

Université de Montréal

**Le CLCF1 inhibe la différenciation des MSC en
ostéoblastes**

par Sarah Nahlé

Département de pharmacologie et physiologie, Université de Montréal
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès sciences
en pharmacologie

Mars 2019

© Sarah Nahlé, 2019

Université de Montréal

Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Le CLCF1 inhibe la différenciation des MSC en ostéoblastes

Présenté par :

Sarah Nahlé

Évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Christian Beauséjour, président-rapporteur

Dr. Mohamed Benderdour, examinateur externe

Dr. Jean-François Gauchat, directeur de recherche

Résumé

Les cellules souches mésenchymateuses (MSC) sont des cellules multipotentes capables de se différencier en adipocytes, chondrocytes, ostéocytes ou en myocytes. Elles sont présentes dans presque tous les tissus chez l'adulte et chez le fœtus. Les MSC sécrètent une panoplie de cytokines leur conférant une capacité de régulation du système immunitaire et des propriétés immunosuppressives d'où les multiples essais cliniques visant leur utilisation dans de nombreuses applications thérapeutiques. Les MSC expriment la chaîne LIFR β (*Leukemia inhibitory factor receptor*) à leur surface. Des mutations dans le gène du LIFR mènent au syndrome de Stüve-Wiedemann qui se caractérise notamment par une scoliose, des courbatures des os longs et une incapacité à réguler la température corporelle. Le LIFR β constitue une des chaînes signalisatrices du récepteur de la cytokine CLCF1 (*Cardiotrophin like cytokine factor 1*). Nous avons donc testé l'hypothèse que le CLCF1 régule la différenciation des MSC en ostéoblastes. Des résultats préliminaires ont montré que le CLCF1 se lie à une population négative pour le marqueur CD45, exprimé par les cellules hématopoïétiques. Une liaison a également été observée sur des cultures de MSC de moelle osseuse. La stimulation des MSC à l'aide du CLCF1 a mené à une activation de la phosphorylation de STAT1 et STAT3. La différenciation des MSC en ostéoblastes en présence de CLCF1 a entraîné une diminution de la formation des nodules de calcium ainsi que de l'activité de la phosphatase alcaline, un marqueur des ostéocytes. Une analyse des niveaux des ARN messager (ARNm) par RT-qPCR sur les cellules différenciées en présence de CLCF1 a mis en évidence une diminution de l'expression des ARNm codant pour des facteurs de transcription impliqués dans le contrôle de l'ostéogenèse comme Runx2, Ostérix et Dlx5. En conclusion, ces résultats suggèrent que le CLCF1 inhibe la différenciation des MSC en ostéoblastes et que cette cytokine est donc une cible thérapeutique potentielle dans des maladies osseuses comme l'ostéoporose.

Mots-clés : Cellules souches mésenchymateuses, cytokines, CLCF1, LIFR, ostéoblaste.

Abstract

Mesenchymal stem cells (MSC) are multipotent cells capable of differentiating into adipocytes, chondrocytes, osteocytes or myocytes. They are present in most tissues in adults and fetuses. MSC secrete an array of cytokines giving them the ability to regulate immune responses. MSC have immunosuppressive properties and were therefore tested in clinical trials. MSC express the leukemia inhibitory factor receptor chain (LIFR β) on their surface. A mutation in the LIFR gene is associated with the Stüve-Wiedemann syndrome characterised by the development of scoliosis, curvatures of the long bones and the inability to regulate body temperature. LIFR β is one of the signalling chains of the cardiotrophin-like cytokine (CLCF1) receptor. We therefore tested the hypothesis that CLCF1 regulates the differentiation of MSC into osteoblasts. Preliminary results showed that CLCF1 binds bone marrow-derived MSC as well as a bone marrow population that is negative for the hematopoietic cell marker CD45. The addition of CLCF1 during the induction of MSC differentiation into osteoblasts resulted in a decrease in alkaline phosphatase activity and in mineralization. Analysis of mRNA levels by RT-qPCR indicated that the inhibitory effect of CLCF1 on osteoblast differentiation was paralleled by a down-regulation of the expression of Runx2, Osterix and Dlx5, 3 transcription factors involved in the control of osteogenesis. In conclusion, these results suggest that CLCF1 inhibits the differentiation of MSC into osteoblasts and that this cytokine is a potential therapeutic target in bone pathologies such as osteoporosis.

Keywords: Mesenchymal stem cells, cytokines, CLCF1, LIFR, osteoblast.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des figures.....	iv
Liste des abréviations.....	vi
Remerciements.....	x
CHAPITRE I. Introduction.....	1
1. Les cytokines.....	1
1.1 Les cytokines de la famille de l'IL-6.....	1
1.2 Les récepteurs de cytokines.....	3
1.2.1 Les récepteurs de type I.....	4
1.2.2 La signalisation à travers les récepteurs de type I.....	5
1.3 Quelques membres de la famille de l'IL-6.....	7
1.3.1 Le facteur neurotrophique ciliaire (CNTF).....	7
1.3.2 Le complexe cardiotrophin-like cytokine factor 1 (CLCF1)/ cytokine-like factor-1 (CLF1).....	8
1.3.3 Le LIF.....	12
1.3.4 L'OSM.....	14
2. Les cellules souches mésenchymateuses.....	15
2.1 Tissus d'origines et marqueurs des MSC.....	16
2.2 La différenciation des MSC.....	17
2.2.1 L'ostéogenèse.....	17
2.2.2 Les facteurs de transcription contrôlant la différenciation des MSC en ostéocytes.....	21
2.2.3 L'interaction MSC/HSC.....	24
2.2.4 Les effets des cytokines sur la différenciation des MSC.....	25
2.2.5 L'utilisation thérapeutique des MSC.....	27
3. Hypothèse de recherche.....	29
CHAPITRE II. ARTICLE.....	30

CHAPITRE III. Discussion.....	51
3.1 Le CLCF1 lie les MSC et active STAT1 et STAT3.....	51
3.2 Le CLCF1 diminue l'expression des facteurs de transcription essentiels à l'ostéogenèse.....	51
3.3 Le CLCF1 inhibe la différenciation des MSC en ostéoblastes.	52
4. Conclusion	53
5. Perspectives	54
5.1 Mode d'action du CLCF1 lors de la régulation de la différenciation des MSC.	54
5.2 Le récepteur de CLCF1 sur les MSC.....	54
5.3 L'effet direct et indirect du CLCF1 sur la différenciation des MSC en adipocytes..	55
5.4 Étudier l'effet du CLCF sur la différenciation des MSC in vivo.....	56
5.5 Étude de l'effet du CLCF1 sur la résorption osseuse	56
Bibliographie	58
Appendix	I
Étude de la liaison du CRLF1 avec le cholestérol.....	I

Liste des figures

Figure 1. Schéma représentatif de la structure des cytokines de la famille de l'IL-6.	2
Figure 2. Schéma représentatif de la composition des récepteurs des cytokines de la famille de l'IL-6 suivantes : le CNTF, le CLCF1/CRLF1, le LIF, l'OSMR et l'IL-6. Inspiré de (11).	3
Figure 3. Représentation schématique de la signalisation par les cytokines de la famille de l'IL-6 à travers la voie des JAK/STAT.....	5
Figure 4. Schéma représentatif des 3 sites de liaison des cytokines de la famille de l'IL-6 avec leurs récepteurs.....	11
Figure 5. Représentation schématique de la capacité de différenciation des cellules souches mésenchymateuses.....	15
Figure 6. Schéma représentatif des étapes de la différenciation des MSC en ostéocytes..	20

Figure 7. Représentation schématique de l'activation de l'ostéogenèse par la voie des BMP.	23
Figure 8. Schéma représentatif de la méthode de bio-conjugaison CuCAA.	I
Figure 9. Le CRLF1 ne semble pas former un lien covalent avec le cholestérol.	IV
Figure 10. La simvastatine inhibe la sécrétion du CRLF1 et de la cytokine composite CLCF1/CRLF1.	V

Liste des abréviations

ALP : Phosphatase alcaline

ARNm : Acide ribonucléique messenger

BM-MSK : *Bone Marrow-Mesenchymal stromal cell*

BMP : *Bone morphogenic protein*

BMPR : *Bone morphogenic protein receptor*

BSP : *Bone sialoprotein*

CD : *Cluster of Differentiation*

CISS : *Cold-induced sweating syndrome*

CLC : *Cardiotrophin-like cytokine*

CLCF1 : *Cardiotrophin-like cytokine factor 1*

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CNTF : Facteur neurotrophique ciliaire ou *ciliary neurotrophic factor*

CNTRF : Récepteur du facteur neurotrophique ciliaire ou *ciliary neurotrophic factor receptor*

CRLF1 : *Cytokine receptor like factor 1*

CT-1 : Cardiotrophine 1 ou *Cardiotrophin-1*

CXCL9/10 : *Chemokine (C-X-C motif) ligand*

Dlx-5 : *Distal-less homeobox 5*

ECM : *Extracellular matrix*

EpoR : Récepteur de l'érythropoïétine ou *Erythropoietin receptor*

FNIII : Fibronectine III

Frz : *Frizzled*

G-CSFR : *Granulocyte colony stimulating factor receptor*

GDP : *Growth differentiation factors*

GHR : Récepteur de l'hormone de croissance ou *Growth hormone receptor*

Gli2 : *Glioma-associated oncogene family zinc finger 2*

GM-CSFR : *Granulocyte-macrophage colony stimulating factor receptor*

gp130 : Glycoprotéine 130 KDa ou *Glycoprotein 130 KDa*

GVH : Greffon contre l'hôte

HGF : *Hepatocyte growth factor*

HSC : cellule souche hématopoïétique ou *Hematopoietic stem cell*

IDO : indolamine 2,3-dioxygénase

IFN : Interféron

IL-6R : Récepteur de l'interleukine 6 ou *Interleukin-6 receptor*

IL: Interleukine

ISCT : *International Society for Cellular Therapy*

JAK : Janus Kinase

KDa : KiloDalton

LIF : *Leukemia inhibitory factor*

LIFR : *Leukemia inhibitory factor receptor*

LPS : Lipopolysaccharide

LRP5/6 : *Low density lipoprotein related protein 5/6*

M-CSF : *Macrophage colony stimulating factor*

MAPK : *Mitogen activated protein kinase*

MEK : *Mitogen activated protein kinase kinase*

MSC : Cellule souche mésenchymateuse ou *Mesenchymal stem cell*

Msx-2 : *Msh homeobox 2*

OSM : Oncostatine M ou *Oncostatin M*

Osx : Ostérix

PGE-2 : Prostaglandine E2

PRLR : Récepteur de la prolactine ou *Prolactin receptor*

pSHE : phosphotyrosine Src homology 2

PTH : hormone parathyroïde

RANKL : *Receptor activator of nuclear kappa-B ligand*

Runx2 : *Runt-related transcription factpr 2*

SH2 : Src homology 2

shRNA : *Short hairpin ribonucleic acid*

Smurf1 : *SMAD Specific E3 Ubiquitin Protein Ligase 1*

SOCS : *Supressors of cytokine signaling*

STAT : *Signal transducer and activator of transcription*

TAK1 : *Transforming growth factor b-activated kinase 1*

TGF : *Transforming growth factor*

TLR4 : *Toll-like receptor 4*

VEGF : *Vascular endothelial growth factor*

Wnt : *wingless/integrated*

À mes très chers parents

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier mon directeur de recherche le Dr. Jean-François Gauchat de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire de recherche. Je le remercie également pour son extrême gentillesse, sa générosité, ses encouragements, sa patience et sa disponibilité. Ses judicieux conseils m'ont permis d'être capable maintenant de réaliser mes expériences de façon reproductible et efficace.

Je tiens également à remercier les membres de mon laboratoire ; Sarah Pasquin et Véronique Laplante. Merci particulièrement à Sarah de m'avoir aidé durant mon changement de projet et dans mes expériences de cytométrie en flux. Merci également à Véro pour son enthousiasme et sa bonne humeur constante qui ont fait de mon passage au laboratoire une meilleure expérience.

Merci à mes parents pour leur amour et leurs conseils. Sans leur appui, je ne serais pas maintenant à l'endroit où je suis. Merci également à mon frère, à ma sœur et à ma bonne amie Lama pour leur soutien émotionnel.

Finalement, je tiens à remercier les membres du jury d'avoir accepté d'examiner mon mémoire. Votre temps et dévouement sont sincèrement appréciés.

CHAPITRE I. Introduction

1. Les cytokines

Les cytokines sont des petites protéines ou des glycoprotéines sécrétées notamment par des leucocytes. Elles se fixent sur des récepteurs spécifiques présents sur la surface des cellules. Les cytokines régulent la survie, la croissance et la différenciation des cellules et jouent un rôle dans la défense contre les pathogènes et dans la réponse inflammatoire. Les cytokines peuvent jouer un rôle inflammatoire et/ou anti-inflammatoire selon le contexte (1).

1.1 Les cytokines de la famille de l'IL-6

Les cytokines peuvent être divisées en quatre groupes selon leur structure secondaire. On retrouve ainsi la famille des hématopoïétines (groupe 1 ou CRF1), la famille des interférons (groupe 2), la famille du facteur de nécrose tumoral (TNF) (groupe 3) et la famille des chémokines. Les cytokines du groupe 1 peuvent être classées en deux sous-groupes selon la longueur de leurs hélices : Les cytokines à longues chaînes α (LC pour *long chain*) et les cytokines à courtes chaînes α (CS pour *short chain*). Les cytokines à courtes chaînes α sont : l'IL-2, l'IL-3, l'IL-4, l'IL-5, l'IL-7, l'IL-9, l'IL-13, le *granulocyte macrophage colony stimulating factor* (GMCSF), le *macrophage colony stimulating factor* (MCSF) et l'interféron γ (IFN γ). Les cytokines à longues chaînes α sont : le facteur de croissance (GH ou *growth hormone*), l'IL10, la famille de l'IL-6, la famille de l'IL-12, la famille de la prolactine (PRL), le *granulocyte colony stimulating factor* (GCSF), l'érythropoïétine (EPO) et l'IFN γ . L'IFN γ possède des caractéristiques intermédiaires entre les cytokines LC et les SC (2). Les cytokines de la famille de l'IL-6 appartiennent donc aux cytokines du groupe 1 à longues chaînes α et possèdent dans leur structure secondaire 4 hélices alpha antiparallèles (Figure 1) (3).

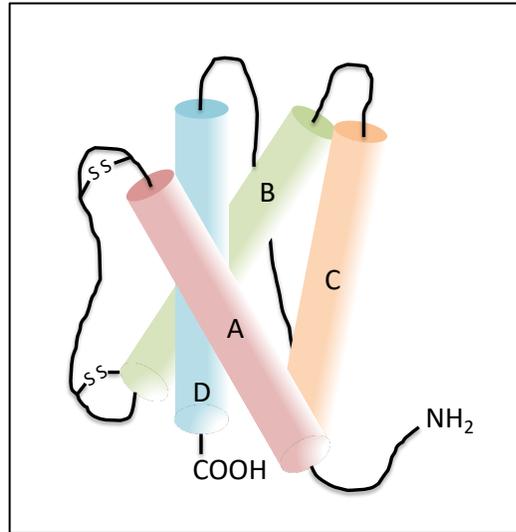


Figure 1. Schéma représentatif de la structure des cytokines de la famille de l'IL-6.
 Les cylindres représentent les 4 hélices alpha antiparallèles A, B, C et D. Les hélices alpha sont reliées par des chaînes polypeptidiques (en noir).

Les cytokines peuvent également être classées selon la composition de leurs récepteurs multimériques. Les cytokines de la famille de l'interleukine 6 (IL-6) utilisent tous la chaîne signalisatrice appelée glycoprotéine 130 kDa (gp130). Les cytokines de la famille de l'IL-6 sont : l'IL-6, l'interleukine 11 (IL-11), le facteur neurotrophique ciliaire (CNTF), le *leukemia inhibitory factor* (LIF), l'oncostatine M (OSM), la cardiotrophine-1 (CT-1), la *cardiotrophin-like cytokine* (CLC), l'interleukine 30 (IL-30), la neuropoïétine, l'interleukine 27 (IL-27) et l'interleukine 35 (IL-35). Ainsi, le récepteur de chacune de ces cytokines contient une chaîne gp130 sauf pour les récepteurs de l'IL-6 et de l'IL-11 qui en contiennent deux. Le partage d'une chaîne de récepteur implique une certaine redondance ou ressemblance dans la signalisation intracellulaire de ces différentes cytokines (4). Le gp130 est exprimé de façon ubiquitaire, ce qui explique le fait que les cytokines de la famille de l'IL-6 jouent un rôle dans plusieurs systèmes comme les systèmes cardiovasculaire, immunitaire et nerveux (5). Ainsi, les cytokines appartenant à la famille de l'IL-6 sont impliquées dans le contrôle du métabolisme, de la survie ou de la différenciation neuronale, la stimulation des cellules B et dans l'induction des protéines hépatiques de phase aiguë (PPA) (6-10).

