NC/Nga mice with atopic-like dermatitis. *Exp Dermatol* 15, 161-167.
- Takaoka, A., Arai, I., Sugimoto, M., Yamaguchi, A., Tanaka, M., and Nakaike, S. (2005). Expression of IL-31 gene transcripts in NC/Nga mice with atopic dermatitis. *Eur J Pharmacol* 516, 180-181.
- Tamura, S., Morikawa, Y., and Senba, E. (2003). Localization of oncostatin M receptor beta in adult and developing CNS. *Neuroscience* 119, 991-997.
- Tanaka-Kamioka, K., Kamioka, H., Ris, H., and Lim, S. S. (1998). Osteocyte shape is dependent on actin filaments and osteocyte processes are unique actin-rich projections. *J Bone Miner Res* 13, 1555-1568.
- Tanaka, M., Hirabayashi, Y., Sekiguchi, T., Inoue, T., Katsuki, M., and Miyajima, A. (2003). Targeted disruption of oncostatin M receptor results in altered hematopoiesis. *Blood* 102, 3154-3162.

- Tanaka, T., and Umesaki, N. (2003). Oncostatin M inhibits decidualization of normal human endometrial stromal cells. *Int J Mol Med* 11, 627-630.
- Tenzer, A., Zingg, D., Rocha, S., Hemmings, B., Fabbro, D., Glanzmann, C., Schubiger, P. A., Bodis, S., and Pruschy, M. (2001). The phosphatidylinositide 3'-kinase/Akt survival pathway is a target for the anticancer and radiosensitizing agent PKC412, an inhibitor of protein kinase C. *Cancer Res* 61, 8203-8210.
- Thornborrow, E. C., and Manfredi, J. J. (1999). One mechanism for cell type-specific regulation of the bax promoter by the tumor suppressor p53 is dictated by the p53 response element. *J Biol Chem* 274, 33747-33756.
- Toppets, V., Pastoret, V., De Behr, V., Antoine, N., Dessy, C., Gabriel, A. (2004). Morphologie, croissance et remaniement du tissu osseux. *Ann Méd Vét* 148, 1-13.
- Toyosawa, S., Shintani, S., Fujiwara, T., Ooshima, T., Sato, A., Ijuhin, N., and Komori, T. (2001). Dentin matrix protein 1 is predominantly expressed in chicken and rat osteocytes but not in osteoblasts. *J Bone Miner Res* 16, 2017-2026.
- Treon, S. P., and Anderson, K. C. (1998). Interleukin-6 in multiple myeloma and related plasma cell dyscrasias. *Curr Opin Hematol* 5, 42-48.
- Turner, C. H., and Pavalko, F. M. (1998). Mechanotransduction and functional response of the skeleton to physical stress: the mechanisms and mechanics of bone adaptation. *J Orthop Sci* 3, 346-355.
- Unni, K. (1996). *Dahlin's bone tumors: Philadelphia : Lippincott-Raven*.
- van Bezooijen, R. L., ten Dijke, P., Papapoulos, S. E., and Lowik, C. W. (2005). SOST/sclerostin, an osteocyte-derived negative regulator of bone formation. *Cytokine Growth Factor Rev* 16, 319-327.
- Vasse, M., Pourtau, J., Trochon, V., Muraine, M., Vannier, J. P., Lu, H., Soria, J., and Soria, C. (1999). Oncostatin M induces angiogenesis in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19, 1835-1842.
- Veldhoen, M., Hocking, R. J., Atkins, C. J., Locksley, R. M., and Stockinger, B. (2006). TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24, 179-189.
- Virchis, A., Ganeshaguru, K., Hart, S., Jones, D., Fletcher, L., Wright, F., Wickremasinghe, R., Man, A., Csermak, K., Meyer, T., *et al.* (2002). A novel treatment approach for low grade lymphoproliferative disorders using PKC412 (CGP41251), an inhibitor of protein kinase C. *Hematol J* 3, 131-136.
- Wadayama, B., Toguchida, J., Shimizu, T., Ishizaki, K., Sasaki, M. S., Kotoura, Y., and Yamamuro, T. (1994). Mutation spectrum of the retinoblastoma gene in osteosarcomas. *Cancer Res* 54, 3042-3048.
- Wagner, E. F. (2002). Functions of AP1 (Fos/Jun) in bone development. *Ann Rheum Dis* 61 *Suppl* 2, ii40-42.
- Walczak, H., and Krammer, P. H. (2000). The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. *Exp Cell Res* 256, 58-66.
- Walker, E. C., McGregor, N. E., Poulton, I. J., Pompolo, S., Allan, E. H., Quinn, J. M., Gillespie, M. T., Martin, T. J., and Sims, N. A. (2008). Cardiotrophin-1 is an osteoclast-derived stimulus of bone formation required for normal bone remodeling. *J Bone Miner Res* 23, 2025-2032.

- Walker, E. C., McGregor, N.E., Poulton, I.J., Solano, M., Zhang, J., Nicola, N.A., Gillespie, M.T., Martin, T.J., and Sims, N.A. (2009). Murine Oncostatin M (mOSM) regulates osetoblastic genes through a novel receptor *Bone Volume 44, Supplement 1, Abstracts from the 2nd Joint Meeting of the International Bone & Mineral Society and the Australian & New Zealand Bone & Mineral Society*, S32.
- Wang, Y., Robledo, O., Kinzie, E., Blanchard, F., Richards, C., Miyajima, A., and Baumann, H. (2000). Receptor subunit-specific action of oncostatin M in hepatic cells and its modulation by leukemia inhibitory factor. *J Biol Chem* 275, 25273-25285.
- Wang, Z. Q., Ovitt, C., Grigoriadis, A. E., Mohle-Steinlein, U., Ruther, U., and Wagner, E. F. (1992). Bone and haematopoietic defects in mice lacking c-fos. *Nature* 360, 741-745.
- Weiss, T. W., Samson, A. L., Niego, B., Daniel, P. B., and Medcalf, R. L. (2006). Oncostatin M is a neuroprotective cytokine that inhibits excitotoxic injury in vitro and in vivo. *Faseb J* 20, 2369-2371.
- Weissenbach, J., Chernajovsky, Y., Zeevi, M., Shulman, L., Soreq, H., Nir, U., Wallach, D., Perricaudet, M., Tiollais, P., and Revel, M. (1980). Two interferon mRNAs in human fibroblasts: in vitro translation and Escherichia coli cloning studies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 7152-7156.
- Wennberg, C., Hesse, L., Lundberg, P., Mauro, S., Narisawa, S., Lerner, U. H., and Millan, J. L. (2000). Functional characterization of osteoblasts and osteoclasts from alkaline phosphatase knockout mice. *J Bone Miner Res* 15, 1879-1888.
- Wittrant, Y., Theoleyre, S., Chipoy, C., Padrines, M., Blanchard, F., Heymann, D., and Redini, F. (2004). RANKL/RANK/OPG: new therapeutic targets in bone tumours and associated osteolysis. *Biochim Biophys Acta* 1704, 49-57.
- Wu, X., McKenna, M. A., Feng, X., Nagy, T. R., and McDonald, J. M. (2003). Osteoclast apoptosis: the role of Fas in vivo and in vitro. *Endocrinology* 144, 5545-5555.
- Yagi, Y., Andoh, A., Nishida, A., Shioya, M., Nishimura, T., Hashimoto, T., Tsujikawa, T., Saito, Y., and Fujiyama, Y. (2007). Interleukin-31 stimulates production of inflammatory mediators from human colonic subepithelial myofibroblasts. *Int J Mol Med* 19, 941-946.
- Yamasaki, K., Taga, T., Hirata, Y., Yawata, H., Kawanishi, Y., Seed, B., Taniguchi, T., Hirano, T., and Kishimoto, T. (1988). Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor. *Science* 241, 825-828.
- Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K., Kinosaki, M., Mochizuki, S., Tomoyasu, A., Yano, K., Goto, M., Murakami, A., *et al.* (1998). Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3597-3602.
- Yasukawa, H., Misawa, H., Sakamoto, H., Masuhara, M., Sasaki, A., Wakioka, T., Ohtsuka, S., Imaizumi, T., Matsuda, T., Ihle, J. N., and Yoshimura, A. (1999). The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. *Embo J* 18, 1309-1320.
- Yoshimoto, T., Morishima, N., Mizoguchi, I., Shimizu, M., Nagai, H., Oniki, S., Oka, M., Nishigori, C., and Mizuguchi, J. (2008). Antiproliferative activity of IL-27 on melanoma. *J Immunol* 180, 6527-6535.
- Yoshimura, A., Ichihara, M., Kinjyo, I., Moriyama, M., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Hara, T., and Miyajima, A. (1996). Mouse oncostatin M: an immediate early

gene induced by multiple cytokines through the JAK-STAT5 pathway. *Embo J* 15, 1055-1063.

You, L., Temiyasathit, S., Lee, P., Kim, C. H., Tummala, P., Yao, W., Kingery, W., Malone, A. M., Kwon, R. Y., and Jacobs, C. R. (2008). Osteocytes as mechanosensors in the inhibition of bone resorption due to mechanical loading. *Bone* 42, 172-179.