1.2 Les récepteurs de cytokines

Les cytokines exercent leurs effets en se liant sur des récepteurs se trouvant sur la surface des cellules. Les récepteurs de cytokines peuvent être divisés en six grandes familles selon la similarité de leur séquence primaire, de leur structure secondaire et tertiaire et de leurs fonctions biologiques. On identifie ainsi la famille des récepteurs de l'hématopoïétines ou de type I, la famille des récepteurs aux interférons ou de type II, la famille des récepteurs du facteur de nécrose tumoral (TNF), la famille des récepteurs des tyrosines kinase, la famille des récepteurs IL-1/*Toll-like* et la famille des chimiokines. Dans ce qui suit, seule la famille des récepteurs de type I sera détaillée.

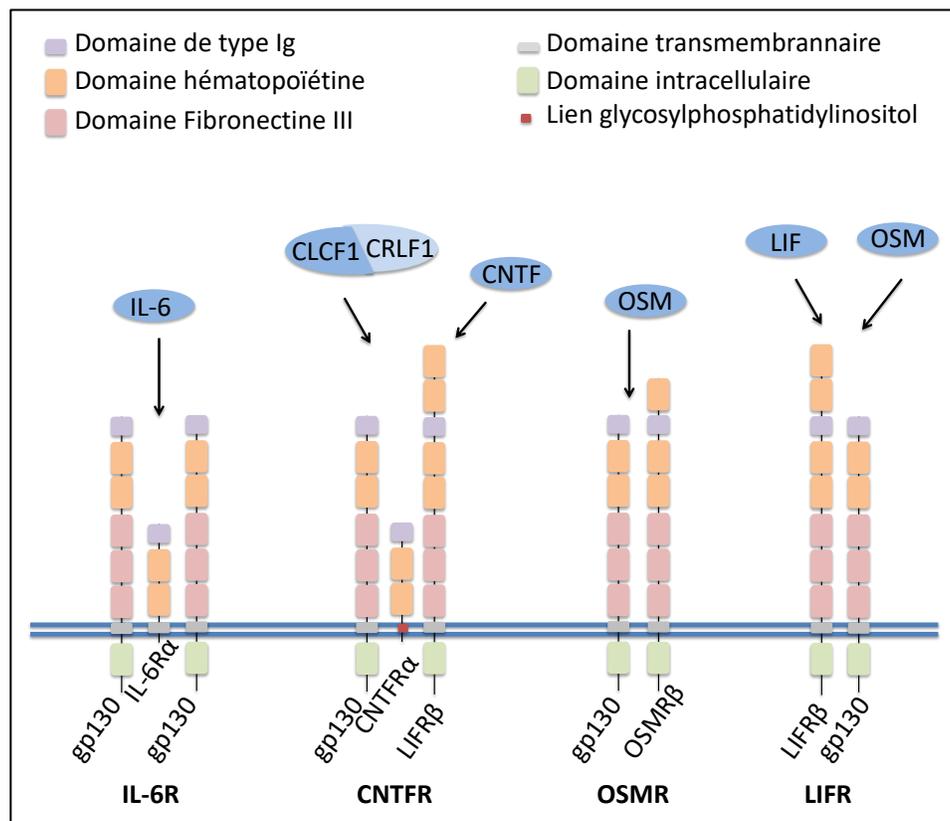


Figure 2. Schéma représentatif de la composition des récepteurs des cytokines de la famille de l'IL-6 suivantes : le CNTF, le CLCF1/CRLF1, le LIF, l'OSMR et l'IL-6. Inspiré de (11). Toutes ces cytokines partagent la chaîne signalisatrice gp130. La liaison de l'IL-6 sur l'IL-6R α entraîne son hétérodimérisation avec deux chaînes gp130. La liaison du CNTF ou du CLCF1/CRLF1 sur le CNTFR α entraîne l'hétérodimérisation de celui-ci avec gp130/LIFR β .

1.2.1 Les récepteurs de type I

Les récepteurs des hématopoïétines, ou récepteurs de type I, sont des glycoprotéines transmembranaires et sont regroupés sur la base de la similarité de leurs domaines extracellulaires (12). Cette famille comprend les récepteurs suivants : IL-2R α , β et γ , IL-4R, IL-3R α et β , IL-5R α et β , IL-6R, gp130, IL-7R, IL-9R, IL-12R β 1 et β 2, IL7-R, IL-13R, IL-15R, IL-23R, IL-27R (WSX-1 ou TCCR pour *T cell cytokine receptor*), IL-11R, IL-21R, *granulocyte colony stimulating factor receptor* (G-CSFR), *granulocyte-macrophage colony stimulating factor receptor* (GM-CSFR), *ciliary neurotrophic factor receptor* (CNTFR), *leukemia inhibitory factor receptor* (LIFR), le récepteur de l'érythropoïétine (EpoR), le récepteur de la prolactine (PRLR), le récepteur de l'hormone de croissance (GHR), le récepteur de l'oncostatine M (OSMR), le *thymic stromal lymphopoietin receptor* (TSLPR), le récepteur de la thrombopoïétine (TPOR), le récepteur de la leptine (OBR) et le *gp130-like monocyte receptor* (GLMR) (13). En effet, ces récepteurs ont tous un site de liaison aux cytokines contenant deux domaines : le domaine appelé fibronectine III (FNIII) et, pour certains, un domaine de type Immunoglobuline (Ig). Le domaine de type Ig contient un ou deux domaines de 200 acides aminés conservés appelés D200. Le D200 contient 2 sous-domaines homologues de 100 acides aminés. Chaque sous-domaine est caractérisé par la présence du motif Cys-X-Trp et de quatre autres résidus cystéines conservées qui forment des ponts disulfures (14). Les domaines FNIII, formé chacun d'environ 100 acides aminés, contiennent le motif Trp-Ser-X-Trp-Ser appelé aussi la boîte « WSXWS » essentielle à la liaison du ligand et à la transduction du signal intracellulaire (15). Certains récepteurs de la famille de l'IL-6 sont décrits dans la figure 3. À titre d'exemple, l'IL-6 s'associe à son récepteur, l'IL-6R β , ce qui cause son hétérodimérisation avec deux chaînes gp130 possédants un domaine intracellulaire qui sera phosphorylé au niveau des tyrosines permettant la transduction du signal (16).

1.2.2 La signalisation à travers les récepteurs de type I

1.2.2.1 La signalisation à travers la voie des JAK/STAT

Les cytokines de la famille de l'IL-6 signalisent principalement à travers la voie des JAK / STAT (17). La liaison d'une cytokine à son récepteur permet sa dimérisation suivie de l'activation par trans-phosphorylation des tyrosines kinases janus (JAK) (18). Les JAK activées phosphorylent par la suite des résidus tyrosines de la partie intracellulaire du récepteur. Ces phosphotyrosines sur la partie intracellulaire du récepteur permettent le recrutement des protéines de signalisation ayant un domaine SH2, comme les STATs. Les STATs, recrutées à proximité des JAKs, sont phosphorylées par ces derniers (19). Les pSTATs (STAT phosphorylés) peuvent dimériser à l'aide de leur domaine SH2 et transloquer vers le noyau où ils vont réguler les gènes cibles. Ce processus est régulé négativement par les *supressors of cytokine signalling* (SOCS) qui inhibent les JAKs (20).

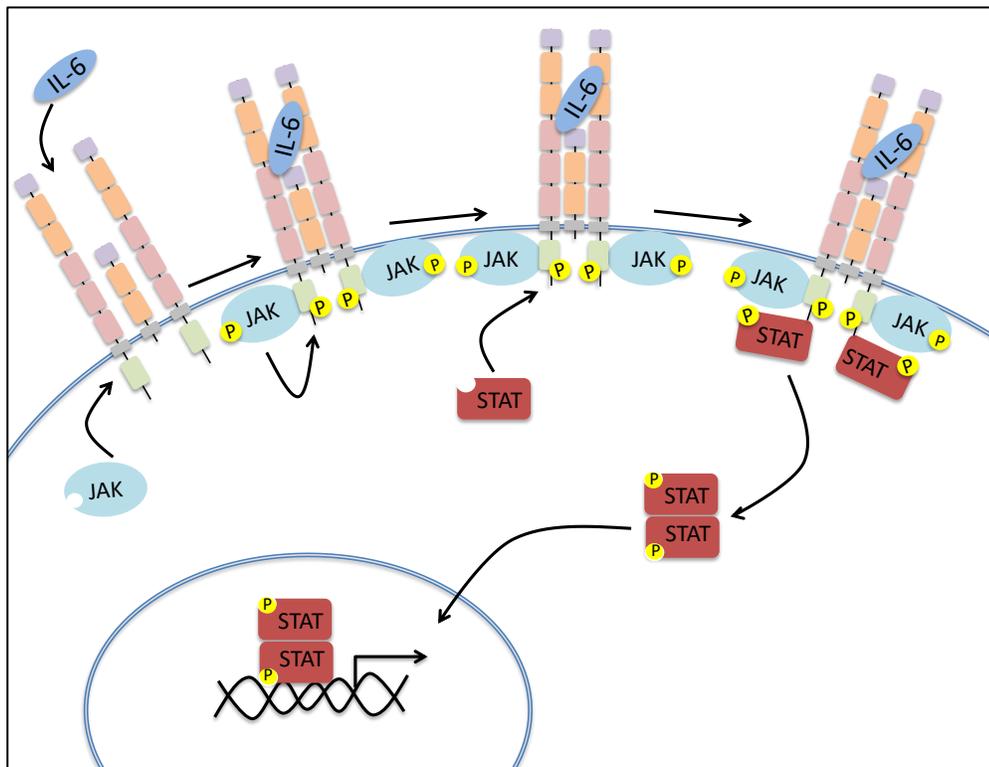


Figure 3. Représentation schématique de la signalisation par les cytokines de la famille de l'IL-6 à travers la voie des JAK/STAT.

Bien qu'il existe plus de 50 cytokines connues dans le système immunitaires, il n'existe à notre connaissance que 4 protéines JAK (JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2) et 7 protéines STAT (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b et STAT6). Malgré cela, les effets qu'exercent les cytokines sur les différents types cellulaires sont très diversifiés et, l'activation d'une même STAT par différentes cytokines peut engendrer des effets opposés (21-23). Cette divergence peut être expliquée par plusieurs mécanismes permettant l'obtention de la réponse spécifique à la cytokine en question. La signalisation à travers la voie des JAK/STAT est minutieusement régulée : l'activité des STAT peut être régulée par sa phosphorylation sur une tyrosine et/ou sérine, par son acétylation sur une lysine ou par sa sumoylation (24). De plus, différentes cytokines qui signalent à travers des récepteurs différents peuvent à leur tour activer différemment le même type de STAT. À titre d'exemple, le LIF, qui signale à travers LIFR β /gp130, et le CLCF1, qui signale à travers CNTFR α /LIFR β /gp130, activent tous les deux STAT3 (25, 26). En addition, il a été démontré que les STAT peuvent former des hétérodimères contribuant à la diversification de la réponse engendrée par les cytokines. Plus précisément, les hétérodimères STAT1-STAT2 et STAT1-STAT3 sont fréquemment détectés lors de la signalisation induite par les cytokines (27, 28). Finalement, d'autres facteurs contribuent aussi à la spécificité de la signalisation d'une cytokine comme le temps d'activations des STAT et la régulation des protéines *suppressor of cytokine signaling* (SOCS) par la cytokine elle-même.

1.2.2.2 La signalisation à travers la voie MAPK

Les cytokines de la famille de l'IL-6 peuvent également activer la voie de signalisation passant par les *mitogen-activated protein kinases* (MAPK), une sérine/thréonine protéine kinase. Suite à la liaison de la cytokine sur son récepteur, le récepteur est phosphorylé sur sa partie intracellulaire par les JAKs ce qui permet le recrutement du *Src containing protein tyrosine phosphatase 2* (SHP2) et de Shc, une protéine adaptatrice, qui sont à leur tour phosphorylés par les JAKs. Les protéines *growth factor receptor bound protein 2* (Grb2) et *Son of sevenless* (Sos) sont recrutées et vont activer Ras, une petite GTPase, permettant

l'activation de la cascade de signalisation de la voie des MAPKs par l'intermédiaire de Raf, *MAPK/extracellular signal-regulated kinase* (MEK) et *extracellular signal-regulated kinases 1 and 2* (ERK1/2) (29). Les MAPK activées peuvent ainsi dimériser et transloquer dans le noyau où ils peuvent activer des gènes cibles spécifiques qui jouent un rôle dans la prolifération, la survie et la migration cellulaire (30, 31).

1.2.2.3 La signalisation à travers la voie PI3K

Les cytokines de la famille de l'IL-6 sont aussi capables d'activer la voie des phosphoinoside 3-kinase (PI3K). Ainsi, la liaison de la cytokine à son récepteur mène à l'activation de la protéine SHP2 comme mentionné plus haut. SHP2 s'associe à Grb2-Sos et recrute la PI3K (29). La PI3K est une enzyme capable de phosphoryler des lipides membranaires impliqués dans la signalisation cellulaire. Elle est impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, la survie et la migration cellulaire et le transport vésiculaire (32-34).

1.3 Quelques membres de la famille de l'IL-6

1.3.1 Le facteur neurotrophique ciliaire (CNTF)

Le CNTF a d'abord été identifié comme facteur neurotrophique pour les cellules neuronales motrices et sensorielles chez le poulet (35-37). Le CNTF ne contient pas de peptide signal et est produit comme une cytokine non sécrétée, qui semble être relâchée dans le cas de la rupture de la membrane cellulaire, par exemple par les cellules de Schwann où cette cytokine est fortement exprimée (38, 39).

Le CNTF n'est pas une cytokine essentielle pour le développement. En effet, une délétion de cette dernière chez l'humain ou la souris n'engendre qu'une perte légère de la capacité motrice avec l'âge (40, 41). Le CNTF complexé à son récepteur multimérique CNTFR α /gp130/LIFR β

peut activer une cascade de signalisation passant par la voie JAK/STAT (42). La chaîne α du CNTFR existe aussi sous forme soluble : Le CNTFR α est normalement encré à la membrane à l'aide d'un lien glycosylphosphatidylinositol sensible au clivage par les phospholipases (43). Suite à un stress, le CNTFR α peut être clivé et devient alors un récepteur soluble capable de dimériser avec le CNTF (44). Le complexe CNTF/CNTFR α peut par la suite interagir avec gp130 et LIFR β encrées dans la membrane.

Le CNTFR est exprimé dans le système nerveux central, les muscles squelettiques et, plus faiblement, dans le foie, la peau et les reins (43). Le CNTF promeut la différenciation et la survie des neurones moteurs (39). De plus, certaines études ont montré un rôle bénéfique du CNTF dans les maladies neuronales inflammatoires notamment la sclérose en plaque (45) et dans la neuroredégénération de la rétine en clinique (46).

1.3.2 Le complexe cardiotrophin-like cytokine factor 1 (CLCF1)/ cytokine-like factor-1 (CLF1)

1.3.2.1 Le récepteur soluble CLF1

Le *Cytokine-like factor-1* (CLF1) appartient à la famille des récepteurs de cytokines de type I. En effet, la partie N-terminale de la protéine contient un domaine de type Immunoglobuline (*Ig-like domain*) et deux domaines de FNIII d'une centaine d'acides aminés formant un *cytokine binding domain*, caractéristique des récepteurs de type I. Le CLF1 possède aussi une homologie avec des récepteurs de la famille de l'IL-6R et avec le récepteur de la prolactine (47). La protéine humaine, comme la protéine murine, contient 6 sites potentiels de glycosylation et 11 résidus cystéines (48). Des études de patron d'expression ont montré la présence d'ARNm codant pour CLF1 dans la rate, le thymus, les nodules lymphatiques, l'appendice, la moelle osseuse, l'estomac, le placenta, le cœur, la thyroïde et les ovaires (48). La protéine CLF1 possède 96% d'identité avec le CLF1 murin et est conservée à travers les vertébrés (48). Le gène *CRLF1* (*Cytokine receptor-like factor 1*) présent sur le chromosome 19, code pour le CLF1.

Le CLF1 est un récepteur soluble. En effet, aucune séquence pouvant coder pour un domaine transmembranaire n'a été trouvée dans le gène *CRLF1* (48). Le CLF1 forme un complexe sécrété avec CLCF1 (25, 49).