Young, D. R., and Kobluk, C. N. (1995). Disease of Bone. The horse: disease and clinical management, 737-790.

Zarling, J. M., Shoyab, M., Marquardt, H., Hanson, M. B., Lioubin, M. N., and Todaro, G. J. (1986). Oncostatin M: a growth regulator produced by differentiated histiocytic lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 9739-9743.

Zeng, R., Aoki, Y., Yoshida, M., Arai, K., and Watanabe, S. (2002). Stat5B shuttles between cytoplasm and nucleus in a cytokine-dependent and -independent manner. *J Immunol* 168, 4567-4575.

Zhang, K., Barragan-Adjemian, C., Ye, L., Kotha, S., Dallas, M., Lu, Y., Zhao, S., Harris, M., Harris, S. E., Feng, J. Q., and Bonewald, L. F. (2006). E11/gp38 selective expression in osteocytes: regulation by mechanical strain and role in dendrite elongation. *Mol Cell Biol* 26, 4539-4552.

Zhang, Q., Putheti, P., Zhou, Q., Liu, Q., and Gao, W. (2008). Structures and biological functions of IL-31 and IL-31 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 19, 347-356.

Zhang, X., Blenis, J., Li, H. C., Schindler, C., and Chen-Kiang, S. (1995). Requirement of serine phosphorylation for formation of STAT-promoter complexes. *Science* 267, 1990-1994.

Zhang, X. G., Gu, J. J., Lu, Z. Y., Yasukawa, K., Yancopoulos, G. D., Turner, K., Shoyab, M., Taga, T., Kishimoto, T., Bataille, R., and et al. (1994). Ciliary neurotropic factor, interleukin 11, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M are growth factors for human myeloma cell lines using the interleukin 6 signal transducer gp130. *J Exp Med* 179, 1337-1342.

Zhao, C., Irie, N., Takada, Y., Shimoda, K., Miyamoto, T., Nishiwaki, T., Suda, T., and Matsuo, K. (2006). Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis. *Cell Metab* 4, 111-121.

Zhao, S., Zhang, Y. K., Harris, S., Ahuja, S. S., and Bonewald, L. F. (2002). MLO-Y4 osteocyte-like cells support osteoclast formation and activation. *J Bone Miner Res* 17, 2068-2079.

Zilberstein, A., Ruggieri, R., Korn, J. H., and Revel, M. (1986). Structure and expression of cDNA and genes for human interferon-beta-2, a distinct species inducible by growth-stimulatory cytokines. *Embo J* 5, 2529-2537.

# **ANNEXE**

# Novel Anti-Cancer Strategy in Bone Tumors by Targeting Molecular and Cellular Modulators of Bone Resorption

Brounais Bénédicte, Ruiz Velasco Carmen, Rousseau Julie, Lamoureux François, Blanchard Frédéric, Heymann Dominique and Redini Françoise\*

<sup>1</sup>INSERM, ERI 7, Nantes, F-44035 France, <sup>2</sup>Université de Nantes, Nantes atlantique universités, Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, EA3822, Nantes, F-44035 France

Received: May 22, 2008; Accepted: August 29, 2008; Revised: September 4, 2008

**Abstract:** Tumor cells alter the balanced process of bone formation and bone resorption mediated respectively by osteoblasts and osteoclasts, leading to the disruption of the normal equilibrium and resulting in a spectrum of osteolytic to osteoblastic lesions. This review will summarize research on molecules that play direct and essential roles in the differentiation and activity of osteoclasts, and the role of these molecules in bone destruction caused by cancer. Results from experimental models suggest that the Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand (RANKL), a member of the TNF superfamily is a common effector of bony lesions in osteolysis caused by primary and secondary bone tumors. Therefore, osteoclast represents an attractive target across a broad range of tumors that develop in bone. Elucidation of the mechanisms of RANKL interactions with its activator (RANK) and decoy (osteoprotegerin: OPG) receptors has enabled the development of pharmacological inhibitors of RANKL (and of its signalling pathway) which have been recently patented, with potential for the treatment of cancer-induced bone disease. Blocking bone resorption by specific other drugs such as bisphosphonates, inhibitors of cathepsin K (the main enzyme involved in bone resorption mechanisms) or signalling pathways regulating osteoclast differentiation and activation is also a promising target for the treatment of osteolysis associated to bone tumors.

**Keywords:** Bone resorption, primary bone tumor, bone metastase, RANKL, bisphosphonate.

## INTRODUCTION

Skeletal-related complications occur commonly in many solid tumors including primary or secondary tumors (osteosarcoma, Ewing sarcoma, multiple myeloma, breast, prostate and lung carcinoma). The maintenance of skeletal integrity in a healthy individual requires a balanced regulation in the processes of bone formation and bone resorption mediated respectively by osteoblasts and osteoclasts. This balanced process becomes altered by tumor cells leading to the disruption of the normal equilibrium resulting in a spectrum of osteolytic to osteoblastic lesions. Indeed, based on their radiographic appearance, bone lesions caused by multiple myeloma are primarily lytic, whereas breast cancer, osteosarcoma and Ewing sarcoma may cause lytic, mixed, or osteosclerotic lesions, and prostate cancer lesions are usually classified as osteoblastic or osteosclerotic. However, these classifications may be over-simplified and represent two extremes of a continuum. Bony lesions that develop secondarily to malignancies are a major clinical problem, as between 70 and 95% of patients with multiple myeloma and up to 75% of patients with advanced breast or prostate cancer develop bone metastases [1,2]. The clinical consequences of bone metastases can be devastating and include severe bone pain, pathologic fractures, hypercalcemia, cytopenia and neurological impairment resulting from disease impinging on nerves, as in spinal cord compression

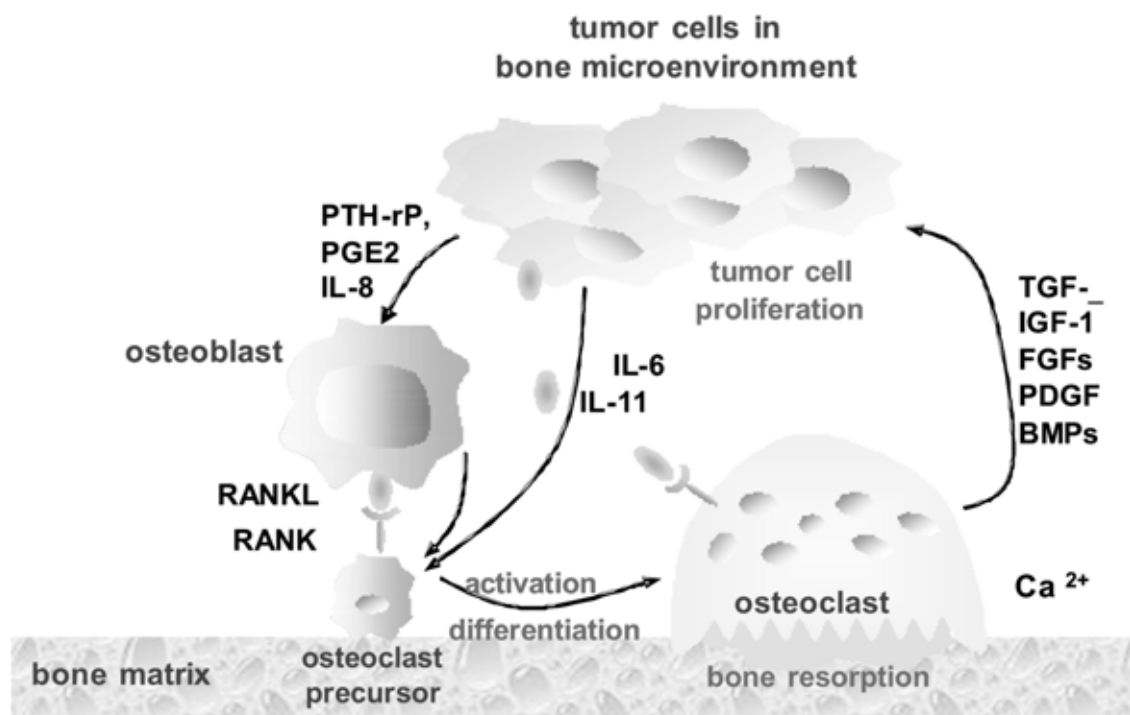
syndromes [2,3]. Osteosarcoma and Ewing's sarcoma are the two most frequent malignant primary bone tumors in adolescent and young adults with a peak incidence at respectively 18 and 15 years old. Although these tumors display different cell origin, they both induce bone remodelling alterations with extensive bone destruction that can result in bone pain and pathological fractures [4,5].

It has become clear that the tropism of certain tumors to metastasize to bone is encouraged by the bone microenvironment which contains a wealth of growth factors that could promote the engraftment and proliferation of cancer cells (Fig. 1). This "seed and soil relationship" is based on the hypothesis that a reciprocal interaction between tumor cells and the bone microenvironment is necessary for the colonization and expansion of tumor cells in bone and that bone resorption plays a critical role in this process. Localisation of tumor cells in the bone microenvironment leads to the production of tumor associated factors either synthesized directly by the tumor cells or as a result of stroma/tumor interactions. The tumor associated factors converge on the pre-osteoblasts or stromal cells to cause increase of osteoclast activating factors which ultimately results in excessive osteoclastogenesis.

For example, tumor cells secrete parathyroid hormone related peptide (PTH-rP) which is the primary stimulator of osteoblast production of receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand (RANKL), a major osteoclast activating factor which leads to increased formation, activation and survival of osteoclasts, and resulting osteolytic lesions. Osteolysis process then leads to the release of growth factors stored in

\*Address correspondence to this author at the INSERM ERI 7 - EA 3822, Physiopathologie de la Résorption osseuse et thérapie des tumeurs osseuses primitives, Faculté de Médecine, 1 rue gaston Veil, 44035 Nantes cedex 1, France; Tel: +33 272 641 142; E-mail: francoise.redini@univ-nantes.fr





**Fig. (1).** Vicious cycle between tumor growth and bone resorption.

Tumor cells secrete bone-modulating compounds such as parathyroid hormone-related protein (PTH-rP) or cytokines such as Interleukin-6 (IL-6) or IL-11 that directly or indirectly (via osteoblasts) activate bone resorption via the expression of the pro-resorptive cytokine Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand (RANKL). Growth factors such as Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) and Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) are released from the bone matrix further stimulating tumor growth.

the bone matrix, including transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) or Insulin-like growth factor 1 (IGF-1). In turn, these factors increase the production of PTH-rP or promote tumor growth directly. In addition, bone destruction increases local extracellular calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) concentrations, which have also been shown to promote tumor growth and the production of PTH-rP.

Because bone tumors lead to severe clinical and substantial economic consequences, the pathophysiology of bone lesions from primary and secondary bone tumors have been a focus of research. This review will summarize research on molecules that play direct and essential roles in the differentiation and activity of osteoclasts, the cells responsible for bone resorption, and the role of these molecules in the bone destruction caused by cancer.

#### MECHANISMS INVOLVED IN REGULATION OF OSTEOCLASTOGENESIS: THE OPG/RANKL/RANK TRIAD

Among osteoclast activating factors, RANKL, a member of the Tumor Necrosis Factor (TNF) superfamily is the key mediator in the vicious cycle hypothesis of bone destruction in metastatic and primary bone cancer. A major breakdown in bone cell biology was the identification of this cytokine which is abundantly produced by osteoblasts, stimulates osteoclastic lineage commitment, promotes osteoclast maturation and functions and prolongs survival which together enhance bone resorption. RANKL binds to RANK, a member of the TNF receptor (TNFR) superfamily that is

expressed on osteoclastic lineage cells. The pro-resorptive effects of RANKL are counter-balanced by the endogenous decoy receptor osteoprotegerin also produced by osteoblasts. Alterations of the RANKL/OPG balance have been implicated in a spectrum of skeletal diseases characterized by excessive osteoclastic activity including bone tumors. RANKL has been implicated in bone metastasis resulting from a wide spectrum of tumor types including breast, prostate, neuroblastoma, multiple myeloma, thyroid, renal and lung [6]. Results from experimental models suggest that RANKL is a common effector of bony lesions in osteolysis caused by primary and secondary bone tumors. Therefore, osteoclast activity may be a requisite element of both osteolytic and osteoblastic lesions, making this cell an attractive target across a broad range of tumors that develop in bone. Elucidation of the mechanisms of RANKL interactions with its activator (RANK) and decoy (osteoprotegerin: OPG) receptors has enabled the development of pharmacological inhibitors of RANKL (and of its signalling pathway) with potential for the treatment of cancer-induced bone disease.

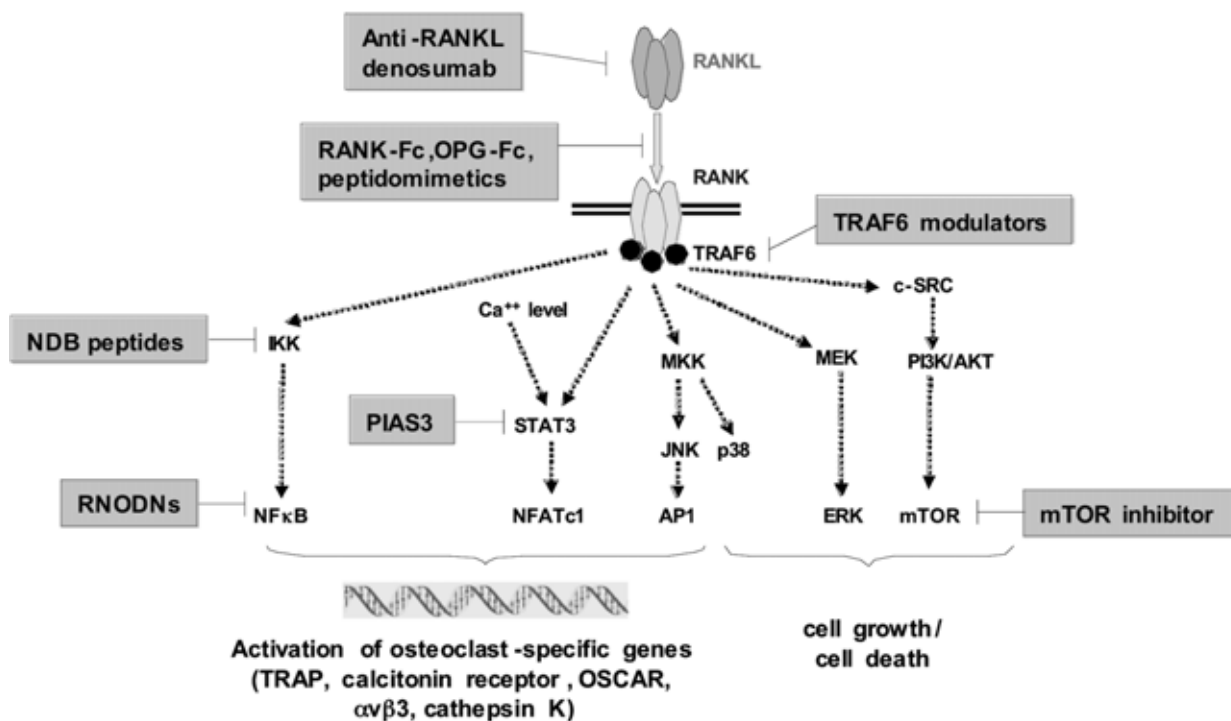
The first important signal transducers of RANK is TNF Receptor activating factor 6 (TRAF6), which is the only TRAF family member participating in both the TNFR superfamily and the Interleukin-1 receptor (IL-1R)/Toll-like receptor superfamily, hence indicating its fundamental importance for a variety of immunological pathways. The structural determinant of the RANK-TRAF6 interaction reveals a Pro-X-Glu-X-X-(aromatic/acidic residue) TRAF6

binding motif. NF- $\kappa$ B, a final effector of the RANK signalling pathway is activated after dissociation from the inhibitory protein I $\kappa$ B $\alpha$ , which itself is permitted after I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation by the upstream I $\kappa$ B kinase (IKK). Phospholipase C $\gamma$ -mediated Ca<sup>2+</sup> signalling comprises another main pathway involved in osteoclastogenesis which is initiated by RANKL binding to the osteoclast costimulatory receptors paired immunoglobulin-like receptor A (IR-A), osteoclast-associated receptor (OSCAR), triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM), and signal-regulatory protein (SIRP)-b1.

### ACTIVATION OF OSTEOBLASTS

Bone formation is regulated by endocrine factors such as sex steroids, parathyroid hormone, calcitriol and leptin as well as by local factors such as bone morphogenetic proteins (BMPs), transforming growth factors (TGF), fibroblast growth factors (FGFs) [7], platelet-derived growth factor (PDGF), insulin-like growth factors (IGFs), epidermal growth factor (EGF), Indian Hedgehog (Ihh) and the Wnt family of secreted glycoproteins. Many of these hormones and local factors exert their effects through various transcription factors including runt-related transcription factor 2 (runx2)/core-binding factor alpha 1 (cbfa1), osterix, dlx-5, msx-2, Hoxa-2, Bapx1 and activator protein (AP)-1 and thereby initiate expression of multiple osteoblast-specific proteins [8,9]. BMPs belong to the TGF- $\beta$  super-

family and are crucial regulators of skeletal development including osteoblast and chondrocyte differentiation, cartilage and bone formation, mesoderm patterning, and craniofacial and limb development [10]. Especially BMP-2, -4 and -7 have been shown to induce osteoblast differentiation. Upon binding to the respective type I or type II serine/threonine kinase receptors BMP-signals are mediated by Smad proteins. BMP-specific receptor-regulated Smads (R-Smads; Smad1, 5, 8) become phosphorylated and form heteromeric complexes with Smad4. This complex then translocates into the nucleus to regulate transcription of various target genes. The Smad signalling cascade is further influenced by inhibitory Smads (I-Smads: Smad6, 7). Moreover, BMPs have been shown to mediate signals through the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway, activating TAK1/TAB1 and its downstream targets ERK1/2, p38 and JNK (-). BMP-2, -4 and -7 show promising results in trials of accelerating fracture healing and periodontal diseases [11-13]. Lately, BMPs have also been linked to inflammatory diseases. Human mesenchymal stromal cells treated with activated T cell-conditioned media differentiate into osteoblasts. This process is accompanied by an induction of BMP-2 expression, suggesting an explanation for heterotopic calcification in some inflammatory diseases [14]. On the other hand, BMP-4 and -5 levels were found to be down-regulated in the synovial tissue of patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis [15], thus