1.3.2.2 La cytokine CLCF1

La *cardiotrophine-like cytokine factor 1* (CLCF1) est une cytokine connue aussi sous les noms de *novel neurotrophin-1*, *cardiotrophin-like cytokine* et *B-cell stimulating factor-3* (NNT-1, CLC, BSF-3) (50). Le gène *CLCF1* est présent sur le chromosome 11 et code pour une protéine possédant un peptide signal (50). Le CLCF1 possède une homologie de 96% avec son équivalent murin et est exprimé dans les ganglions lymphatiques et la rate (50).

Tout comme les cytokines de la famille de l'IL-6, le CLCF1 joue un rôle dans la survie des neurones moteurs et sympathiques et permet la production de corticostérone et d'IL-6 (5) à travers l'induction à l'IL-1 (51). De plus, le CLCF1 est requis pour le développement des neurones moteurs faciaux et lombaires (8). Le CLCF1 joue ainsi un rôle régulateur au niveau du système immunitaire.

1.3.2.3 Le CLCF1/CLF1 est un ligand du CNTFR

Le récepteur du CNTF, le CNTFR (comprenant CNFR α , gp130 et LIFR β), représente un des récepteurs membranaires connus du complexe CRLF1/CLCF1 (25). Les mutations inactivant le *CNTF* n'entraînent pas le même phénotype que celles inactivant le gène codant pour CNFR α . En effet, les souris n'exprimant pas le CNTFR meurent prématurément à cause de déficits dans le développement neuronal moteur (52). À l'opposé, les souris déficientes en CNTF n'ont pas de phénotype marqué, mais développent une atrophie progressive des neurones moteurs se caractérisant par une faible perte des capacités motrices avec l'âge suggérant la présence d'un ligand alternatif au CNTF capable de signaler à travers le CNTFR (40). Il a été aussi démontré que le CNTF et le CLCF1/CLF1 ont des effets

biologiques similaires suggérant ainsi qu'ils partagent un récepteur en commun. Les deux cytokines favorisent la survie des cellules neuronales embryonnaires *in vitro* (25). En plus de ses effets immunitaires et neuronaux, le complexe CLCF1/CLF1 est essentiel pour le développement normal des reins chez le fœtus chez la souris (53). Plus récemment, il a été montré que le CLCF1 stimule la formation des cellules spumeuses *in vitro* suggérant un rôle de cette cytokine dans l'athérosclérose (54).

Comme mentionné précédemment, le CLCF1 appartient à la famille de cytokines possédant 4 hélices alpha antiparallèles dans leur structure secondaire (3). Les cytokines appartenant à cette famille sont capables d'interagir avec leurs récepteurs à travers 2 à 3 sites d'interactions fortement conservés. Dans la famille de l'IL-6, le premier site d'interaction ou site 1, permet l'interaction de la cytokine avec la chaîne α de son récepteur. Le site 2, permet l'interaction de la cytokine avec la chaîne gp130. Le site 3 peut constituer un autre site l'interaction de la cytokine avec le gp130 pour l'IL-6 et l'IL-11 ou avec le LIFR pour le LIF, OSM, CT-1 et le CNTF. De plus, le site 3 contient le motif conservé FXXK. Ainsi, le CLCF1 interagit avec le CNTFR à travers le site 1 via les résidus : Trp⁶⁷, Arg¹⁷⁰ et l'Asp¹⁷⁴. Le CLCF1 interagit aussi avec le CRLF1 et le LIFR via le site 3 à travers les résidus Phe¹⁵¹ et Lys¹⁵⁴ qui font partie du motif conservé FXXK (55). Le site 1 d'interaction du CNTF avec le CNTFR est conservé dans le CLCF1. Il existe des similarités structurelles des séquences qui codent pour les sites 1, 2 et 3 entre le CNTF et le CLCF1 (56).

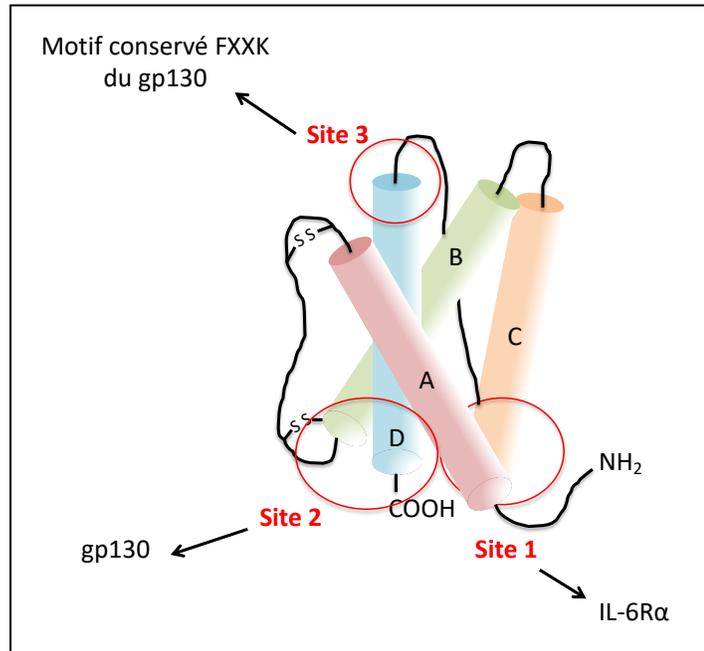


Figure 4. Schéma représentatif des 3 sites de liaison des cytokines de la famille de l'IL-6 avec leurs récepteurs. Représentation de l'IL-6.

Par ailleurs, le CLCF1 peut, comme le CNTF, former un complexe avec la forme soluble de la chaîne α du CNTF, le sCNTFR α . En effet, il a été démontré que le sCNTFR α permet de favoriser la sécrétion du CLCF1. Ainsi, le CLCF1/sCNTFR α forme une cytokine composite capable d'activer la phosphorylation de STAT3 et de promouvoir la survie des cellules neuronales motrices, tout comme le CNTF (56). Plus précisément, la liaison du CLCF1 avec le sCNTFR α , permet le recrutement et la dimérisation du gp130 et du LIFR ce qui entraîne l'activation de la cascade de signalisation des Janus kinase (JAK1, JAK2, TyK2) / STAT1 et STAT3 (26),(57).

1.3.2.4 Le CLCF1/CRLF1 est un ligand de la sortiline

La sortiline, aussi appelée récepteur de la neurotensine 3 (NTS3), est un récepteur appartenant à la famille des récepteurs neuronaux de type 1 à domaine *vacuolar protein sorting 10 protein* (Vps10p) (58). Elle est exprimée le plus abondamment dans le système nerveux central et est capable de lier le *receptor associated protein* (RAP), la neurotensine, le

nerve growth factor-β (NGF-β), le *brain-derived neurotrophic factor 7* (BDNF-7), la lipoprotéine lipase (LpL) et l'apolipoprotéine AV14 (59-63).

Il a été démontré que la sortiline est capable d'interagir avec le LIFRβ/gp130 facilitant ainsi la signalisation à travers ce complexe de récepteur. Il a été démontré par la même étude que le CNTF et le CLCF1/CRLF1 lie la sortiline avec une grande affinité ($K_d = 25$ et 10 respectivement) (64).

1.3.2.5 Les syndromes associés aux mutations dans les gènes *CRLF1* et *CLCF1*

Des mutations du gène *CRLF1* engendrent le syndrome de Crisponi et du *cold-induced sweating syndrome type 1* (CISS) (49). Les patients Crisponi présentent souvent une dysmorphie faciale en plus des difficultés respiratoires et d'allaitement à la naissance. De plus, ce syndrome est caractérisé par des épisodes d'hyperthermie et par des contractions paroxystiques anormales des muscles faciaux et pharyngaux (65). La majorité des patients décèdent dans les premiers mois de la vie durant des épisodes d'hyperthermie. Les patients qui survivent jusqu'à l'âge de marcher développent des scoliose, des retards psychomoteurs et le syndrome CISS caractérisé par une transpiration excessive induite par le froid (66).

Des mutations dans le gène *CLCF1* causent le *cold-induced sweating syndrome type 2* (CISS2) caractérisé par des scoliose, des dimorphismes comme le cubitus valgus, et une réponse anormale au froid (67).

1.3.3 Le LIF

Le LIF est une cytokine qui appartient à la famille de l'IL-6 (68). Le LIF est formé de 4 hélices α antiparallèles et, la région N-terminale de l'hélice A est importante pour la liaison au récepteur (69). Le LIF se fixe sur un récepteur hétérodimérique formé par les chaînes gp130 et LIFRβ et active principalement la voie de signalisation des JAK/STAT. Dans ce cas,

les deux chaînes du récepteur sont signalisatrices. Le LIF lie le gp130 via le site 2 et le LIFR β via le site 3 (69). La chaîne LIFR β est transmembranaire et contient huit domaines extracellulaires : deux domaines hématopoïétiques suivis d'un domaine de type immunoglobuline ou *immunoglobulin-like domain* et de deux autres domaines hématopoïétiques. Tout cela est suivi de trois domaines FNIII du côté le plus proximal de la membrane (1).

Le LIF est une cytokine pléiotropique présentant de nombreuses activités biologiques au niveau du : remodelage osseux, système neuromusculaire, système hémopoïétique, cancer, axe hypothalamo pituitaire adrénal et de la reproduction (70, 71). Ainsi, le récepteur de cette cytokine est exprimé dans plusieurs organes comme les os, le système nerveux central, le foie, les reins et l'utérus (72). Le LIF permet aussi le maintien en culture des cellules souches embryonnaires de souris dans un état non différencié (73). Par ailleurs, la chaîne β du récepteur au LIF joue un rôle important au niveau du remodelage osseux. Les souris déficientes en LIF ne montrent pas des effets prononcés au niveau du développement osseux contrairement aux souris déficientes en LIFR β (74, 75). La formation osseuse favorisée par l'activation du LIFR implique deux cytokines différentes, l'OSM et le LIF. L'OSM inhibe l'expression de la sclérostine, un puissant inhibiteur de la formation osseuse, dans les cellules stromales et dans les ostéoblastes. L'OSM stimule également indirectement la formation des ostéoclastes à travers le *receptor activator of nuclear kappa-B ligand* (RANKL) en agissant à travers son récepteur, l'OSMR (76). De façon similaire, le LIF stimule l'expression de RANKL et la minéralisation *in vivo* dans les lignées d'ostéoblastes (76).

Comme mentionné précédemment, le LIFR β constitue une des chaînes du récepteur du CNTF qui inhibe la minéralisation des ostéoblastes *in vitro* (77).

Finalement, une mutation dans le LIFR entraîne le syndrome de Stüve-Wiedemann (SWS) caractérisé par une campodactylie, une incapacité à réguler la température corporelle, la scoliose, des difficultés d'allaitement et la courbature des os longs (78). De plus, les patients qui survivent jusqu'à la première année de vie éprouvent un retard dans la croissance et de l'ostéoporose (79). Les souris déficientes en *LIFR* présentent un volume osseux diminué, une forte augmentation de la quantité d'ostéoclastes et une ostéopénie sévère (80).

1.3.4 L'OSM

L'OSM est une cytokine sécrétée par les monocytes activés et les lymphocytes T (81). L'OSM fait partie de la famille de l'IL-6 et agit au niveau de la prolifération et la différenciation des cellules (82, 83). Cette cytokine possède une forte homologie de structure avec le LIF, le CNTF et l'IL-6 (3, 84, 85). Elle exerce son action en se liant aux récepteurs dimériques LIFR/gp130 ou OSMR/gp130 déclenchant ainsi l'activation de la voie des JAK1/2/STAT3 (86). L'OSM joue un rôle dans le cancer, en inhibant la croissance des tumeurs solides, le métabolisme osseux, la régénération du foie, l'inflammation chronique et l'athérosclérose (82). Les ostéoblastes expriment fortement le LIFR β . L'OSM est capable de signaler à travers le LIFR pour stimuler la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en ostéoblastes et pour inhiber leur différenciation en adipocytes (76). De plus, le milieu conditionné avec des monocytes stimulés au lipopolysaccharide (LPS) est capable d'induire la différenciation des cellules souches mésenchymateuses (MSC) en ostéoblastes et cette différenciation est inhibée par des anticorps neutralisants dirigés contre l'OSM ou le LIF (87).

2. Les cellules souches mésenchymateuses

Les cellules souches mésenchymateuses (MSC), aussi appelées cellules stromales mésenchymateuses ou cellules stromales multipotentes, sont des cellules multipotentes d'abord identifiées dans la moelle osseuse. Elles constituent une très petite fraction de cette dernière (0.01 à 0.001%) (88). Les MSC ont ensuite été retrouvées dans presque tous les tissus : cordon ombilical, moelle osseuse, cellules adipeuses, etc. Elles sont présentes chez l'adulte comme chez le fœtus et sont capables de se renouveler et de se différencier en cellules spécialisées : adipocyte, chondrocytes, ostéocytes et myocytes (88). Les MSC sécrètent des cytokines et sont ainsi capables de réguler les réponses immunitaires (89-91). Les différentes capacités des MSC ont permis leur utilisation dans la médecine régénérative et elles ont été testées dans plusieurs essais cliniques visant la régénération des os, des tendons ou du cartilage (92). Certains essais visaient le traitement d'enfants ayant la maladie *osteogenesis imperfecta* (93). Comme les cellules utilisées pour la thérapie sont autologues, les problèmes du rejet par le système immunitaire sont éliminés (94).

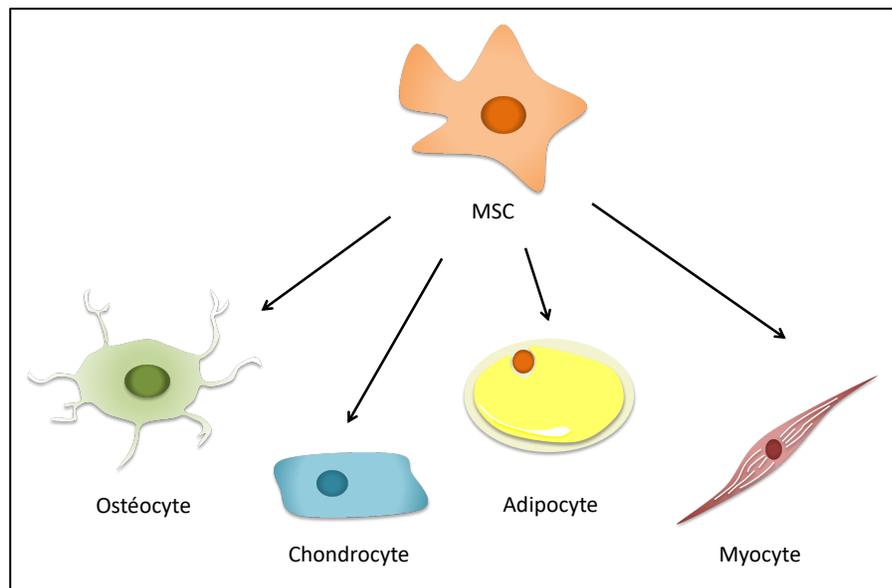


Figure 5. Représentation schématique de la capacité de différenciation des cellules souches mésenchymateuses.

2.1 Tissus d'origines et marqueurs des MSC

Malgré l'abondance de la littérature sur les MSC en culture, il existe très peu de littérature sur la biologie des MSC *in vivo*. En effet, les marqueurs utilisés ont été établis pour la caractérisation des cellules en culture qui diffèrent des cellules fraîchement isolées. Ainsi, l'expression génique, la taille, la vitesse de croissance et l'efficacité de différenciation des MSC évoluent avec l'avancement des passages lorsque ces cellules sont en culture. Avec l'avancement des passages, l'augmentation de la taille des MSC marque la sortie du cycle cellulaire et l'entrée en sénescence (95). De plus, les changements que les MSC subissent en culture n'ont pas la même cinétique d'une cellule à l'autre, et l'entrée en sénescence n'est pas uniforme à travers les sous-populations d'une culture d'une même origine (96, 97). Ainsi, une culture de MSC est toujours hétérogène.

Une variété de méthodes sont utilisées pour l'isolation, l'expansion et la caractérisation des MSC ce qui rend difficile la comparaison des données obtenues par différents laboratoires. C'est pour cette raison que la société internationale de la thérapie cellulaire (ISCT : *International Society for Cellular Therapy*) a établi des critères définissant les MSC (98). Selon ces critères, les MSC sont des cellules qui adhèrent au plastique, expriment des antigènes de surfaces spécifiques et possèdent une capacité de différenciation. Ainsi, il n'existe pas de marqueur unique spécifique aux MSC mais, plus de 95% des cellules doivent exprimer les marqueurs de surfaces suivants : CD105, CD73 et CD90 et elles doivent être négatives pour les marqueurs suivants : CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 α ou CD19 et pour le Complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II qui n'est exprimé qu'en cas de stimulation avec de l'Interféron- γ . En outre, les cellules doivent être capables de se différencier en ostéoblastes, chondroblastes ou adipocytes *in vitro* (98). Morphologiquement, ces cellules ressemblent à des fuseaux et croissent en clones.