**Fig. (2).** Molecular pathways inducing osteoclastogenesis and sites of action of select inhibitory molecules.

AKT: protein kinase B, AP1: activator protein-1, ERK: extracellular signal-regulated kinase, IKK: I $\kappa$ B kinase, JNK: c-Jun N-terminal kinase, MEK: mitogen-activated protein kinase, MKK: mitogen-activated protein kinase kinase, NDB: NEMO-binding domain, NFATc1: nuclear factor of activated T cells c1, NF- $\kappa$ B: Nuclear Factor-kappa B, OPG: osteoprotegerin, OSCAR: osteoclast-associated receptor, PI3K: phosphatidylinositol 3'-kinase, PIAS: protein inhibitor of activated signal transducer and activator of T cells (STAT), RANKL: Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand, RNODNs: exonuclease-resistant ribbon-type NF- $\kappa$ B decoy oligonucleotides, mTOR: mammalian Target of Rapamycin, TRAF: TNF Receptor Associated Factor, TRAP: tartrate resistant acid phosphatase.

indicating that the spectrum of pathologic conditions to be treated with specific BMPs seems to be limited or, at least, depends on the microenvironmental situation. BMP signalling can be dampened by many inhibitors including extracellular BMP binding proteins which interfere with the BMP-BMP receptor interaction, intracellular inhibitors such as the inhibitory Smads and intracellular Smad-binding proteins, and by the ubiquitination and proteasomal degradation of BMP signalling effectors. Noggin, members of the chordin family, twisted gastrulation and the members of the Dan family are extracellular BMP antagonists whereas the BMP and activin bound protein (BAMBI), Smad 6/7 and intracellular Smad1/5/8-binding proteins such as c-Ski, SnoN, Tob and p300/CBP, belong to the non signaling membrane BMP pseudoreceptors and intracellular BMP antagonists. However, the wide distribution of BMPs and their receptors make a tissue-specific approach difficult to achieve.

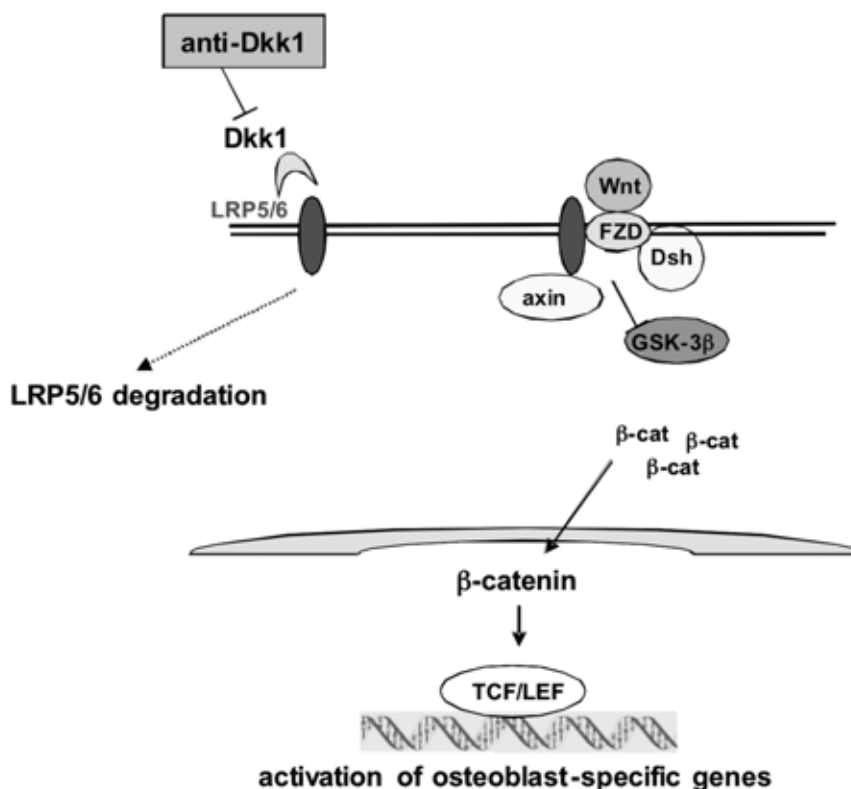
Subpopulations of breast cancer cell lines with a high bone metastatic potential have been analyzed and shown to express a variety of genes that confer high capacity to metastasize to bone [16]. These genes include IL-11, connective tissue growth factor (CTGF), the chemokine receptor CXCR4 and matrix metalloproteinase 1 (MMP-1) among others. CXCR4 is a homing receptor expressed on cancer cells which binds the osteoblast secreted ligand stromal derived factor-1 (SDF-1). IL-11 stimulates osteolysis while CTGF stimulates angiogenesis and osteoblast proliferation. MMP-1 can cleave collagen at the bone surface to make the site more palatable for osteoclastic bone resorption. Several of these genes (IL-11 and CTGF) are known targets of TGF- $\beta$  signalling. TGF- $\beta$  plays a dual role in malignancy: as a tumor suppressor in normal epithelial cells and prometastatic factor in transformed cells. It is stored in bone matrix and released during osteoclastic resorption [17]. However, TGF- $\beta$  may stimulate osteolytic and growth-promoting factors such as IL-11, PTH-rP and CTGF by the tumor cells that ultimately result in bone destruction Fig. (1).

Wnt proteins are important in embryonic morphogenesis and in mature tissues are involved in stem cell renewal and osteoblast differentiation among other roles. Activation of Wnt signalling occurs through binding of the Wnt ligand to a frizzled receptor and the low-density lipoprotein 5 or 6 (LRP5/6) co-receptor which ultimately leads to stabilisation of  $\beta$ -catenin. Active  $\beta$ -catenin translocates to the nucleus and interacts with the T-cell factor/lymphocyte-enhancing factor family of transcription factors leading to transcriptional activation. Wnt signalling plays a major role in bone: activating mutations of LRP5 cause high bone mass and loss-of-function mutations results in osteoporosis-pseudoglioma syndrome [18]. Dickkopf-1 (DKK1) has been identified as an inhibitor of the Wnt signalling pathway. DKK1 inhibits Wnt signalling by binding to LRP5/6 and sequestering this co-receptor away from the Wnt/frizzled complex. The role of DKK1 in skeletal metastases and multiple myeloma is an important area of active investigation. DKK1 was increased in bone marrow from patients with multiple myeloma and may be responsible for the suppressed bone formation and enhanced osteolysis that is characteristic of this disorder [19].

## GENERAL ANTI-BONE RESORPTION DRUGS

Several rodent models of tumor-induced osteolytic lesions exist and pharmacologic inhibition of RANKL in these models has clearly demonstrated the penultimate role of RANKL in these bony lesions. The two main strategies for direct interaction with RANKL with the aim of inhibiting its binding to RANK are based on (i) a neutralizing antibody to RANKL and (ii) its natural inhibitor OPG. RANK-Fc which also has been used for RANKL inhibition works as a decoy receptor as well [20]. Both main alternatives have already been tested.

- **denosumab**: A fully human monoclonal antibody against RANKL termed denosumab is in clinical trial phase III [21]. One advantage of denosumab-based therapy consists in the absence of adverse side effects on the immune system, as known so far [22]. Denosumab (AMG 162) is a fully human monoclonal IgG2 antibody to human RANKL that is currently in late-stage clinical trials for post-menopausal osteoporosis and cancer-induced bone diseases. Denosumab binds to RANKL and prevents the interaction of RANKL and RANK in a way that parallels the properties of native OPG and its engineered variants. The antibody selectively binds RANKL and does not cross-react with TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , CD40 ligand or TNF Related Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL) [23]. Preclinical studies of denosumab in cynomolgus monkeys have shown that denosumab treatment resulted in dose-dependent responses, including a decrease in bone resorption markers and an increase in bone mineral density [24]. Because of its potent ability to inhibit mature osteoclast function as well as osteoclast differentiation, it was hypothesized that denosumab would inhibit the osteoclast-tumor cell axis and suppress tumor-induced bone turnover and, potentially, bone lesions. This hypothesis has been tested in a phase 1, double-blind dose escalation trial in patients with either multiple myeloma or radiologically confirmed breast cancer-related bone metastases. Patients were randomized to receive a single subcutaneous injection of denosumab (n = 49), at doses ranging from 0.1 to 3.0 mg/kg, as compared to 90 mg intravenous pamidronate (n = 5) [25,26]. The pharmacodynamic (PD) effect of denosumab on bone resorption was assessed by measuring the change from baseline in the level of the bone resorption marker, urine NTX/creatinine (uNTX/Cr). Denosumab pharmacokinetics (PK) and safety were also evaluated. Denosumab treatment resulted in a rapid, dose-dependent decline in uNTX/Cr which was observed within 24 h and persisted throughout the 3-months study. Patients treated with 0.3 to 3 mg/kg denosumab experienced maximal median decreases of 75 to 80% in uNTX/Cr, comparable with a 77% maximum decrease observed with pamidronate. The changes in uNTX/Cr from baseline were similar between the myeloma and breast cancer patients. The suppression of bone resorption following a single denosumab administration appeared to last longer than suppression with a single dose of pamidronate. In this oncology study, denosumab demonstrated dose-dependent, non linear pharmacokinetics. Denosumab was detectable in serum as early as 1 h after administration. Mean maximum serum concentrations, which varied widely depending on the dose, occurred 7 to 21 days after administration. After peaking, serum concentrations declined slowly, with mean half-lives that increased from 31 to 46



**Fig. (3).** Wnt signalling and possible therapeutic interventions.

Upon binding of Wnt proteins to Frizzled (FZD) and low density lipoprotein receptor-related protein (LRP)5/6, signals are mediated through axin, frat-1 and dsh, which inhibit glycogen synthase kinase (GSK)-3 $\beta$  activity. Thereby,  $\beta$ -catenin ( $\beta$ -cat) is stabilized, accumulates and translocates into the nucleus where it acts as a co-factor for transcription factors such as T cell factor (TCF) and lymphoid enhancer factor (LEF) and induces the transcription of specific target genes. The interaction of Wnt/FZD/LRP5/6 can be disrupted by the binding of dickkopf (Dkk)1 to LRP5/6. GSK-3 $\beta$  activity is then not inhibited and results in the ubiquitination and degradation of  $\beta$ -catenin. Using inhibitors of Dkk1 could facilitate the promotion of Wnt signalling and consecutive enhancement of osteoblast function.

days at doses of 0.3 to 3 mg/kg, respectively. The favourable PK/PD profile of denosumab suggests the potential for infrequent subcutaneous dosing in this setting. No treatment-related serious adverse events or development of anti-denosumab antibodies was observed.

- **OPG peptidomimetics:** The pleiotropic effects of recombinant human OPG-Fc on osteoclast development, activation, and survival all contribute to its antiresorptive effects. However, an unwanted side-effect of OPG is its binding to TRAIL) especially when used to treat tumor-associated osteolysis. Indeed, by binding to OPG, TRAIL loses its apoptotic activity, which results in a cancer-promoting effect of OPG in the context of several tumor types [27,28]. To overcome this draw-back, OPG-like peptidomimetics (a chimeric protein fused with an Fc antibody fragment) have been recently established [29,30]. These OPG-like peptidomimetics (OP3-4) were demonstrated to be capable of inhibiting myeloma bone disease in a rodent model [30]. TNFR loop peptides exhibit a very similar way of action [31-33].

Another approach to dampen RANKL expression was performed by linking RANKL covalently to virus-like particles. Mice immunized with antigen were highly resistant to bone loss in a model of osteoporosis [34, 35].

- **blocking RANKL-RANK pathway:** Although blocking the signalling pathway must be considered to be a critical endeavour as most of these are not exclusive for a single receptor, considerable efforts have been undertaken to interfere with the downstream signal transducers of RANK Fig. (2). Cell-permeable peptides with the Pro-X-Glu-X-X-TRAF6 binding motif could be useful as therapeutic modulators of TRAF6 signalling [36]. Another downstream candidate for therapeutic targeting is NF- $\kappa$ B, a critical transcription factor for both osteoclastogenesis and inflammation [37]. By generating a short peptide termed NEMO-binding domain (NBD) peptide, it was made possible to attenuate IKK complex assembly and to arrest RANKL-induced osteoclastogenesis [38]. Other promising mechanisms to inhibit NF- $\kappa$ B signalling include (i) exonuclease-resistant ribbon-type NF- $\kappa$ B decoy oligonucleotides (RNODNs), (ii) a 4-nitroimidazole derivate, that specifically inhibits the RANKL-induced pathways and thus osteoclast activation and (iii) the synthetic NF- $\kappa$ B inhibitor dehydroxymethyl-epoxyquinomycin which down-regulates the major downstream transcription factor nuclear factor of activated T cells (NFAT)c1 [39, 40]. However, the toxicity of these novel substances and/or mutagenic and teratogenic potential remains to be clarified. Hence, there is a great demand for information about their compatibility and biosecurity before considering clinical relevance. TNF $\alpha$  has also been shown to

act on osteoclast precursor cells through PIR-A [41], thus constituting one of the targets of anti-TNF therapies. Direct inhibition of TREM2 activation by an anti-TREM2 antibody resulted in the inhibition of osteoclast differentiation and therefore proved a potential candidate for antiresorptive therapy [42]. Signaling through NFAT implicates the serine/threonine phosphatase calcineurin. Thus, targeting calcineurin by specific inhibitors such as cyclosporine A or FK506 is a very effective tool to suppress osteoclastogenesis. Despite this strong depressive action on osteoclastogenesis, also a down-regulation osteoblastogenesis through inhibition of NFATc1 activity has been reported, causing a syndrome called post-transplantation osteoporosis in patients receiving calcineurin inhibitor-based immunosuppressive therapy in the course of post-transplantation regimens [43, 44]. The anti-resorptive property of another important immunosuppressive drug, leflunomide is attributable to inhibition of RANKL-induced  $Ca^{2+}$ -signaling resulting in a strongly diminished induction of NFATc1 [45]. Targeting of two separate signalling pathways in osteoclastogenesis, namely RANKL-induced activation of the kinases extracellular signal-regulated kinase (ERK) and Akt, which converge on the transcription factors c-Fos and NFATc1, holds promise of another new way of shutting down osteoclast development. For instance, strontium ranelate, an effective anti-resorptive drug in the therapy of post-menopausal osteoporosis, activates cell replication and downstream ERK1/2 signaling in addition to activating the calcium-sensing receptor of osteoblasts. Besides these stimulatory effects on osteoblastogenesis, strontium ranelate upregulates OPG and decreases RANKL expression in human osteoblasts [46]. As osteoclast differentiation depends on costimulatory receptor activation and is finally governed by NFATc1 activity, down-regulation of NFATc1 and OSCAR expressions was achieved by overexpression of protein inhibitor of activated signal transducer and activator of T cells (STAT)-3 (PIAS3) in bone marrow-derived mono-cyte/macrophage lineage cells, thus attenuating osteoclast formation. As proof of principle, silencing of PIAS3 using siRNAs was shown to enhance osteoclast formation [47].

- **Bisphosphonates** (BPs) which are potent inhibitors of osteoclast activity and bone resorption have been shown to reduce the frequency of skeletal-related events (SRE) associated with bone metastases. Among BPs, zoledronic acid, a third generation BP, has the strongest inhibitory activity against bone resorption and is the only BP that has demonstrated statistically significant reductions of SRE due to metastatic bone lesions from various cancers [48]. They selectively affect osteoclasts *in vivo* but also have the potential to directly affect tumor cells. These compounds have high affinity for calcium ions and therefore target bone mineral, where they appear to be internalized selectively by bone-resorbing osteoclasts and inhibit osteoclast function. The nitrogen-containing bisphosphonates (alendronate, ibandronate, pamidronate, risedronate and zoledronic acid) act by inhibiting farnesyl diphosphate synthase, an enzyme of the mevalonate pathway which disrupts osteoclast function by preventing the prenylation of GTPase signalling proteins [49]. BPs that lack a nitrogen have a different mode of action that involves primarily the formation of cytotoxic metabolites in osteoclasts. The intravenous BPs pamidronate

and zoledronate are approved by the US food and drugs administration for the treatment of bone metastases, multiple myeloma and hypercalcemia of malignancy. As such, BPs, particularly intravenous formulations have become standard of care for multiple myeloma as well as patients with breast or prostate cancer who have experienced skeletal related adverse events. In several clinical trials, intravenous BP use in advance prostate cancer has been shown to be of benefit in randomized placebo-controlled trials. Patients who received zoledronic acid at 4 mg every 3 weeks for 15 months had fewer SRE (33% versus 44% in the placebo group) and had a prolonged median time to first SRE which was defined as pathologic bone fractures, spinal cord compression, surgery to bone or a change of antineoplastic therapy to treat bone [50]. In addition, long-term reductions in bone pain were reported with the use of zoledronic acid. Women with advance breast cancer and bone metastases had a 20% less risk of developing a SRE for 4 mg zoledronic acid compared with pamidronate in a noninferiority trial [51]. Both agents appeared to be of similar efficacy at reducing SRE in patients with multiple myeloma [51]. The oral BP clodronate has been approved for use in bone metastases outside the US and trials are underway regarding the use of ibandronate. There are limited data regarding improved survival with BPs. A study of oral clodronate in patients with operable breast cancer showed improved bone relapse-free survival at 5 years and a trend toward increased survival. ZOL has the strongest inhibitory activity against bone resorption and it is the only BP that has demonstrated statistically significant reductions of SREs due to metastatic bone lesions from various cancers [48]. In addition zoledronic acid has also been demonstrated to exhibit direct anti-tumor effects not only the inhibition of proliferation and induction of apoptosis in cultured cancer cells, but additionally interference with cancer cell adhesion to the bone matrix and inhibition of cell migration and invasion [52]. Moreover, zoledronic acid is an attractive additional agent in current combination chemotherapy. In order to maximize the anti-cancer potential of zoledronic acid, the future challenge must be on optimizing dosing regimens and drug combinations with standard anti-neoplastic agents. [53-56]- **cathepsin K inhibitors**: Other potential pathways that are being targeted and primarily in preclinical studies include cathepsin K, an enzyme involved in collagen breakdown during bone resorption. Cathepsin K is a proteinase that is secreted by osteoclasts and degrades bone. Immunohistochemistry revealed that cathepsin K is expressed also by breast cancer cells that metastasize to bone. A recent publication reported that intratibial injection with cathepsin K-expressing human BT474 breast cancer cells, tumor bearing mice treated with a clinical dosing regimen of cathepsin K inhibitor had osteolytic lesions that were 79% smaller than those of tumor-bearing mice treated with the vehicle [57]. Thus cathepsin K inhibitor may render the bone a less favourable microenvironment for tumor growth by inhibiting bone resorption.