Comme mentionné précédemment, les MSCs ont pu être isolés de plusieurs autres tissus que la moelle osseuse, par exemple : l'os trabéculaire, le tissu adipeux, le synovium, les muscles squelettiques, les poumons, la pulpe dentaire et le cordon ombilical (99, 100). Pour les cultures

en provenance de la moelle osseuse, il faut vérifier qu'au moins 98% de ces dernières sont négatives pour les marqueurs de cellules hématopoïétiques qui sont les contaminants probables (98). Parmi les marqueurs de surface des cellules hématopoïétiques, on retrouve les marqueurs des progéniteurs hématopoïétiques (CD34), des leucocytes (CD45), des monocytes et des macrophages (CD11b et CD14) et des cellules B (CD79 α et CD19).

Il n'existe pas encore de consensus pour le profil de marqueurs des MSC murin, mais, elles sont généralement positives pour CD106, CD105, CD44, CD29 et Sca-1 et négative pour CD45 et CD11b (101-103).

2.2 La différenciation des MSC

La capacité de différenciation des MSC varie en fonction de la source. À titre d'exemple, les MSC provenant de la moelle osseuse (BM-MSc) présentent une meilleure capacité de différenciation en chondrocytes que les MSC provenant des poumons ou du placenta (104). La capacité de différenciation des MSC diminue avec l'avancement des passages surtout pour l'ostéogenèse qui est fortement affectée par la sénescence (105). Dans ce qui suit, la différenciation des BM-MSc en ostéocyte sera abordée.

2.2.1 L'ostéogenèse

Physiologiquement, l'os est dans un état de remodelage continu qui est caractérisé par des processus de formations et de résorption osseuse. Les ostéoclastes sont des cellules multinucléées dérivées de cellules hématopoïétiques et responsables de la dégradation de la matrice osseuse formée par des protéines comme le collagène de type I alors que les ostéoblastes sont dérivés des MSC et sont responsables de la minéralisation d'une nouvelle matrice (106). Le remodelage osseux permet le renouvellement des os éliminant ainsi les microdommages qui se seraient accumulés avec le temps (107).

L'ostéoporose est une maladie très commune qui touche les deux sexes de façon non égale. Elle affecte 200 millions de femmes mondialement et cause plus de 8.9 millions de fractures par année (108, 109). Cette maladie ayant des fortes répercussions économiques et personnelles est la maladie dégénérative la plus fréquente dans les pays développés (110).

L'ostéoporose est caractérisée par des os poreux causés par un déséquilibre du processus de formation et de résorption osseuse menant à la fragilité osseuse, à une masse osseuse faible et à un risque augmenté de fractures. Plusieurs mécanismes sont responsables de la fragilité osseuse comme la résorption excessive des os qui cause la diminution de la masse osseuse et la détérioration de la microarchitecture du squelette ou le défaut dans le mécanisme de formation osseuse qui est induit en réponse à la résorption durant le remodelage normal de l'os (111).

La déficience en œstrogène est un facteur clé dans la pathogenèse de l'ostéoporose. Des études ont montré que les marqueurs de la résorption et ceux de la formation osseuse augmentent à la ménopause indiquant une augmentation du remodelage (112). Le processus de résorption est plus long que celui de formation osseuse donc une augmentation de la vitesse du remodelage des os causerait une diminution de la masse osseuse.

Une carence en calcium est un facteur de risque important dans l'ostéoporose surtout chez les personnes âgées. Chez ces personnes, la déficience en calcium et en vitamine D peut induire une hyperparathyroïdie secondaire. La vitamine D est à la fois essentielle pour l'absorption intestinale du calcium et pour l'inhibition de la synthèse de l'hormone parathyroïdienne (PTH) (113, 114). Une carence en vitamine D entraînerait l'augmentation des niveaux de PTH qui contribuent non seulement à l'augmentation de la perte de la masse osseuse et de la fragilité du squelette, mais aussi à une faiblesse neuromusculaire pouvant amener une augmentation de la fréquence de chute (115).

La résorption de l'os, un mécanisme clé dans l'ostéoporose, implique une interaction entre les ostéoblastes et les ostéoclastes (116). Les ostéoblastes produisent du *receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand* (RANKL), connu aussi sous le nom de *tumor necrosis factor ligand superfamily member 11* (TNFSF11), un ligand appartenant à la famille des ligands du facteur de nécrose tumorale. RANKL est responsable de l'activation de RANK qui est

exprimée sur les cellules hématopoïétiques (117). L'activation de RANK induit la différenciation en ostéoclastes, cellules responsables de la résorption osseuse(118). Ce système est rétroactivement régulé par la production de l'ostéopontégrine (OPG) par les ostéoblastes (118). L'OPG peut se lier à RANKL et inhiber son action en empêchant son interaction avec RANK sur les cellules hématopoïétiques. Une étude a montré une augmentation de l'expression de RANKL sur les cellules de la moelle osseuse des femmes déficientes en œstrogènes (119). L'axe RANKL/RANK est ainsi important dans la pathophysiologie de l'ostéoporose qui agit en augmentant la résorption osseuse.

Beaucoup de thérapies existent pour ralentir la progression de l'ostéoporose en inhibant par exemple la résorption osseuse comme c'est le cas pour les bisphosphonates ou le denosumab (120, 121). D'autres médicaments sont anaboliques et servent à augmenter la formation osseuse comme le teriparatite ou le romosozumab (122, 123). Toutefois, ces médicaments ne sont pas sans effets secondaires. Ainsi, à cause de leur capacité de régénérations, les MSC sont de plus en plus étudiées pour des fins d'utilisation comme un traitement de l'ostéoporose.

Les BM-MSC peuvent être induits à se différencier en ostéoblastes *in vitro*. Les BM-MSC se transforment initialement en cellules engagées non différenciées appelées ostéoblastes qui expriment fortement la phosphatase alcaline (ALP) et le collagène de type I qui servira de matrice extracellulaire (ECM) pour le dépôt de calcium. En fin de différenciation, les ostéoblastes deviennent des ostéocytes qui sont des cellules métaboliquement actives qui expriment fortement l'ostéocalcine, l'ostéopontine, la BSP (*Bone sialoprotein*) et qui forment les dépôts de calcium (124). Les ostéocytes expriment aussi des facteurs de croissance comme les BMPs (*bone morphogenic proteins*) et le TGF- β (*transforming growth-factor- β*). En outre, le début de la différenciation est marqué par le ralentissement de la prolifération suivit de son arrêt définitif dans les ostéocytes (125).

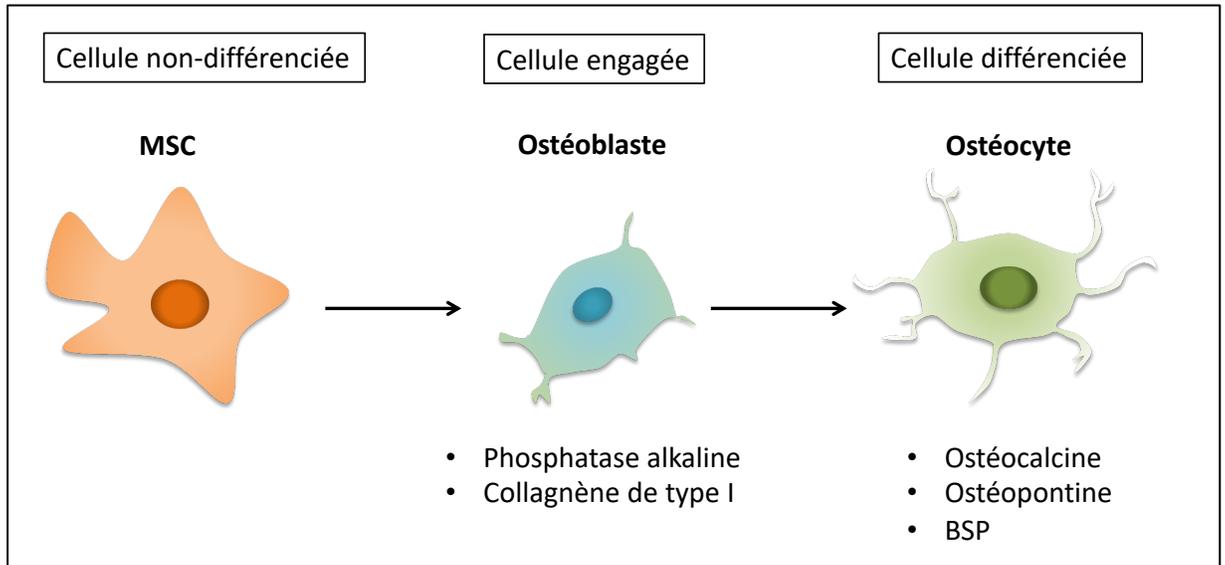


Figure 6. Schéma représentatif des étapes de la différenciation des MSC en ostéocytes.

D'autre part, les ostéocytes jouent plusieurs rôles dans le tissu osseux. Ils sont responsables de la formation osseuse, de la sécrétion de facteurs de croissance et favorisent la différenciation des ostéoclastes par l'intermédiaire de la sécrétion du M-CSF (*Macrophage colony stimulating factor*) et de RANKL (124).

Le protocole standard pour la différenciation ostéogénique *in vitro* étant l'incubation des MSC dans un milieu contenant de la dexaméthasone, de l'acide ascorbique et du β -glycérophosphate pour 2 à 3 semaines (126). La dexaméthasone est un glucocorticoïde synthétique capable d'induire l'ostéogénèse par la stimulation de Runx2 (*Runt-related transcription factor 2*), un gène qui joue un rôle central dans ce type de différenciation (127). Par contre, différentes concentrations de dexaméthasone sont utilisées pour induire la différenciation en ostéoblastes, adipoblastes ou chondroblastes. Pareillement, l'acide ascorbique est utilisé dans les trois types de différenciation et sert à stimuler la sécrétion du collagène de type I. Finalement, le β -glycérophosphate représente une source de phosphate et de minéraux essentiels pour la minéralisation des os en plus de son rôle indirect dans la stimulation des gènes de l'ostéogénèse (127).

2.2.2 Les facteurs de transcription contrôlant la différenciation des MSC en ostéocytes

Les facteurs de transcriptions jouent un rôle important dans la régulation de la différenciation des MSC en ostéocytes. Runx2, appelé aussi Cbfa1 (*Core-binding factor alpha 1*), est un facteur de transcription clé dans l'ostéogenèse. En effet, plusieurs voies de signalisation jouent un rôle dans la différenciation des cellules en ostéocytes : la voie TAK1 (*Transforming growth factor b-activated kinase 1*), la voie des BMP (*Bone morphogenetic protein*), la voie Hedgehog, la voie Notch, la voie PTH (*parathyroid hormone*), la voie Wnt (*wingless/integrated*) et finalement, la voie RANKL (128-133). Mais, deux voies de signalisation sont essentielles dans l'ostéogenèse : la voie Wnt/ β -catenin et la voie des BMP. Dans ce qui suit, ces deux voies seront discutées dans le cadre de l'ostéogenèse.

2.2.2.1 La voie des BMP

Les BMP sont des facteurs de croissance importants pour la différenciation en ostéocytes. En effet, les BMP sont capables d'attirer les MSC non différenciés vers les sites de dommages osseux participant ainsi à la réparation tissulaire (134). La signalisation par les BMP passe par deux voies distinctes : une voie qui dépend des Smad et une autre qui ne dépend pas des Smad. Les Smad (*Small Mothers Against Decapentaplegic*) sont des protéines qui permettent l'intégration de l'information de plusieurs voies de signalisations différentes. La famille des Smad est ainsi capable de réguler l'activité et l'expression des membres de la superfamille de TGF- β (*Transforming growth factor beta*) comme : les BMP, les GDP (*Growth differentiation factors*) et les activines (125). Les BMP sont connus pour induire la formation osseuse (135). Les BMP, sécrétés par les cellules, se lient à leurs récepteurs, les BMPR, et signalent de façon canonique à travers les Smad ou, de façon non canonique à travers la voie p38/MAPK (136).

La liaison de BMP-2 à son récepteur induit l'activation des Smad1/5 qui transloquent vers le noyau et induisent l'expression du facteur de transcription Dlx5 (*Distal-Less homeobox 5*) important dans l'ostéogenèse dans les MSC (137). Dlx5 va ensuite induire la transcription de Runx2. Runx2 est un facteur de transcription clé qui régule l'ostéogenèse. Les souris déficientes en Runx2 meurent peu après la naissance et présentent une absence d'ostéoblastes et d'ossification dans leurs squelettes (138, 139). Runx2 est responsable de l'activation des gènes de l'ostéogenèse comme : le facteur de transcription ostérix (Osx) aussi nommé Sp7 (140). Une mutation dans le gène Sp7 entraîne la maladie mentionnée plus haut : *osteogenesis imperfecta* (141). De plus, les souris déficientes en Osx n'ont pas de formation osseuse, mais expriment le gène Runx2 alors que les souris déficientes en Runx2 n'expriment pas l'Osx ce qui montre que Runx2 agit en amont de Osx (142).

Les Smad activent aussi l'expression du facteur de transcription Msx2 (Msh Homeobox 2) responsable de l'expression de l'ostéocalcine, une hormone spécifique des ostéoblastes (143). À son tour, Runx2 active l'expression de BMP-2 et de BMP-4. L'expression des BMP est induite aussi par plusieurs autres voies de signalisations à titre d'exemple, la voie Shh (*Sonic hedgehog*) qui induit l'expression de BMP-2 via l'activation de Gli2 (*Glioma-associated oncogene family zinc finger 2*), un régulateur de la transcription (144).

Le BMP-2 active aussi la voie p38/MAPK qui, à son tour, mène à la phosphorylation et à l'activation de Runx2. La phosphorylation de Runx2 permet son interaction avec Smad ce qui promeut la transcription de l'ALP, une enzyme importante dans la minéralisation osseuse et dont le pic d'expression se trouve à jour 12 de la différenciation chez l'humain (145, 146). L'ALP est une enzyme qui existe sous quatre isoformes ayant chacun un rôle distinct. L'isoforme de l'ALP ayant un rôle dans l'ostéogenèse est exprimé dans le foie, l'os et les reins (147, 148).

Il existe des mécanismes de rétroaction négative permettant de réguler l'activité de Runx2 comme par son ubiquitination à travers son interaction avec Smurf1 (*SMAD Specific E3 Ubiquitin Protein Ligase 1*) (149). TWIST (*Twist Family BHLH Transcription Factor 1*) est

un facteur de transcription qui participe également à la rétroaction négative de Runx2. TWIST est capable d'inhiber l'ostéogenèse en se liant directement à Runx2 et en inhibant sa capacité de liaison à l'ADN (150). Les souris hétérozygotes pour *TWIST* présentent des os surdéveloppés, des membres anormaux et des doigts excédentaires (151). Au contraire, la surexpression de Twist inhibe la capacité de Runx2 à lier l'ADN et à activer les gènes de l'ostéogenèse ce qui résulte en l'inhibition de l'ostéogenèse (152, 153). Dans les MSC, l'inhibition de Twist par des shRNA (short hairpin RNA) permet de favoriser la différenciation en ostéocytes (154).