## ENHANCERS OF OSTEOBLAST ACTIVITY

Recently, discovery of novel proteins regulating osteoblast proliferation and differentiation resulted in the identification of so far unknown intervention points, thus providing a platform for new options to enhance osteoblast activity, thereby counteracting bone loss. Although all of the

molecules regulating osteoblast activation are imperative for bone maintenance, not all signalling cascades provide appropriate opportunities for therapeutic interventions. For example, despite the well known role of IGFs in bone tissue homeostasis, their ubiquitous expression makes a targeted bone-specific approach impossible.

- **BMPs**: there are no published data about the use of BMP enhancing molecules in human clinical trials. Nevertheless, future research will perhaps open new avenues in increasing BMP signalling in bone loss diseases.[58]

- **transforming growth factor  $\beta$** : Recent data suggest that blockade of TGF- $\beta$  may result in a decrease in tumor production of osteolytic factors such as IL-11, PTH-rP, CTGF and therefore may have a role in treating osteolytic bone metastases in breast cancer [59]. Further, inhibition of TGF- $\beta$  type I receptor kinase decreases metastases to lung and bone in a murine xenograft model of lung metastases and an in intracardiac injection model of bone and lung metastases using a highly aggressive breast cancer cell line (MDA-MB-435-F-L) [60]. In another experimental murine model of bone metastases from breast cancer cells (MDA-MB-231), administration of a small molecule inhibitor of TGF- $\beta$  type I receptor kinase resulted in prolonged survival in addition to reduced osteolytic lesions compared with vehicle-treated animals [61]. In addition to breast cancer, TGF- $\beta$  plays a role in bone metastases from melanoma and prostate cancer. Melanoma cells that over-expressed Smad7, a normal TGF- $\beta$ /Smad signalling inhibitor, caused less bone metastases, less osteolysis and longer survival in mice as compared to animals bearing parental or mock-transfected melanoma cells [62]. These data indicate that the role of TGF- $\beta$  in promoting metastases may be specific to bone. In animal models of prostate cancer, emerging data suggest that BMP-7, an antagonist of the TGF- $\beta$ /Smad pathway, can inhibit TGF- $\beta$ -mediated epithelial to mesenchymal transition and osteolytic metastases [63]. However, BMP-7 administration did not inhibit the growth of intra-prostatic xenografts, suggesting that it is a bone-specific effect [63]. These data highlight the role that TGF- $\beta$  plays in promoting bone metastases, and blockade of TGF- $\beta$  signalling such as through the Smad pathway results in decreased osteolysis in animal models of breast cancer, prostate cancer and melanoma.

- **Wnt pathway**: the use of the proteasome inhibitor bortezomib for the treatment of multiple myeloma has been shown to reduce serum DKK1 concentrations and decrease the bone resorption markers CTX and TRACP-5b [64]. Endothelin-1 (ET-1) stimulates the osteoblast by activation of the Wnt signalling pathway by reducing autocrine osteoblast production of DKK1 [65]. It signals through two receptors – endothelin A and B receptors (ETAR, ETBR) – and has been involved in the development of bone metastases through its effects to stimulate the osteoblast via ETAR [66]. Bone metastases tumor cells themselves also regulate local bone concentration of DKK1 independent of ET-1 and the expression of DKK1 correlates with the behaviour of bone phenotype. Cancer cells that produce DKK1 form osteolytic lesions while those cells with low expression have an osteoblastic phenotype in mouse models of bone metastasis [67]. This study and others show a clear

inverse relationship between DKK1 and osteoblast activity. Osteoblastic bone metastasis therefore appears to be dually dependent on the down-regulation of microenvironment DKK1 secretion from osteoblasts via tumor-produced ET-1 and prostate cancer cells themselves. These mechanisms are complementary, each representing an important pathway of DKK1 regulation in cancer bone metastases. Clinical evidence supports the contribution of ET-1 to prostate cancer osteoblastic bone metastases. Indeed, in prostate cancer bone metastasis, endothelins are being investigated as a potential target for inhibition. Atrasentan (ABT-627) is an inhibitor of the endothelin-A receptor (ETAR) that promotes bone formation *in vitro* and inhibits osteoblastic metastases in mice [68]. It is currently in phase 3 trial in patients with prostate cancer and bone metastases [69] as well as in patients with rising prostate-specific antigen levels who are expected to develop bone metastases. Although initial clinical results have been disappointing, further studies of atrasentan and other selective endothelin-1 antagonists such as ZD4054, are ongoing. Thus, it appears that ETAR blockade may have specific effects to reduce bone metastases. Ongoing studies with this and other ETAR antagonists will further define the role of targeting the endothelin axis in prostate cancer [70].

### EMERGING PATHWAYS IN BONE METASTASES

Recent evidence also implicates the hypoxia-inducible factors (HIFs) and platelet-derived lysophosphatidic acid as promoting skeletal metastases. HIF-1 is a transcription associated with malignant progression of cancers and is involved in adaptive responses to hypoxia. Tumor-associated hypoxia and HIF-1 expression were found to promote the progression of bone metastases in an animal model of breast cancer [71]. These factors suppress osteoblast differentiation and increase osteoclastogenesis such that osteolytic bone metastases are formed. Lysophosphatidic acid (LPA), an endogenous lipid involved in the proliferation, migration and survival of many cell types [72] is emerging as another important mediator of bone metastases [73, 74]. Tumor cells at the bone metastatic site stimulate the production of LPA from platelets and the use of platelet antagonists in experimental animal models inhibited the progression of bone metastases from breast and ovarian cancer cell lines [73]. Further, inhibition of the type I LPA receptor reduced progression of bone metastases in animal by blocking tumor-derived cytokines (IL-6, IL-8, granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, growth-related oncogene  $\alpha$ , macrophage chemoattractant protein 1) that are activators of osteoclast-mediated resorption Fig. (1) [74].

Another novel agent in clinical development for the treatment of skeletal breast and prostate bone cancer metastases is the bone-seeking,  $\alpha$ -particle-emitting radiopharmaceutical  $^{223}\text{RaCl}_2$  (Alpharadin) [75]. Clinical data indicate that use of  $^{223}\text{Ra}$  in single dose or repeated regimens and also after external beam irradiations seems to be safe. Further evaluation is planned to study its role in delaying disease progression and survival in patients with skeletal metastases.

### CURRENT & FUTURE DEVELOPMENTS

Combining pharmaceutical agents is going to play an important role in future therapies. Both animal and clinical

studies need to be done using bisphosphonates in combination with other agents to try to improve on the benefits already being achieved with current BPs.

Besides bisphosphonates, a better knowledge of the signalling pathways of osteoclastogenesis and osteoblastogenesis with regard to working points suitable for exerting desirable changes in osteoclast/osteoblast differentiation and/or activation. Meanwhile, therapeutic regimens based on our understanding of osteoimmunological interactions such as anti-RANKL based therapies have proved to be effective in ameliorating bone loss and inhibiting tumor progression in both primary and secondary bone tumors. It may be anticipated that monoclonals targeting osteoblastogenesis-inhibiting molecules including Dkk1, sFRP1 and sclerostin will be effective therapeutics promoting bone formation. Nevertheless, it has to be kept in mind that only a minority of the theoretical approaches is in clinical use today. This means that there is a demand for intensive preclinical testing of the declined options.

As we learn a lot about signalling pathways and also their cross-connections, it should be possible in the near future to more specifically target osteoclasto- and osteoblastogenesis. Beside the use of monoclonal, RNA interference (RNAi) has emerged to be a very promising tool in interfering with signalling molecules. RNAi is based on sequence-specific gene silencing by small RNA molecules approximately 21 nucleotides in length. However, despite the advantages of specificity and potency in gene knock-down, the design and delivery strategies for RNAi effector molecules need to be carefully contemplated to address safety issues and ensure effective treatment of human diseases. Although no clinical investigations focusing on the use of RNAi in the treatment of bone disease have been published to date, first clinical applications are being tested for age-related macular degeneration and respiratory syncytial virus-mediated disease as well as other viral and neurodegenerative diseases and cancers [76-80].