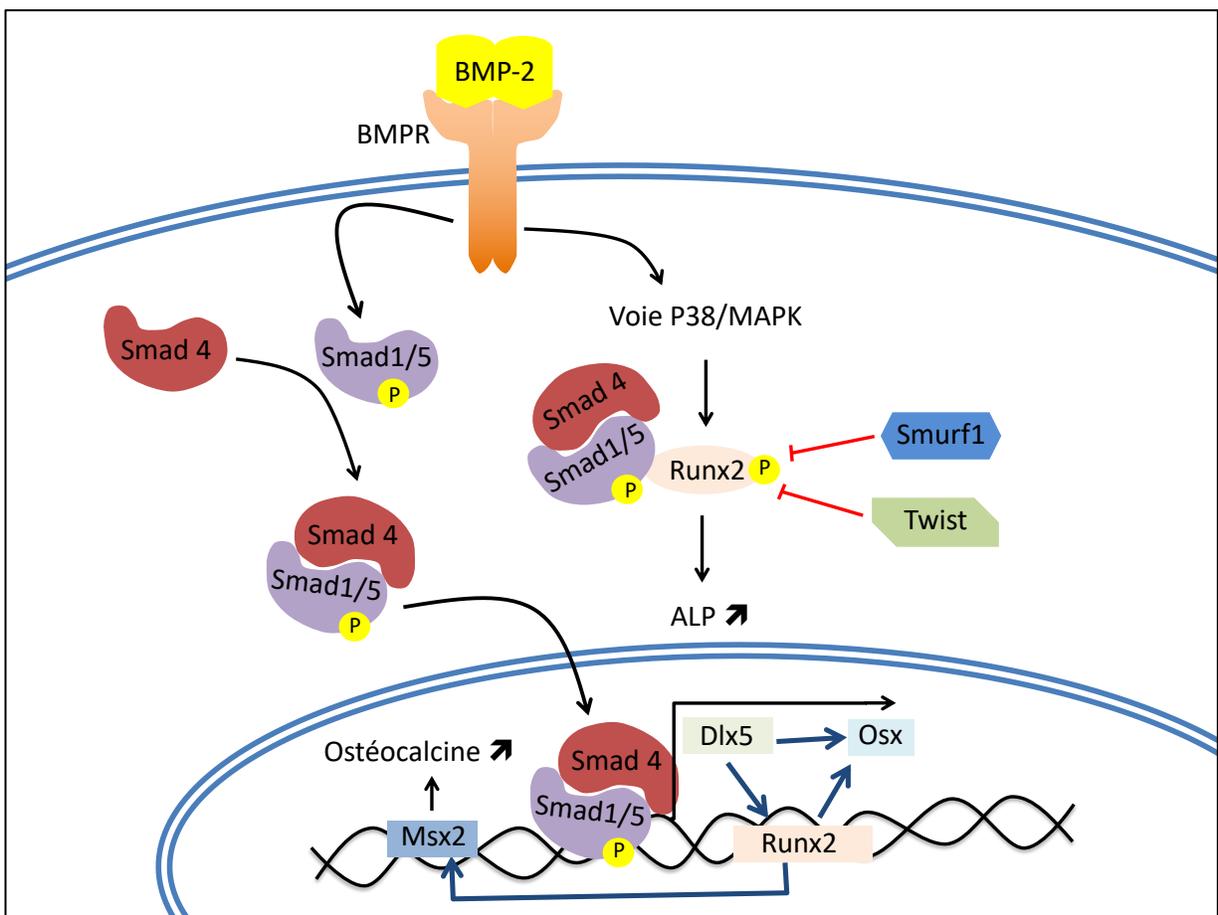


Figure 7. Représentation schématique de l'activation de l'ostéogenèse par la voie des BMP.

2.2.2.2 La voie wnt/ β -caténine

Les protéines de la famille wnt sont des glycoprotéines sécrétées impliquées dans le développement embryonnaire, la croissance et la différenciation (155). La voie de signalisation canonique wnt dépendante de la β -caténine joue un rôle essentiel dans l'ostéogenèse (156). En effet, BMP-2 augmente l'expression des protéines impliquées dans cette signalisation : les protéines wnt, LRP5/6 (*Low density lipoprotein receptor-related protein 5/6*) et la β -caténine. Les glycoprotéines sécrétées de la famille wnt signalent à travers le récepteur Frz (*Frizzled*) et son co-récepteur LRP5/6. La liaison de wnt sur son complexe de récepteur inhibe la phosphorylation de la β -caténine ce qui évite sa dégradation et permet sa translocation au noyau. Dans le noyau, la β -caténine active l'expression de Runx2 permettant ensuite l'expression des gènes de l'ostéogenèse (129). De même que pour la voie des BMP, la voie wnt/ β -caténine est régulée négativement. La sclérostine (Sost) peut inhiber l'ostéoblastogenèse en signalant à travers LRP5/6 (157, 158).

2.2.3 L'interaction MSC/HSC

Les MSC constituent un élément essentiel à la niche des cellules souches hématopoïétiques (HSC). Dans la moelle osseuse, les MSC co-localisent avec les HSC et, la délétion des MSC de la moelle osseuse réduit grandement la quantité de HSC (159). De plus, les MSC et les HSC se régulent entre eux à travers la sécrétion de facteurs solubles. Par exemple, le G-CSF (*Colony-stimulating cytokine*), une cytokine sécrétée des par les HSC, inhibe la prolifération et la différenciation des MSC (159).

Indépendamment de leur propriété de différenciation et de régénération de tissu, les MSC régulent de l'homéostasie tissulaire. En effet, les MSC sont capables d'interagir avec les joueurs du système immunitaire inné et adaptatif et de se polariser en MSC pro ou anti-inflammatoire en fonction des signaux captés dans le milieu (160). Ainsi, dans des conditions

pro-inflammatoires où l'on retrouve de fortes doses d'IFN- γ et de TNF- α les MSC acquièrent un phénotype anti-inflammatoire. Leur propriété immunosuppressive se caractérise par une capacité à sécréter des facteurs comme le HGF (*Hepatocyte growth factor*), le TGF- β (*Transforming growth factor β*), la prostaglandine E2 (PGE2) et de l'indolamine 2,3-dioxygénase (IDO). Tous ces facteurs favorisent la polarisation des macrophages vers un phénotype anti-inflammatoire (M2) et la production de cellules T régulatrices (161). De plus, plusieurs études ont montré que la co-culture des MSC et des macrophages mène à la polarisation anti-inflammatoire des macrophages (M0 vers M2) (162). En contraste, dans des conditions anti-inflammatoires où l'on retrouve de faibles doses d'IFN- γ et de TNF- α , les MSC acquièrent un phénotype pro-inflammatoire. Les MSC pro-inflammatoires sécrètent alors des chimiokines, comme le CXCL9/10, capables de recruter les lymphocytes activant les cellules T (161).

Les MSC possèdent des propriétés immunosuppressives d'où les multiples essais cliniques de co-transplantation de MSC et de HSC visant à diminuer l'incidence de la maladie du greffon contre l'hôte (GVH) après la transplantation allogénique de HSC (163). Ces effets immunosuppressifs des MSC ont été démontrés *in vivo* (164).

2.2.4 Les effets des cytokines sur la différenciation des MSC

Les cellules souches mésenchymateuses sécrètent constitutivement une panoplie de cytokines et de facteurs de croissance : l'IL-6, le TGF- β , le M-CSF (*Macrophage colony-stimulating factor*), la PGE2, le VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) et l'angiopoïétin-1 (91). Les MSC sont ainsi capables de réguler les réponses immunitaires. Les cellules immunitaires sécrètent elles aussi une panoplie de cytokines et, selon le contexte, ces cytokines modulent la capacité de différenciation des MSC. Les cytokines de la famille de l'IL-6 jouent un rôle essentiel dans le remodelage osseux et, pour certaines cytokines, en

fonction de l'étape de la différenciation, la même cytokine peut avoir des effets inhibiteurs ou stimulateurs (165).

Les souris qui surexpriment l'OSM présentent notamment des anomalies au niveau de la croissance osseuse (166). L'OSM est sécrétée par les macrophages activés classiquement (M1). Comme mentionné précédemment, l'OSM favorise la différenciation des MSC en ostéoblastes et, l'incubation de MSC avec des macrophages activés induisait la différenciation de ces cellules en ostéoblastes (87, 167, 168). De plus, la neutralisation du gp130 ou l'inhibition des STAT3, du JAK3 et de MEK préviennent les effets pro-ostéogéniques de l'OSM (168). Par contre, l'OSM a des effets inhibiteurs sur les ostéoblastes matures. L'OSM est ainsi capable d'inhiber l'expression des marqueurs de l'ostéogenèse comme l'ALP, l'ostéocalcine et la formation de nodules calcifiés dans les ostéoblastes (169).

L'importance des cytokines de la famille de l'IL-6 dans le remodelage osseux est aussi illustré par le syndrome de Stüve-Weidemann mentionné plus haut (78). Des études montrent que le LIF joue un rôle dans la favorisation de la différenciation des MSC en ostéoblastes. En effet, le LPS est capable d'activer les MSC à travers le *Toll-like receptor 4* (TLR4). L'activation du TLR4 induit ensuite la production de l'IL-6 et du LIF par les MSC contribuant ainsi à la différenciation de ces cellules en ostéoblastes (87). Une autre étude a montré que l'injection locale du LIF près de l'hémicalvarium, un os du crâne, chez la souris engendre l'augmentation du nombre d'ostéoblastes, de la surface couverte d'ostéoïdes et de la surface de minéralisation (170).

La cardiotrophine-1 (CT-1) est une cytokine de la famille de l'IL-6. Une étude a montré que les ostéoclastes sécrètent la CT-1 et que cette cytokine est capable de favoriser la minéralisation *in vitro* et *in vivo* chez les souris. Par contre, dans cette même étude, le traitement *in vitro* des cellules du calvarium avec la CT-1 n'a pas altéré significativement le niveau d'expression de l'ARN codant pour les facteurs de transcription essentiels à

l'ostéogenèse comme Runx2 et ostéix ni les niveaux de l'ARN codant pour les marqueurs des ostéocytes comme l'ostéocalcine et l'ALP (171).

Une étude suggère que le INF- γ inhibe l'ostéogenèse dans les BM-MSc *in vitro* (172). Dans cette étude, l'IL-6 et l'IL-27 n'avaient pas d'effet inhibiteur sur la différenciation des BM-MSc en ostéoblastes. Il a été aussi suggéré que l'inhibition de l'ostéogenèse par l'IFN- γ serait médié par Smad6, un régulateur négatif dans ce type de différenciation (172).

La leptine est une cytokine ayant un rôle dans la régulation de l'appétit et du métabolisme. Elle joue aussi un rôle dans la modulation des réponses immunitaire. Les MSC d'origine de la moelle osseuse expriment le récepteur de la leptine et, la leptine active STAT3 (173). Plusieurs études ont démontré le rôle de la leptine dans le maintien de la masse osseuse, mais les données sont contradictoires. Certaines études suggèrent que la leptine favorise la minéralisation et promeut la différenciation des MSC en ostéoblastes (174, 175) alors que d'autres suggèrent que la leptine inhibe la formation osseuse (176). Néanmoins, la leptine induit l'activation de STAT3 dans les MSC et des études additionnelles seraient nécessaires pour définir les mécanismes par lesquels cette hormone agit sur ces cellules.

2.2.5 L'utilisation thérapeutique des MSC

En raison de leurs capacités de différenciation, de leurs rôles dans la régulation du système immunitaire et de leur facilité d'obtention, les MSC sont de plus en plus étudiées pour des fins d'utilisation thérapeutiques (177). Les BM-MSc sont les plus fréquemment utilisées dans les thérapies et peuvent être allogéniques ou autologues. En effet, les MSC n'expriment normalement pas le CMH de classe II mais peuvent le faire dans des conditions où l'IFN- γ est présent, c'est-à-dire dans des conditions d'inflammations. L'utilisation de MSC allogéniques devient alors seulement un problème dans le cas d'administrations répétées visant l'amélioration d'une maladie chronique par exemple (178). La préparation des MSC pour des

fins thérapeutiques implique l'expansion en culture. Les MSC en culture expriment faiblement le CMH de classe I (179). De plus, des études ont montré que les MSC peuvent inhiber la réaction mixte lymphocytaire (MLR) et la prolifération des cellules T activées indépendamment du CMH dans le cas où les MSC sont allogéniques ou autologues (180-182). Les MSC possèdent alors des propriétés immunosuppressives et une méta-analyse de données des essais cliniques utilisant des MSC allogènes a montré que l'utilisation de ces derniers semble être sans danger (183).

Les MSC ont été utilisées dans des thérapies dirigées contre les métastases tumorales (184). La forte sécrétion d'IL-6 par les MSC a un effet neuroprotecteur sur les dommages cérébraux néonataux hypoxiques-ischémiques (185). Les MSC sont actuellement l'objet de 19 essais cliniques en phase III dont un dans le traitement des GVH, un autre dans le traitement de maladies cardiovasculaires et un dans le traitement de la maladie de Crohn (186-188). L'utilisation thérapeutique des MSC a été approuvée en 2012 par Santé Canada pour les enfants avec une GVH aigue (189). Cette même utilisation a été approuvée en Nouvelle-Zélande, au Japon, aux États-Unis et en Europe (92, 190, 191). Par contre, l'accès à cette thérapie n'est possible qu'à travers les essais cliniques, sauf pour le Japon. Le Darvadstrocel est un traitement à base de MSC allogéniques purifiées à partir du tissu adipeux humain adulte. L'utilisation du Darvadstrocel, commercialement connue sous le nom Alofisel, a été approuvée en mars 2018 pour le traitement des fistulas liées à la maladie de Crohn par l'Union européenne (192).

3. Hypothèse de recherche

Des travaux récents dans notre laboratoire ont montré que le CLCF1 promouvait l'expansion et la prolifération des cellules souches hématopoïétiques (HSC). Comme discuté plus haut, les MSC sont un élément important dans la niche des HSC. À titre d'exemple, la délétion des MSC de la moelle osseuse entraîne une très forte diminution de la quantité de HSC (159). Les MSC sont des cellules capables de se différencier notamment en ostéoblastes, chondroblastes ou adipoblastes en réponse à une induction *in vitro*. Plusieurs études ont démontré un rôle des cytokines dans la régulation de la différenciation des MSC. À titre d'exemple, il a été démontré que le CNTF, une cytokine qui partage un récepteur avec le CLCF1, inhibe la minéralisation des ostéoblastes (159). Le CLCF1 est capable de signaler à travers le CNTFR, un récepteur qui comprend trois chaînes : CNTFR α , gp130 et LIFR β . Une mutation qui inactive la chaîne LIFR β mène au syndrome de Stüve-Wiedemann qui se caractérise par des anomalies dans la formation osseuse et une ostéoporose dans les individus qui survivent la première année de vie (79). Ceci indique un rôle potentiel des cytokines qui signalent à travers la chaîne LIFR β dans le métabolisme osseux d'où notre hypothèse que le CLCF1 module la différenciation des MSC en ostéoblastes.

CHAPITRE II. ARTICLE

Article submitted to the Journal of Biological Chemistry (JBC)

Manuscript # JBC/2019/008361 (Status: in revision)

Cardiotrophin-like cytokine (CLCF1) modulates mesenchymal stem cell osteoblastic differentiation.

Sarah Nahlé¹, Sarah Pasquin¹, Véronique Laplante¹, Mukut Sharma² and Jean-François Gauchat^{1*}

From the ¹Département de Pharmacologie et Physiologie, Université de Montréal, Montreal, Quebec H3C 3J7, Canada; ²Renal Division, Kansas City Veterans Affairs Medical Center, Kansas City, MO 64128-2226

Running title: CLCF1 modulates MSC osteoblastic differentiation

*To whom correspondence should be addressed: Jean-François Gauchat: Département de Pharmacologie et Physiologie, Université de Montréal, Montreal, QC, H3C 3J7, Canada; jf.gauchat@umontreal.ca; Tel. (514) 343-6111 ext. 31619; Fax. (514) 343-2291.

Keywords: Cardiotrophin-like cytokine (CLCF1), bone, cytokine, mesenchymal stem cells, osteoblasts, osteoporosis.

Abstract

Mesenchymal stem cells (MSC) are multipotent cells capable of differentiating into adipocytes, chondrocytes or osteocytes. MSC secrete an array of cytokines and express the LIFR β (leukemia inhibitory factor receptor) chain on their surface. Mutations in the gene coding for LIFR β lead to a syndrome with altered bone metabolism. LIFR β is one of the signalling receptor chains for Cardiotrophin-like cytokine (CLCF1), a neurotrophic factor known to modulate B and myeloid cell functions. We investigated its effect on MSC induced to differentiate into osteocytes *in vitro*. Our results indicate that CLCF1 binds mouse MSC, triggers STAT1 and 3 phosphorylation, inhibits the upregulation of master genes involved in the control of osteogenesis and markedly prevents osteoblast generation and mineralization. This suggests that CLCF1 could be a target for therapeutic intervention with agents such as cytokine traps or blocking mAbs in bone diseases such as osteoporosis.

Introduction

CLCF1 was initially identified as a cytokine expressed by immune cells signalling through the LIFR (1, 2). It was later shown to require the soluble cytokine receptor-like protein CRLF1 as chaperone to be efficiently secreted and to be a ligand for the tripartite ciliary neurotrophic factor receptor (CNTFR) comprising CNTFR α and LIFR signalling chains gp130 and LIFR β (3). Mutations inactivating the gene coding for LIFR β are associated with severe, mostly lethal Stüve-Wiederman syndrome that comprises skeletal manifestations such as bent long bones, reduced bone volume and osteoporosis (4-6). This indicates roles for cytokines signalling through LIFR β in the control of bone mineralization and metabolism. Bone phenotypes were, however, not reported in *CLCF1* deficient mice or patients with mutations in *CLCF1*, suggesting that the functions of this cytokine regarding osteogenesis are redundant or different from those of other cytokines signalling through LIFR β (7-9). In support of the latter hypothesis, CLCF1 was shown to have modest inhibitory effects on Osterix expression and mineralization in primary calvarial osteoblast cultures (10). Variations in CLCF1 levels have been recently associated with postmenopausal osteoporosis (11).

Osteogenesis is a complex multistep process and it is likely that CLCF1 plays a role in cellular transitions. Differentiation of mesenchymal stem cells into osteoblasts can be induced *in vitro* (12). To further investigate the effect of CLCF1 on osteogenesis, we examined the capacity of CLCF1 to bind, activate JAK/STAT signalling and regulate osteoblastic differentiation in mouse MSC.

Results

CLCF1 binds and triggers signalling in MSC.

To assess whether CLCF1 has the potential to modulate MSC fate, we analysed the binding of biotinylated CLCF1 to the non-hematopoietic (CD45⁻) mouse bone marrow cell fraction that comprises MSC (Figure 1, A and B). Flow-cytometry analysis of primary bone marrow cells incubated with biotinylated CLCF1 showed that 15-20% of the CD45⁻ cells bind CLCF1 (Figure 1A). To investigate the expression of CLCF1 receptors by MSC, we expanded bone marrow cells under conditions favoring MSC growth to near homogeneity ($\geq 99\%$ CD45⁻ and $\geq 99\%$ Sca1⁺). A distinct binding could be observed on a large fraction of the *in vitro*-expanded MSC (Figure 1, C and D).

CLCF1 is a ligand for the CNTFR (3) as well as for the multi-ligand receptors sortilin and SorLA (13, 14). MSC express CNTFR and sortilin (15, 16). We therefore investigated whether CLCF1 could activate JAK/STAT signalling in MSC. As CNTFR activation by CLCF1 induces STAT1 and STAT3 phosphorylation (3, 17), we focused our investigation on these two transcription factors. Up-regulation of both STAT1 and STAT3 tyrosine phosphorylation could be detected in response to CLCF1 and this up-regulation was inhibited by the JAK inhibitor Ruxolitinib (Figure 2, A-C). We compared CLCF1 with LIF, a cytokine that activates the signalling chains of the CNTFR (18, 19). Dose response experiments indicate that CLCF1 is less potent than LIF in triggering STAT1 and STAT3 tyrosine phosphorylation (Figure 2, C). While these results did not discriminate between the known CLCF1 receptors, they indicate that CLCF1 induces the activation of a prototypic cytokine JAK/STAT signalling in MSC that could influence their differentiation.

CLCF1 regulates the expression of transcription factors involved in the control of osteoblast differentiation.

We next examined whether CLCF1 modulates the mRNA levels of transcription factors involved in osteoblast differentiation using quantitative RT-PCR. We compared MSC cultured under condition inducing osteogenesis in the absence or presence of CLCF1 (Figure 3). As expected, the mRNA levels of Osterix, Runx2 and Dlx5, 3 transcription factors implicated in osteoblast differentiation (20-22) were strongly up-regulated in MSC by the osteogenic culture medium (Figure 3). The up-regulation of these transcription factors was markedly reduced in the presence of CLCF1 (Figure 3). The observed effect was specific, as the level of the nuclear receptor PPAR γ mRNA, involved in adipocyte differentiation (23) was unaffected by the presence of CLCF1 (Figure 3).

CLCF1 inhibits the differentiation of MSC into osteoblasts.

The up-regulation of the mRNA levels of the osteoblast markers alkaline phosphatase and osteocalcin were also reduced when the osteoblast differentiation was induced in the presence of CLCF1 (Figure 3). To analyse whether this was associated with a reduction of mineralization, we quantified osteogenesis using alizarin-red staining (Figure 4, A and B). A striking decrease of the staining was observed in MSC cultures in which osteoblast differentiation was induced in the presence of CLCF1. Alkaline phosphatase activity, a marker of osteogenic differentiation involved in bone mineralization (24) was also reduced, albeit less markedly than hydroxyapatite deposit formation assessed by alizarin-red staining (Figure 4, C).

Discussion

We observed that CLCF1 binds MSC and that CLCF1 promotes STAT1 and STAT3 tyrosine phosphorylation, indicating that these cells respond to this cytokine. We therefore investigated the effect of CLCF1 on the differentiation of MSC into osteoblasts *in vitro*. A significant down regulation of the expression of mRNA coding for Osterix, Runx2 and Dlx5, the three transcription factors that regulate osteoblast differentiation (20-22), was detected in

MSC primed for osteogenesis in the presence of CLCF1. CLCF1 also inhibited the expression of osteocalcin and alkaline phosphatase mRNA, two markers of osteoblastic differentiation. In line with these effects, CLCF1 markedly reduced mineralization and alkaline phosphatase activity. Our results are in accordance with previous reports regarding the effect of CLCF1 on Osterix expression and mineralization in primary calvarial osteoblasts. The effects of CLCF1 on MSC were more extensive than those reported on calvarial osteoblasts as Runx2 and osteocalcin mRNA levels were also down regulated in MSC (10). Our observations further indicate that CLCF1, like CNTF differs from LIF, cardiotrophin-1, oncostatin M and neuropoietin, the other cytokines signalling through LIFR β and gp130 in its effect on osteogenesis (25). This suggests that the tripartite CNTFR receptor (CNTFR α , LIFR β and gp130) has specific signalling properties and functions not shared with LIFR (comprising only LIFR β and gp130). Nonetheless, CLCF1 and CNTF may exert distinctive roles through sortilin, as both bind this alternative receptor (13) expressed by MSC (15). CLCF1 binds MSC, induces JAK/STAT signaling and regulates MSC differentiation. As MSC can be induced to generate several cell lineages besides osteoblasts, such as adipocytes, chondrocytes, myocytes and neuron-like cells (26-29), it will be of interest to investigate whether these processes are also regulated by CLCF1.

CLCF1 requires CRLF1 as chaperon for efficient secretion. The phenotype of CRLF1 knock-out mice suggests that CLCF1 is required for hematopoietic stem cell maintenance (30), a role that could involve bone marrow stromal cells such as MSC. CLCF1 administration was shown to promote B cell expansion and myelopoiesis (2, 31, 32). Ligands of CNTFR are believed to have direct and indirect effects on hematopoietic cells such as B cells (2, 31-33). Factors produced by bone marrow MSC in response to CLCF1 could contribute to the indirect effect of CLCF1 on hematopoietic cells.

In conclusion, our results indicate that CLCF1 can influence MSC differentiation and confirm that it regulates osteogenesis *in vitro*, indicating a new facet of activities for this cytokine.

Experimental procedures

Isolation of BM-MSCs

All procedures conformed to the Canadian Council on Animal Care guidelines and were approved by the Animal Ethics Committee of the Université de Montréal (CDEA). Tibiae and femora of C57BL/6 female mice purchased from Charles River Laboratories were dissected and washed with PBS. Bone marrows were flushed using AMEM media (Wisent Bioproducts, Saint-Jean-Baptiste, QC) containing 10% FBS, 4 mM of L-Glutamine, 1 IU/mL of penicillin and 100 µg/mL of streptomycin. The recovered cells were incubated in 100 mm petri dish at 37°C under a 5% CO₂ atmosphere for 5 days. The MSC isolation and expansion protocol was adapted from Huang et al. 2015 (34). Briefly, non-adherent cells were washed away with PBS. Adherent cells were detached with Trypsin/EDTA and split at a 1:3 ratio into 75 cm² culture flasks to deplete the hematopoietic cell pool. Cells were passaged at confluence and purity was assessed by flow cytometry using a FACS Canto II flow cytometer (BD Biosciences). For all experiments, MSC at passage 7 and above were used.

CLCF1 binding assays

Freshly isolated bone marrow cells from C57BL/6 mice were depleted from red blood cells and incubated for 1 h on ice with biotinylated CLCF1 ((35); 1 µg/mL) in PBS containing 1% BSA. Cells were washed and stained with Phycoerythrin (PE)-conjugated Streptavidin (BD Biosciences) and Allophycocyanin (APC)-conjugated anti-mouse CD45.2 (Thermo Fisher Scientific). The same protocol was used for the CLCF1 binding assays on the expanded MSC without anti-CD45 staining. Fluorescence was detected and quantified by flow cytometry.

Western blot analysis

MSC were plated at 5 x10⁴ cells/cm² overnight and serum starved for 24 h. MSC were then stimulated for 15 min with LIF (PeproTech) or recombinant murine CLCF1 (100 ng/mL). CLCF1 was produced, purified and tested as described previously (35). When included during

the stimulation, Ruxolitinib (Selleckchem, Houston, TX) was used at 10 μ M. Cells were washed with ice-cold PBS and lysed in RIPA lysis buffer containing protease (cOmplete™, Millipore-Sigma) and phosphatase inhibitors (Thermo Fisher Scientific). Proteins were subjected to PAGE and electrotransferred to polyvinylpyrrolidone blotting membranes. Membranes were sequentially incubated with rabbit antibodies specific for phospho-STAT1 (7649S, Cell Signalling Technology), phospho-STAT3 (4904S, Cell Signalling Technology), STAT1 (9172, Cell Signalling Technology) or STAT3 (9131L, Cell Signalling Technology) and with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (R&D Systems). Signals were revealed by chemiluminescence.

Osteogenic differentiation

Once MSC reached 90% confluence, the osteogenic induction media was added and replaced every 3-4 days for 3 weeks. The MSC were differentiated according to Stagg J. et al., 2006 (36). The osteogenic media consisted of the AMEM culture media described above supplemented with 0.1 μ M dexamethasone, 20 mM β -glycerophosphate and 200 μ M L-ascorbic acid 2-phosphate. Control wells contained non-supplemented AMEM media. CLCF1 was used at a concentration of 100 ng/mL.

Alizarin-red S staining and quantification

MSC incubated for 3 weeks in control or osteogenic media were washed 3x and fixed for 1 h in PBS, 4% formaldehyde. The fixed cells were then washed 3x with water, stained in 40 mM Alizarin Red S (Sigma Aldrich) pH 4.1-4.3 for 20 min and washed with water. Staining was analysed by microscopy. Photos of the wells were taken using a Fujifilm FinePix F770EXR camera. For mineralization quantification, cells were gently shaken at room temperature in 10% cetylpyridinium chloride, 10 mM sodium phosphate, pH 7.0 to extract the red dye (37). The absorbance (A at 570 nm) of the extracts diluted 1:5 was assessed using a Viktor² microplate reader (Perkin-Elmer, Woodbridge, ON).

Alkaline phosphatase activity

MSC incubated for 3 weeks in control or osteogenic media were washed with PBS and lysed in 1% Triton X-100, 10 mM Tris-HCl pH 7.4. The cell lysates were scraped and subjected to 3 freeze-thaw cycles. Cell lysate aliquots were incubated at a 5:100 ratio with p-nitrophenyl phosphate liquid substrate (N7653, Sigma Aldrich). The reactions were stopped using 25 μ L of 3 M NaOH and the *A* at 405 nm measured. Protein concentration of cell lysates was quantified using a bicinchoninic acid protein assay kit (Thermo Fisher Scientific).

Quantitative PCR (qPCR)

MSC incubated for 3 weeks in control or osteogenic media were detached and total RNA was isolated using TRIzol™ (Thermo Fisher Scientific). RNA was further purified using RNeasy Mini Kit columns (Qiagen). RNA concentrations were measured using a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). RNA integrity was assessed using a BioAnalyzer (Agilent Technologies). A high capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) was used to generate the cDNA using aliquots of 1 μ g of RNA as template. Levels of specific mRNA were quantified with a QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR System. Results were normalized using the HPRT mRNA levels as an endogenous control that was not regulated by CLCF1. Primer pairs used are indicated in table 1.

Acknowledgements:

We thank the Institute for Research in Immunology and Cancer genomic platform for the RT-qPCR. We thank Dr. Moutih Rafei, Yun Cui and Jamila Abusara (Département de Pharmacologie et Physiologie, Université de Montréal) for their kind help with MSC cultures and for their initial donation of MSC. We thank Dr. Armelle LeCampion (Flow Cytometry Core Facility, Université de Montréal) for support with flow cytometry.

Conflict of interest:

The authors have no financial conflicts of interest.

Author contributions:

J.-F. G., S. P. and S. N. conceptualization; S. N., S. P. and V. L. formal analysis; J.-F. G., S. N. and M. S. writing-review and editing; J.-F. G. supervision and writing of original draft.

References

1. Shi Y, Wang W, Yourey PA, Gohari S, Zukauskas D, Zhang J, et al. Computational EST database analysis identifies a novel member of the neuropoietic cytokine family. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;262(1):132-8.
2. Senaldi G, Varnum BC, Sarmiento U, Starnes C, Lile J, Scully S, et al. Novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3: a cytokine of the IL-6 family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(20):11458-63.
3. Elson GC, Lelievre E, Guillet C, Chevalier S, Plun-Favreau H, Froger J, et al. CLF associates with CLC to form a functional heteromeric ligand for the CNTF receptor complex. *Nat Neurosci.* 2000;3(9):867-72. Epub 2000/08/31.
4. Dagoneau 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. *American journal of human genetics.* 2004;74(2):298-305. Epub 2004/01/24.
5. Gaspar IM, Saldanha T, Cabral P, Vilhena MM, Tuna M, Costa C, et al. Long-term follow-up in Stuve-Wiedemann syndrome: a clinical report. *American journal of medical genetics.* 2008;146A(13):1748-53. Epub 2008/06/12.
6. Jung C, Dagoneau N, Baujat G, Le Merrer M, David A, Di Rocco M, et al. Stuve-Wiedemann syndrome: long-term follow-up and genetic heterogeneity. *Clin Genet.* 2010;77(3):266-72. Epub 2010/05/08.
7. Rousseau F, Gauchat JF, McLeod JG, Chevalier S, Guillet C, Guilhot F, et al. Inactivation of cardiotrophin-like cytokine, a second ligand for ciliary neurotrophic factor

receptor, leads to cold-induced sweating syndrome in a patient. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(26):10068-73. Epub 2006/06/20.

8. Zou X, Bolon B, Pretorius JK, Kurahara C, McCabe J, Christiansen KA, et al. Neonatal death in mice lacking cardiotrophin-like cytokine is associated with multifocal neuronal hypoplasia. *Veterinary pathology*. 2009;46(3):514-9.

9. Hahn AF, Waaler PE, Kvistad PH, Bamforth JS, Miles JH, McLeod JG, et al. Cold-induced sweating syndrome: CISS1 and CISS2: manifestations from infancy to adulthood. Four new cases. *J Neurol Sci*. 2010;293(1-2):68-75. Epub 2010/04/20.

10. McGregor NE, Poulton IJ, Walker EC, Pompolo S, Quinn JM, Martin TJ, et al. Ciliary neurotrophic factor inhibits bone formation and plays a sex-specific role in bone growth and remodeling. *Calcified tissue international*. 2010;86(3):261-70. Epub 2010/02/17.

11. Ge JR, Xie LH, Chen J, Li SQ, Xu HJ, Lai YL, et al. Liuwei Dihuang Pill () Treats Postmenopausal Osteoporosis with Shen (Kidney) Yin Deficiency via Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription Signal Pathway by Up-regulating Cardiotrophin-Like Cytokine Factor 1 Expression. *Chinese journal of integrative medicine*. 2018;24(6):415-22. Epub 2016/12/29.

12. Cheng SL, Yang JW, Rifas L, Zhang SF, Avioli LV. Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. *Endocrinology*. 1994;134(1):277-86. Epub 1994/01/01.

13. Larsen JV, Hansen M, Moller B, Madsen P, Scheller J, Nielsen M, et al. Sortilin facilitates signaling of ciliary neurotrophic factor and related helical type 1 cytokines targeting the gp130/leukemia inhibitory factor receptor beta heterodimer. *Molecular and cellular biology*. 2010;30(17):4175-87. Epub 2010/06/30.

14. Larsen JV, Kristensen AM, Pallesen LT, Bauer J, Vaegter CB, Nielsen MS, et al. Cytokine-Like Factor 1, an Essential Facilitator of Cardiotrophin-Like Cytokine:Ciliary Neurotrophic Factor Receptor alpha Signaling and sorLA-Mediated Turnover. *Mol Cell Biol*. 2016;36(8):1272-86.

15. Maeda S, Nobukuni T, Shimo-Onoda K, Hayashi K, Yone K, Komiya S, et al. Sortilin is upregulated during osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells and promotes extracellular matrix mineralization. *Journal of cellular physiology*. 2002;193(1):73-9. Epub 2002/09/05.