## REFERENCES

- [1] Carlin BI, Andriole GL. The natural history, skeletal complications, and management of bone metastases in patients with prostate carcinoma. *Cancer* 2000; 88: 2989-2994.
- [2] Coleman RE. Metastatic bone disease: clinical features, pathophysiology and treatment strategies. *Cancer Treat Rev* 2001; 27: 165-176.
- [3] Healey JH, Brown HK. Complications of bone metastases: surgical management. *Cancer* 2000; 88: 2940-2951.
- [4] Mirra JM. Bone tumors: clinical, radiologic and pathologic correlations. Philadelphia, Lea & Febiger. 1989; 248-316.
- [5] Dorfman HD, Czerniak B. Bone cancers. *Cancer* 1995; 75: 203-210.
- [6] Roodman GD. Mechanisms of bone metastasis. *N Engl J Med* 2004; 350: 1655-1664.
- [7] Marie PJ. Fibroblast growth factor signaling controlling osteoblast differentiation. *Gene* 2003; 316: 23-32.
- [8] Janssens K, ten Dijke P, Janssens S, van Hul W. Transforming growth factor-beta1 to the bone. *Endocr Rev* 2005; 26: 743-774.
- [9] Ryoo HM, Lee MH, Kim YJ. Critical molecular switches involved in BMP-2-induced osteogenic differentiation of mesenchymal cells. *Gene* 2006; 366: 51-57.
- [10] Wan M, Cao X. BMP signaling in skeletal development. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 328: 651-657.
- [11] Kain MS, Einhorn TA. Recombinant human bone morphogenetic proteins in the treatment of fractures. *Foot Ankle Clin* 2005; 10: 639-650.
- [12] De Biase P, Capanna R. Clinical applications of BMPs. *Injury* 2005; 36: 43-46.
- [13] Huang KK, Shen C, Chiang CY, Hsieh YD, Fu E. Effects of bone morphogenetic protein-6 on periodontal wound healing in a fenestration defect of rats. *J Periodontol Res* 2005; 40: 1-10.
- [14] Rifas L. T-cell cytokine induction of BMP-2 regulates human mesenchymal stromal cell differentiation and mineralization. *J Cell Biochem* 2006; 98: 706-714.
- [15] Bramlage CP, Haupl T, Kaps C, et al. Decrease in expression of bone morphogenetic proteins 4 and 5 in synovial tissue of patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2006; 8: R58.
- [16] Kang Y, Siegel PM, Shu W et al. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell* 2003; 3: 537-549.
- [17] Dallas SL, Rosser JL, Mundy GR, Bonewald LF. Proteolysis of latent transforming growth factor-beta (TGF-beta)-binding protein-1 by osteoclasts: a cellular mechanism for release of TGF-beta from bone matrix. *J Biol Chem* 2002; 277: 21352-21360.
- [18] Holmen SL, Giambernardi TA, Zylstra CR, et al. Decreased BMD and limb deformities in mice carrying mutations in both LRP5 and LRP6. *J Bone Miner Res* 2004; 19: 2033-2040.
- [19] Tian E, Zhan F, Walker R et al. The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *N Engl J Med* 2003; 349: 2483-2494.
- [20] Delos D, Yang X, Ricciardi BF, Myers ER, Bostrom MP, Camacho NP. The effects of RANKL inhibition on fracture healing and bone strength in a mouse model of osteogenesis imperfecta. *J Orthop Res* 2008; 26: 153-164.
- [21] Hamdy NA. Denosumab: RANKL inhibition in the management of bone loss. *Drugs Today (Barc)* 2008; 44: 7-21.
- [22] Zack DJ. Proc., 1st Int Conf on osteoimmunology, Crete, 2006,61.
- [23] Elliott R, Kostenuik P, Chen C, et al. Denosumab is a selective inhibitor of human receptor activator of NF-kB ligand that blocks osteoclast formation *in vitro* and *in vivo*. *Eur J cancer* 2006; 4: 62.
- [24] Atkinson JE, Cranmer P, Mohr S, et al. Bone mineral density is increased following monthly administration of AMG162 in cynomolgus monkeys. *J Bone Miner Res* 2003; 18(2): S96.
- [25] Body JJ, Coleman RE, Lipton A, et al. Rapid, profound, and prolonged suppression of bone turnover with a single sc dose of AMG 162 in women with breast cancer metastatic to bone. *J Bone Miner Res* 2004; 19: 1593.
- [26] Peterson MC, Martin SW, Stouch BJ, et al. Pharmacokinetics (PK) and pharmacodynamics (PD) of AMG 162, a fully human monoclonal antibody to receptor activator of NF kappa B ligand (RANKL), following a single subcutaneous dose to patients with cancer-related bone lesions. *J Clin Oncol* 2004; 22 (suppl 14): 8106
- [27] Emery JG, McDonnell P, Burke MB, et al. Osteoprotegerin is a Receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 1998 ; 273 : 14363-14367.
- [28] Hohen I, Shipman CM. Role of osteoprotegerin (OPG) in cancer. *Clin Sci* 2006 ; 110 : 279-291.
- [29] Cheng X, Kinosaki M, Takami M, Choi Y, Zhang H, Murali M. Disabling of receptor activator of nuclear factor-kappaB (RANK) receptor complex by novel osteoprotegerin-like peptidomimetics restores bone loss *in vivo*. *J Biol Chem* 2004; 279: 8269-8277.
- [30] Heath DJ, Vanderkerken K, Cheng X, et al. An osteoprotegerin-like peptidomimetic inhibits osteoclastic bone resorption and osteolytic bone disease in myeloma. *Cancer Res* 2007; 67: 202-208
- [31] Aoki K, Saito H, Itzstein C, et al. A TNF receptor loop peptide mimic blocks RANK ligand-induced signaling, bone resorption, and bone loss. *J Clin Invest* 2006; 116: 1525-1534.
- [32] Baker, Brenda F., Bennett, Frank C., Dobie, Kenneth W., (Del Mar, CA, US) Myers, K., Finger, J., Cowsert, Lex M.: US20050148533 (2005).
- [33] Kostenuik, P., Shen, W., Boone, T. C.: US20070134245(2007).
- [34] Spohn G, Schwarz K, Maurer P, et al. Protection against osteoporosis by active immunization with TRANCE/RANKL displayed on virus-like particles. *J Immunol* 2005; 175: 6211-6218.
- [35] Bachmann, M., Maurer, P., Spohn, G.: WO03039225 (2003).
- [36] Ye H, Arron JR, Lamothe B, et al. Distinct molecular mechanism for initiating TRAF6 signalling. *Nature* 2002; 418: 443-447.
- [37] Jimi E, Aoki K, Saito H, et al. Selective inhibition of NF-kappa B blocks osteoclastogenesis and prevents inflammatory bone destruction *in vivo*. *Nat Med* 2004; 10: 617-624.
- [38] Clohisy JC, Yamanaka Y, Faccio R, Abu-Amer Y. Inhibition of IKK activation, through sequestering NEMO, blocks PMMA-