16. Djouad F, Bony C, Häupl T, Uzé G, Lahlou N, Louis-Plence P, et al. Transcriptional profiles discriminate bone marrow-derived and synovium-derived mesenchymal stem cells. *Arthritis Research & Therapy*. 2005;7(6):R1304.
17. Lelievre E, Plun-Favreau H, Chevalier S, Froger J, Guillet C, Elson GC, et al. Signaling pathways recruited by the cardiotrophin-like cytokine/cytokine-like factor-1 composite cytokine: specific requirement of the membrane-bound form of ciliary neurotrophic factor receptor alpha component. *J Biol Chem*. 2001;276(25):22476-84. Epub 2001/04/11.
18. Davis S, Aldrich TH, Stahl N, Pan L, Taga T, Kishimoto T, et al. LIFR beta and gp130 as heterodimerizing signal transducers of the tripartite CNTF receptor. *Science*. 1993;260(5115):1805-8.
19. Ip NY, Nye SH, Boulton TG, Davis S, Taga T, Li Y, et al. CNTF and LIF act on neuronal cells via shared signaling pathways that involve the IL-6 signal transducing receptor component gp130. *Cell*. 1992;69(7):1121-32.
20. Heo JS, Lee SG, Kim HO. Distal-less homeobox 5 is a master regulator of the osteogenesis of human mesenchymal stem cells. *International journal of molecular medicine*. 2017;40(5):1486-94. Epub 2017/09/28.
21. Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, et al. Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell*. 1997;89(5):765-71. Epub 1997/05/30.
22. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*. 2002;108(1):17-29. Epub 2002/01/17.
23. Hegele RA, Cao H, Frankowski C, Mathews ST, Leff T. PPARG F388L, a transactivation-deficient mutant, in familial partial lipodystrophy. *Diabetes*. 2002;51(12):3586-90. Epub 2002/11/28.
24. Siffert RS. The role of alkaline phosphatase in osteogenesis. *J Exp Med*. 1951;93(5):415-26. Epub 1951/05/01.
25. Pasquin S, Sharma M, Gauchat JF. Cytokines of the LIF/CNTF family and metabolism. *Cytokine*. 2016;82:122-4.
26. Kuznetsov SA, Krebsbach PH, Satomura K, Kerr J, Riminucci M, Benayahu D, et al. Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after

transplantation in vivo. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 1997;12(9):1335-47. Epub 1997/09/01.

27. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res*. 1998;238(1):265-72. Epub 1998/02/11.

28. Wakitani S, Saito T, Caplan AI. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle & nerve*. 1995;18(12):1417-26. Epub 1995/12/01.

29. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *Journal of neuroscience research*. 2000;61(4):364-70. Epub 2000/08/10.

30. Alexander WS, Rakar S, Robb L, Farley A, Willson TA, Zhang JG, et al. Suckling defect in mice lacking the soluble haemopoietin receptor NR6. *Curr Biol*. 1999;9(11):605-8.

31. Senaldi G, Stolina M, Guo J, Faggioni R, McCabe S, Kaufman SA, et al. Regulatory effects of novel neurotrophin-1/b cell-stimulating factor-3 (cardiotrophin-like cytokine) on B cell function. *J Immunol*. 2002;168(11):5690-8. Epub 2002/05/23.

32. Pasquin S, Laplante V, Kouadri S, Milasan A, Mayer G, Tormo AJ, et al. Cardiotrophin-like Cytokine Increases Macrophage-Foam Cell Transition. *J Immunol*. 2018;201(8):2462-71.

33. Askmyr M, White KE, Jovic T, King HA, Quach JM, Maluenda AC, et al. Ciliary neurotrophic factor has intrinsic and extrinsic roles in regulating B cell differentiation and bone structure. *Scientific reports*. 2015;5:15529.

34. Huang S, Xu L, Sun Y, Wu T, Wang K, Li G. An improved protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. *Journal of orthopaedic translation*. 2015;3(1):26-33. Epub 2014/08/27.

35. Pasquin S, Chehboun S, Dejda A, Meliani Y, Savin V, Warner GJ, et al. Effect of human very low-density lipoproteins on cardiotrophin-like cytokine factor 1 (CLCF1) activity. *Scientific reports*. 2018;8(1):3990.

36. Stagg J, Pommey S, Eliopoulos N, Galipeau J. Interferon-gamma-stimulated marrow stromal cells: a new type of nonhematopoietic antigen-presenting cell. *Blood*. 2006;107(6):2570-7. Epub 2005/11/19.

37. Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Analytical biochemistry*. 2004;329(1):77-84. Epub 2004/05/12.

FOOTNOTES

Funding was provided by Canadian Institutes of Health Research (CIHR) grants MOP-57832 and PTJ 159654 (to J.-F.G.).

The abbreviations used are: APC, allophycocyanin; CLCF1, cardiotrophin-like cytokine factor-1; CNTFR, ciliary neurotrophic factor receptor; LIF, leukemia inhibitory factor; MSC, mesenchymal stem cells; PE, phycoerythrin. PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor.

Table 1. Forward and reverse primers used for RT-qPCR.

Gene	Forward sequence	Reverse sequence
Alpl	cggatcctgacaaaaacc	tcatgatgtccgtggtaaat
Runx2	gccagggcgtatttcaga	tgcttggtcttcttactgag
Sp7	agcaccaatggactcctctc	gggtgggtagtcatttgcatt
Dlx5	agccctaccaccagtagc	gtccgccacttctttctc
Bglap2	agactccggcgctacctt	ctcgtcacaagcagggttaag
Ctnnb1	ccaatggcttggaatgaga	gggatcatcctggcgata
Hprt	tcctcctcagaccgctttt	cctggttcacatcgtaatac

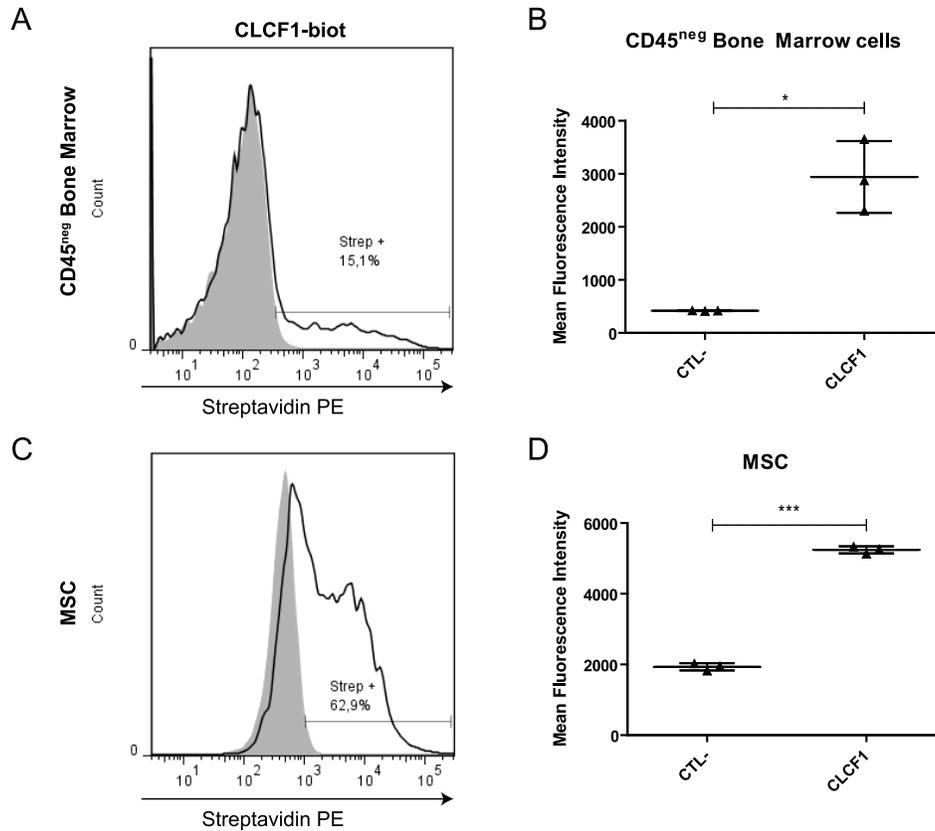


Figure 1. CLCF1 binds to a CD45^{neg} population in mouse bone marrow and to MSC. Freshly isolated bone marrow cells (1×10^6 cells) were incubated with biotinylated-CLCF1 ($1 \mu\text{g/mL}$) for 1 h then stained with an APC-conjugated anti-CD45.2 mAb and PE-conjugated streptavidin to detect the CLCF1 binding. Fluorescence was measured by flow cytometry. **(A)** The gray filled histogram and the black line show the PE-conjugated streptavidin control stain and the CLCF1 binding, respectively, both on the gated CD45^{neg} population. **(B, D)** The vertical dot plot shows the mean fluorescence intensity \pm SD of the CLCF1-biot binding compared to the control staining. Student's t-test was used to assess statistical significance. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. ($n = 3$ technical replicates). **(C)** MSC (1×10^6 cells) were incubated with biotinylated-CLCF1 ($1 \mu\text{g/mL}$) for 1 h then stained with a PE-conjugated streptavidin. Fluorescence was measured by flow cytometry. The gray filled histogram represents the fluorescence of MSCs incubated with streptavidin alone. The black line represents the fluorescence of MSCs incubated with CLCF1 and streptavidin.

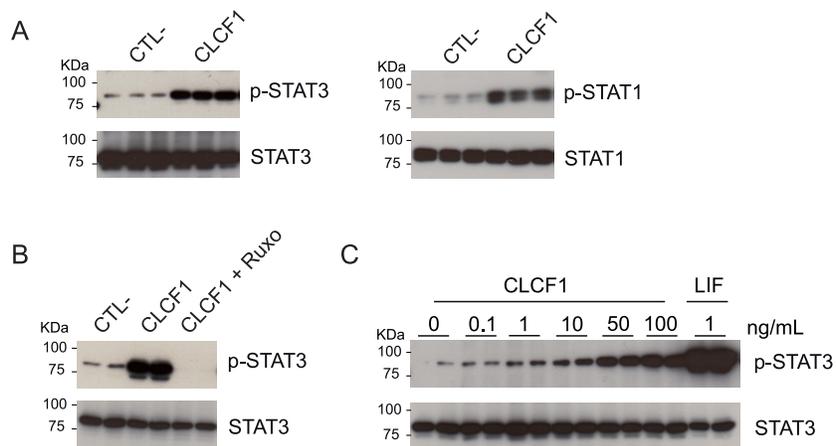


Figure 2. CLCF1 activates the phosphorylation of STAT1 and STAT3 in MSC. (A-B) MSCs were stimulated with CLCF1 (100 ng/mL) or with CLCF1 (100 ng/mL) \pm Ruxolitinib (Lane: CLCF1 + Ruxo; 10 μ M) for 15 min. Lysates were subjected to Western blot analysis using anti-phospho-STAT3 (p-STAT3), anti-STAT3, anti-phospho-STAT1 (p-STAT1) or anti-STAT1 mAb, respectively. Signals were revealed using HRP-labeled secondary antibody and chemiluminescence. **(C)** MSCs were stimulated with 0, 0.1, 1, 10, 50 or 100 ng/mL of CLCF1 or with 1 ng/mL of LIF for 15 min. Lysates were analyzed for p-STAT3 and total STAT3 levels as described above.

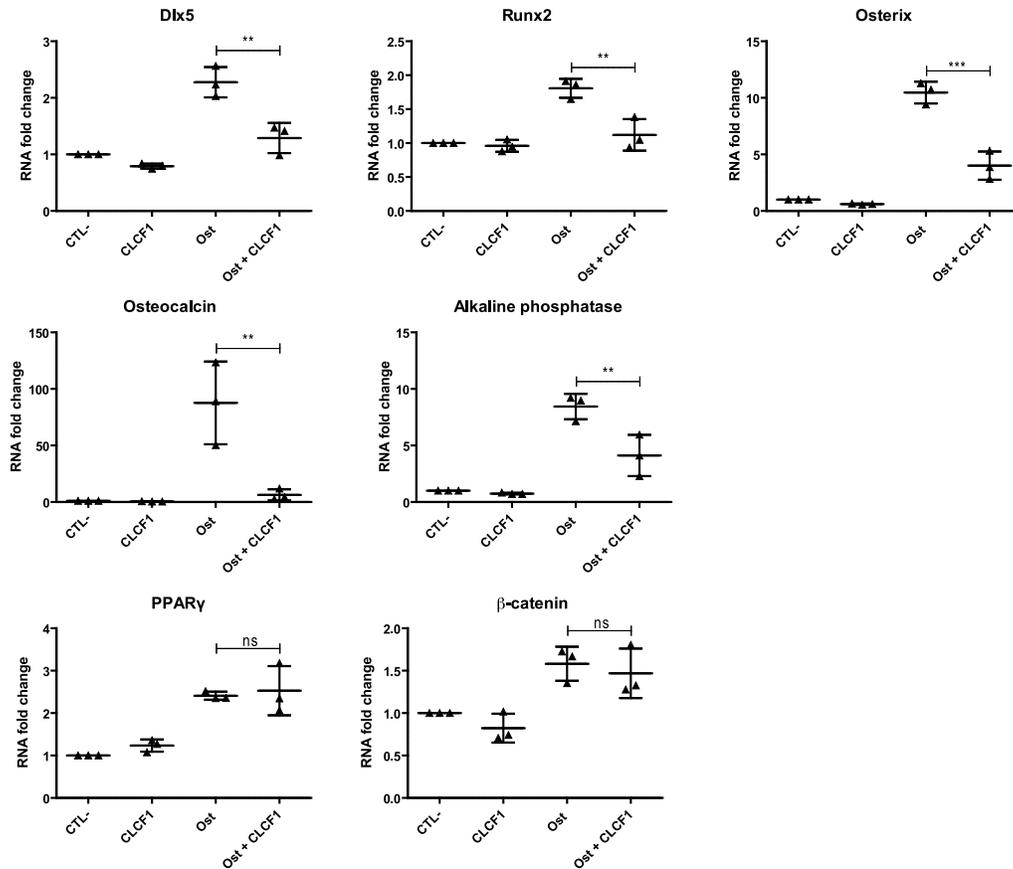


Figure 3. CLCF1 inhibits the induction of osteogenic specific genes in MSC. MSC were expanded in AMEM media (Ctl-), AMEM media supplemented with CLCF1 (100 ng/mL) (CLCF1), osteogenic media (Ost) or osteogenic media supplemented with CLCF1 (100 ng/mL) (Ost + CLCF1) for 3 weeks. DLx5, Runx2, Osterix, Osteocalcin, Alkaline phosphatase, β -catenin and PPAR γ mRNA expression was quantified by RT-qPCR. Results were normalized using the housekeeping gene HPRT mRNA levels. Vertical dot plots indicate mean mRNA fold changes \pm SD. Statistical significance was assessed using ANOVA test. **p < 0.01, ***p < 0.001, ns = not significant, n = 3 technical replicates.