- induced osteoclastogenesis and calvarial inflammatory osteolysis. *J Orthop Res* 2006; 24: 1358-1365.
- [39] Kunugiza Y, Tomita T, Tomita N, Morishita R, Yoshikawa H. Inhibitory effect of ribbon-type NF-kappaB decoy oligodeoxynucleotides on osteoclast induction and activity *in vitro* and *in vivo*. *Arthritis Res Ther* 2006; 8: R103
- [40] Chen T, Knapp AC, Wu Y, *et al.* High throughput screening identified a substituted imidazole as a novel RANK pathway-selective osteoclastogenesis inhibitor. *Assay drug Dev* 2006; 4: 387-396.
- [41] Ochi S, Shinohara M, Sato K *et al.* Pathological role of osteoclast costimulation in arthritis-induced bone loss. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 11394-11399.
- [42] Humphrey MB, Daws MR, Spusta SC, *et al.* TREM2, a DAP12-associated receptor, regulates osteoclast differentiation and function. *J Bone Miner Res.* 2006; 21: 237-245.
- [43] Rodino MA, Shane E. Osteoporosis after organ transplantation. *Am J Med* 1998; 104: 459-469.
- [44] Koga T, Matsui Y, Asagiri M, *et al.* NFAT and Osterix cooperatively regulate bone formation. *Nat Med* 2005; 11: 880-885.
- [45] Urushibara M, Takayanagi H, Koga T, *et al.* The antirheumatic drug leflunomide inhibits osteoclastogenesis by interfering with receptor activator of NF-kappa B ligand-stimulated induction of nuclear factor of activated T cells c1. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 794-804.
- [46] Marie PJ. Strontium ranelate: a physiological approach for optimizing bone formation and resorption. *Bone* 2006; 38: 10-14.
- [47] Kim K, Lee J, Kim JH, *et al.* Protein inhibitor of activated STAT 3 modulates osteoclastogenesis by down-regulation of NFATc1 and osteoclast-associated receptor. *J Immunol* 2007; 178: 5588-5594.
- [48] Coleman RE. The role of bisphosphonate in breast cancer. *Breast* 2004; 13 suppl 1: 19-28.
- [49] Heymann D, Ory B, Gouin F, Grenn J, Rédini F. Bisphosphonates: new therapeutic agents for the treatment of bone tumors. *Trends Mol Med.* 2004; 10: 337-343.
- [50] Saad F, Gleason DM, Murray R, *et al.* A randomized, placebo-controlled trial of zoledronic acid in patients with hormone-refractory metastatic prostate carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 1458-1468.
- [51] Rosen LS, Gordon D, Kaminski M, *et al.* Long-term efficacy and safety of skeletal complications in patients with advanced multiple myeloma or breast carcinoma: a randomized, double-blind, multicenter, comparative trial. *Cancer* 2003; 98: 1735-1744.
- [52] Boissier S, Ferreras M, Peyruchaud O, *et al.* Bisphosphonates inhibit breast and prostate carcinoma cell invasion, an early event in the formation of bone metastases. *Cancer Res.* 2000; 60: 2949-2954.
- [53] Binderman, I., Yaffe, A.: US20020107228 (2002).
- [54] Palepu, N. R.: WO02089816 (2002).
- [55] Yates, A.J. : AU9745901 (1997).
- [56] Yates, A.J. : AU2005203308 (2005).
- [57] Le Gall C, Bellahcène A, Bonnelye E, *et al.* A cathepsin K inhibitor reduces breast cancer induced osteolysis and skeletal tumor burden. *Cancer Res.* 2007; 67: 9894-9902.
- [58] Lee, J. C., Yeh, L. C.: US2007249535 (2007).
- [59] Lipton A, Berenson JR, Body JJ *et al.* Advances in treating metastatic bone cancer: summary statement for the First Cambridge Conference. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 6209-6212.
- [60] Bandyopadhyay A, Agyin JK, Wang L *et al.* Inhibition of pulmonary and skeletal metastasis by a transforming growth factor\_beta type I receptor kinase inhibitor. *Cancer Res* 2006; 66: 6714-6721.
- [61] Stebbins EG, Mohammad KS, Niewolna M *et al.* SD-208, a small molecule inhibitor of transforming growth factor b-induced epithelial to mesenchymal transition and bone metastasis of breast cancer cells. *J Bone Min Res* 2005; 20: 55.
- [62] Javelaud D, Mohammad KS, McKenna CR *et al.* Stable overexpression of Smad7 in human melanoma cells impairs bone metastasis. *Cancer Res* 2007; 67: 2317-2324.
- [63] Buijs JT, Rentsch CA, van der Horst G *et al.* BMP7, a putative regulator of epithelial homeostasis in the human prostate, is a potent inhibitor of prostate cancer bone metastasis *in vivo*. *Am J Pathol* 2007; 171: 1047-1057.
- [64] Terpos E, Heath DJ, Rahemtulla A *et al.* Bortezomib reduces serum dickkopf-1 and receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand concentrations and normalizes indices of bone remodelling in patients with relapse multiple myeloma. *Br J Haematol* 2006; 135: 688-692.
- [65] Clines GA, Mohammad KS, Bao Y *et al.* Dickkopf homolog 1 mediates endothelin-1-stimulated new bone formation. *Mol Endocrinol* 2007; 21: 486-498.
- [66] Yin JJ, Mohammad KS, Kakonen SM *et al.* A causal role for endothelin-1 in the pathogenesis of osteoblastic bone metastases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 10954-10959.
- [67] Schwaninger R, Rentsch CA, Wetterwald A, *et al.* Lack of noggin expression by cancer cells is a determinant of the osteoblast response in bone metastases. *Am J Pathol* 2007; 170: 160-175.
- [68] Guise TA, Grubbs GB, Cui Y, *et al.* Endothelin A receptor blockade inhibits osteoblastic metastases. *Proc Am Soc Clin Oncol* [abstract 331]. 2001.
- [69] Nelson JB, Nabulsi AA, Vogelzang NJ, *et al.* Suppression of prostate cancer induced bone remodeling by the endothelin receptor A antagonist atrasentan. *J Urol.* 2003; 169: 1143-1149.
- [70] Nelson JB. Endothelin receptor antagonists. *World J Urol* 2005; 23: 19-27.
- [71] Hiraga T, Kizaka-Kondoh S, Hirota K, *et al.* Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 expression enhance osteolytic bone metastases of breast cancer. *Cancer Res* 2007; 67: 4157-4163.
- [72] Moonelaar WH. Development of our current understanding of bioactive lysophospholipids. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 905: 1-10.
- [73] Boucharaba A, Serre CM, Gres S, *et al.* Platelet-derived lysophosphatidic acid supports the progression of osteolytic bone metastases in breast cancer. *J Clin Invest* 2004; 114: 1714-1725.
- [74] Boucharaba A, Serre CM, Guglielmi J, *et al.* The type 1 lysophosphatidic acid receptor is a target for therapy in bone metastases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 9643-9648.
- [75] Bruland OS, Nilsson S, Fisher DR, Larsen RH. High-linear energy transfer irradiation targeted to skeletal metastases by the alpha-emitter 223Ra: adjuvant or alternative to conventional modalities? *Clin Cancer Res.* 2006; 12: 6250-6257.
- [76] Bitko V, Musiyenko A, Shulyayeva O, Barik S. Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nat Med* 2005; 11: 50-55.
- [77] Rossi JJ. RNAi as a treatment for HIV-1 infection. *Biotechniques* 2006; 40: 25-29.
- [78] Dykxhoorn DM, Lieberman, J. Silencing viral infection. *PLoS Med* 2006; 3: e242.
- [79] Raoul C, Barker SD, Arbischer P. Viral-based modelling and correction of neurodegenerative diseases by RNA interference. *Gene Ther* 2006; 13: 487-495.
- [80] Pai SI, Lin YY, Macaes B, Meneshian A, Hung CF, Wu TC. Prospects of RNA interference therapy for cancer. *Gene Ther* 2006; 13: 464-477.



## ROLE DES CYTOKINES DE LA FAMILLE DE L'INTERLEUKINE-6 DANS LA BIOLOGIE DE L'OS ET DES OSTEOSARCOMES

Mots-clés : Interleukine-6, Tumeurs Osseuses, Signalisation, Différenciation

Les traitements actuels des ostéosarcomes nécessitent la mise en place de nouvelles thérapies. Dans ce cadre, nous nous sommes intéressés, dans un premier temps, à l'Oncostatine M (OSM), une cytokine de la famille de l'Interleukine-6 capable d'inhiber la prolifération de nombreuses cellules tumorales. Nous avons ainsi montré que l'OSM est capable d'induire une différenciation de type ostéocytaire dans les cellules osseuses normales et transformées (ostéosarcomes). De plus, l'OSM sensibilise les cellules d'ostéosarcome à l'apoptose induite par des inhibiteurs de kinase, dont la Staurosporine *in vitro* et agit en synergie avec le Midostaurin pour limiter le développement tumoral primaire et métastatique *in vivo*. Dans un second temps, nous avons observé que l'IL-31, une cytokine de la même famille, ne semble pas avoir d'action directe sur les cellules osseuses contrairement à l'OSM et l'IL-6. Par contre, *in vivo*, l'IL-31 réduit le volume osseux trabéculaire en association avec une augmentation de l'activité des ostéoclastes alors que l'OSM, lorsqu'elle est produite localement, augmente le volume osseux trabéculaire. Cette étude nous a permis de confirmer que les cytokines de la famille de l'IL-6 ont des activités spécifiques sur le remodelage osseux physiopathologique et de montrer que l'OSM pourrait être utilisée comme traitement adjuvant dans le cadre des ostéosarcomes.

## ROLE OF INTERLEUKIN-6 TYPE CYTOKINES IN BONE BIOLOGY AND OSTEOSARCOMA

Keywords: Interleukin-6, Bone tumors, Signalling, Differentiation

New therapeutic approaches of osteosarcoma need today to be developed, because of the limits of the current treatments. During my PhD, I was interested, in a first part, in Oncostatin M (OSM), a cytokine of the Interleukin (IL)-6 family with growth inhibitory effects on a variety of sarcoma and carcinoma cell lines. We demonstrated that OSM induces an osteocyte-like differentiation in osteoblastic and osteosarcoma cells. Moreover, OSM sensitizes osteosarcoma cells to apoptosis induced by kinase inhibitors, including Staurosporine *in vitro* and limits, in association with Midostaurin, tumor growth and metastasis *in vivo*. In a second part, we observed that IL-31, another IL-6 type cytokine, has no direct effects on bone cells contrary to OSM and IL-6. However, *in vivo*, IL-31 induces a decrease in trabecular bone volume in association with an increase in osteoclasts whereas OSM, locally produced, increases trabecular bone volume. This study confirmed that IL-6 type cytokines have specific effects on pathophysiological bone remodeling and demonstrated that OSM could be used as an adjuvant treatment in osteosarcoma.

Bénédicte BROUNAIS  
17 rue du château  
44680 SAINT MARS DE COUTAIS