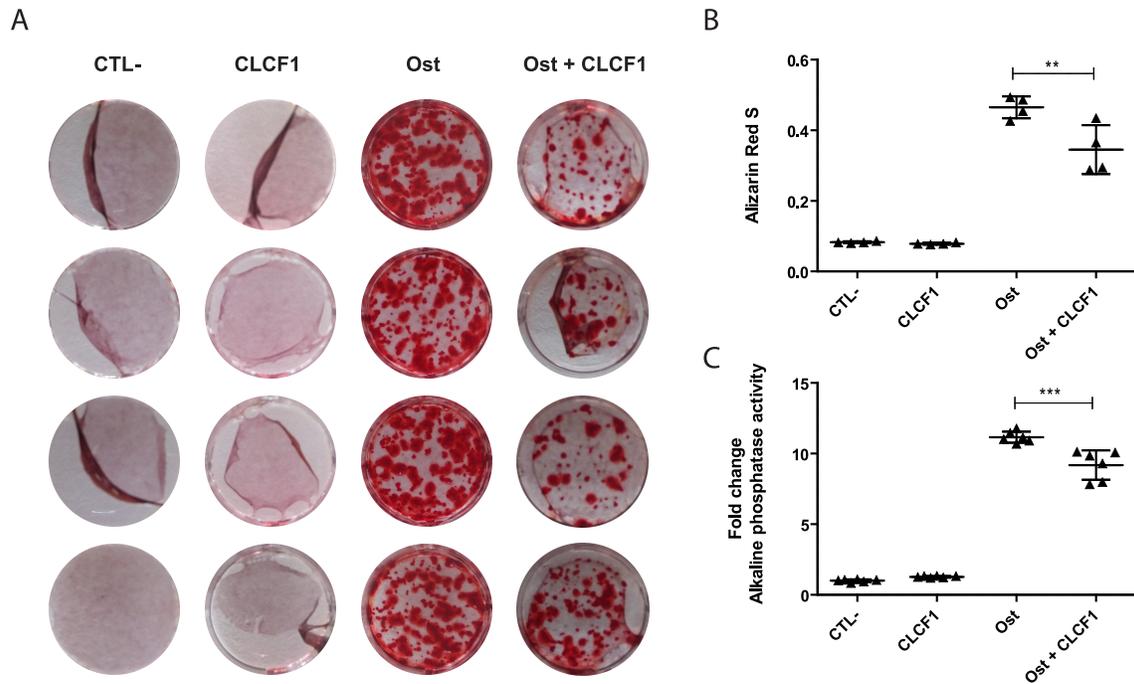


Figure 4. CLCF1 inhibits MSC differentiation into osteocytes. (A) Photographs of the alizarin red S stained cells. MSCs were expanded in AMEM media (Ctl-), AMEM media with CLCF1 (100 ng/mL) (CLCF1), osteogenic media (Ost) or osteogenic media supplemented with CLCF1 (100 ng/mL) (Ost + CLCF1) for 3 weeks. Calcium deposits were stained with alizarin red S. (B) Alizarin red S was extracted using cetylpyridinium chloride (10%) and the A_{570} nm was assessed. Vertical dot plots represent mean $A \pm SD$, $n = 4$ technical replicates. (C) To quantify alkaline phosphatase activity, MSCs were lysed in 1% Triton X-100 and incubated with p-nitrophenyl phosphate for 10 min. The total protein concentration was used to normalize the values. Vertical dot plots represent mean alkaline phosphatase activity $\pm SD$, $n = 6$ technical replicates. Statistical significance was analyzed using ANOVA. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

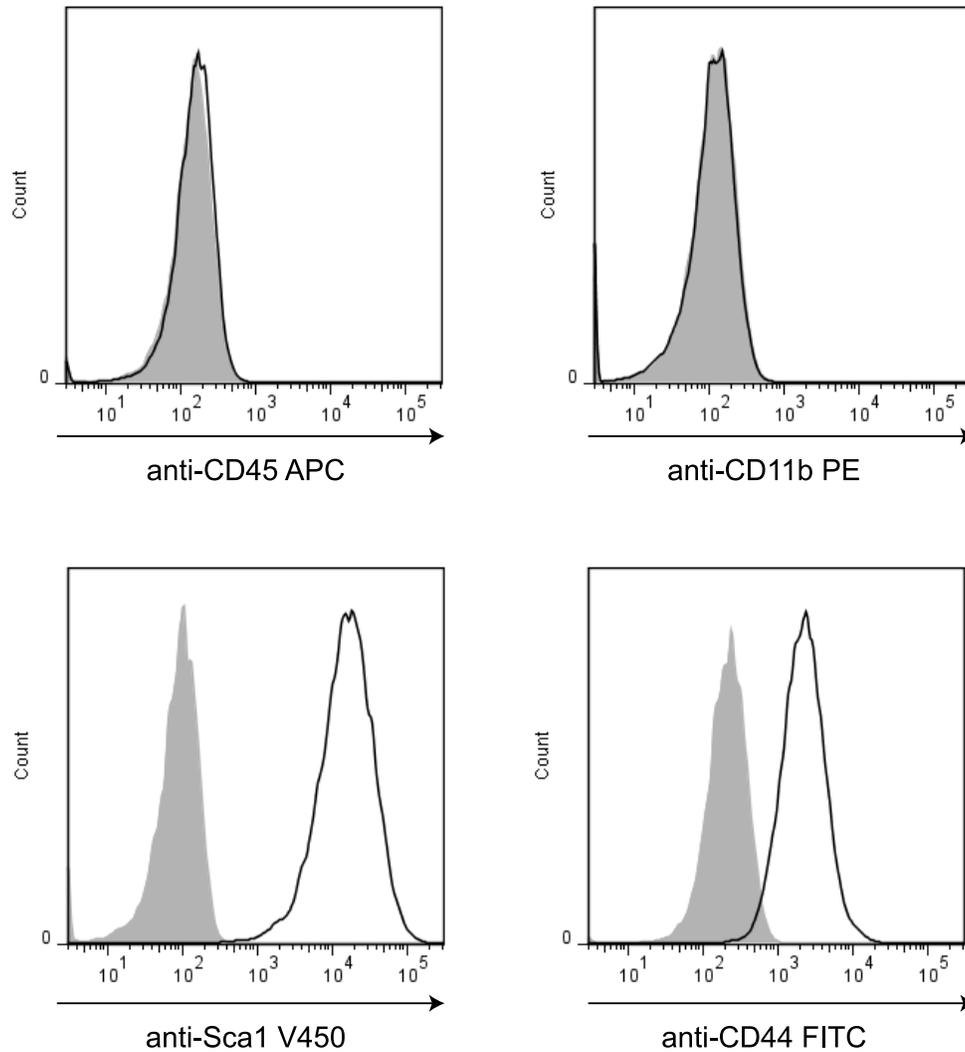


Figure S1. Mesenchymal stem cell surface marker expression. Bone marrow MSC surface marker expression was assessed by flow cytometry. Passage 8 MSC were detached and stained using APC-labelled anti-CD45.2, PE-labelled anti-CD11b, V450-labelled anti-Sca1 and FITC-labelled anti-CD44 antibodies. The gray shading and black line histograms show the unstained and stained MSC, respectively.

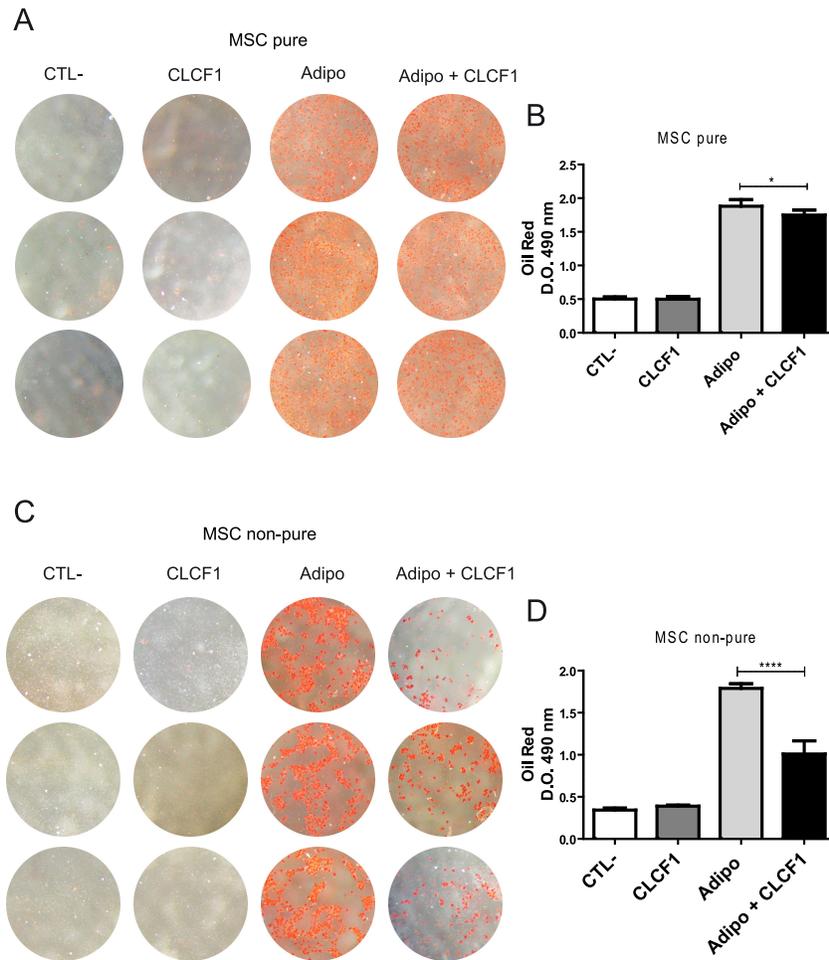


Figure S2. Le CLCF1 inhibe la différenciation des MSC en adipocytes. Des MSC à 99% (**A, B**) ou à < 80% (non-pures) (**C, D**) ont été induites à se différencier en adipocytes en présence ou en absence de CLCF1. Les milieux de culture utilisés sont: AMEM (CTL-), AMEM avec du CLCF1 (100 ng/mL) (CLCF1), milieu adipogénique (Adipo) (AMEM supplémenté avec 1 μ M de dexaméthasone, 0,5 mM d'isobutylméthylxantine, 60 μ M d'indométhacine et 5 μ g/mL d'insuline) ou, milieu adipogénique avec du CLCF1 (100 ng/mL) (Adipo + CLCF1). Les cellules ont été traitées pour 2 semaines, marquées à l'huile rouge et photographiées. Les photographies ont été coupées. (**B, D**) Quantification du marquage à l'huile rouge. L'huile rouge a été extraite des adipocytes à l'aide d'isopropanol. L'absorbance de l'extrait a été mesurée à 490 nm. Les histogrammes représentent l'absorbance moyenne \pm SD. La signification statistique a été calculée à l'aide du test d'ANOVA. * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$.

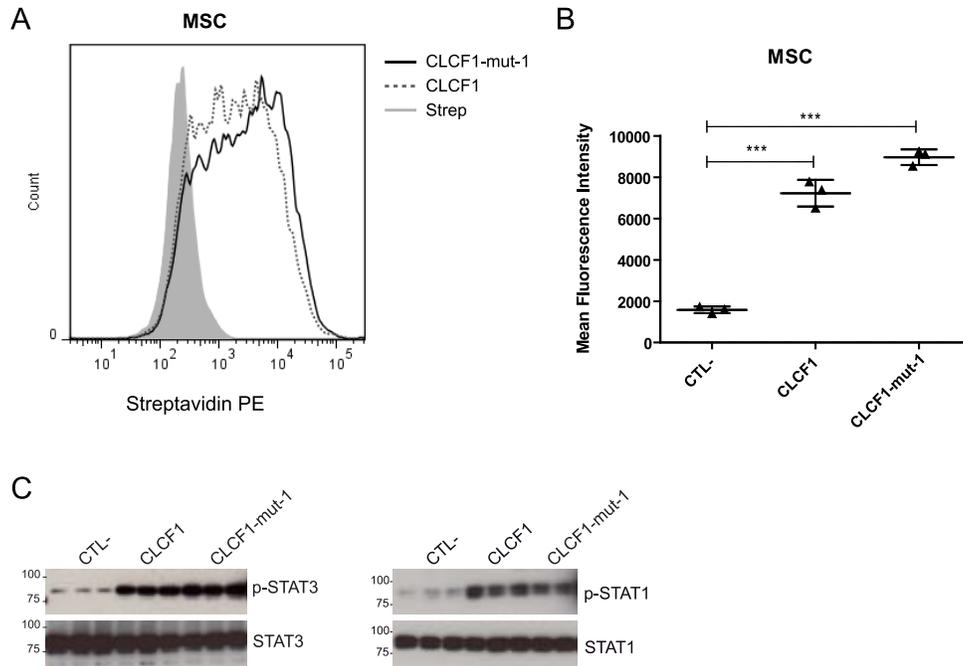


Figure S3. Le CLCF1-mut-1 lie les MSC et active les p-STAT1 et 3. (A) Les MSC (1×10^6 cellules) ont été incubés avec du CLCF1-biotinylé ($1 \mu\text{g/mL}$) ou du CLCF1-mut-1-biotinylé ($1 \mu\text{g/mL}$) pour 1 h puis marquée à l'aide de streptavidine conjuguée au PE. La fluorescence a été quantifiée par cytométrie en flux. L'histogramme grisé représente le contrôle (Strep), la ligne noire représente les cellules traitées avec le CLCF1-mut-1 (W94A) et la ligne pointillée les cellules traitées avec le CLCF1. (B) L'histogramme en nuage de points représente l'intensité de fluorescence moyenne \pm SD des cellules incubées avec le CLCF1-mut-1, le CLCF1 sauvage ou marquées seulement avec la streptavidine-PE (contrôle négatif; CTL-). La signification statistique a été évaluée à l'aide du test d'ANOVA. $***p < 0,001$. (C) Les MSC ont été stimulées avec du CLCF1 ou du CLCF1-mut-1 (100 ng/mL) pour 15 min. Les lysats ont été analysés par immunobuvardage de type Western Blot. Les protéines ont été incubées successivement avec un anticorps anti-phospho-STAT1, anti-phospho-STAT3, anti-STAT1 ou anti-STAT3 et un anticorps secondaire conjugué à une peroxydase de raifort.

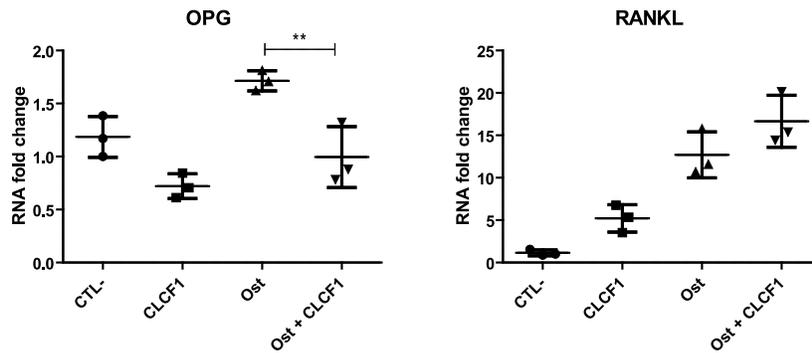


Figure S4. Effects of CLCF1 on the RANK/RANKL/OPG axis during MSC differentiation into osteoblasts in vitro. MSC were expanded in AMEM media (CTL-), AMEM media supplemented with CLCF1 (100 ng/mL) (CLCF1), osteogenic media (Ost) or osteogenic media supplemented with CLCF1 (100 ng/mL) (Ost + CLCF1) for 3 weeks. OPG and RANKL mRNA expression was quantified by RT-qPCR. Results were normalized using the housekeeping gene HPRT mRNA levels. Vertical dot plots indicate mean mRNA fold changes \pm SD. Statistical significance was assessed using ANOVA test. ** $p < 0.01$, $n = 3$ technical replicates.

CHAPITRE III. Discussion

3.1 Le CLCF1 lie les MSC et active STAT1 et STAT3.

Nos expériences initiales ont montré que le CLCF1 lie une population de la moelle osseuse non hématopoïétique (négative pour le marqueur de surface CD45). Un test de liaison du CLCF1 sur des MSC isolées de moelle osseuse de souris et cultivées *in vitro* dans des conditions favorisant spécifiquement l'expansion de ces cellules souches (BM-MS) montre que la cytokine lie une fraction de ces cellules. La stimulation des BM-MS avec du CLCF1 active les STAT1 et les STAT3 de façon dose dépendante. La stimulation des MSC avec le CLCF1 en présence du ruxolitinib, un bloqueur des tyrosines kinases JAK1 et JAK2, bloque la phosphorylation de STAT3 ce qui indique que la signalisation du CLCF1 implique la voie JAK/STAT dans les BM-MS et suggère que CLCF1 recrute un récepteur aux cytokines sur ces cellules. Sachant que les cytokines de la famille IL-6/CNTF ont des effets pléiotropiques sur le développement et le métabolisme des os, ces observations nous ont amenés à étudier l'effet du CLCF1 sur la différenciation des ostéoblastes à partir des MSC.

3.2 Le CLCF1 diminue l'expression des facteurs de transcription essentiels à l'ostéogenèse.

Plusieurs facteurs de transcription régulés à la hausse sont essentiels à l'ostéogenèse comme Runx2, Dlx5 et Ostérix (137, 139, 141). Dans le but d'identifier les facteurs de transcription sur lesquels le CLCF1 agit, une quantification des ARNm codant pour les facteurs de transcription clés ainsi que pour certains marqueurs de l'ostéogenèse a été effectuée. Nos résultats confirment que, lors de l'ostéogenèse, les niveaux d'ARNm codant pour les facteurs de transcription Dlx5, Runx2 et Ostérix sont régulés à la hausse, tous comme eux codant pour l'ostéocalcine et la phosphatase alcaline, des marqueurs des ostéocytes (193, 194). L'ajout du CLCF1 durant l'induction de la différenciation des MSC en ostéoblastes

inhibe significativement l'augmentation de l'expression de l'ARN codant pour les facteurs de transcription et les marqueurs de l'ostéogénèse. Par contre, les niveaux d'expression de l'ARN codant pour PPAR γ , un facteur de transcription clé dans l'adipogenèse, restent inchangés par rapport aux MSC différenciées en ostéoblastes montrant la spécificité de l'effet du CLCF1. Ces résultats suggèrent que le CLCF1 inhibe la différenciation des MSC en ostéoblastes en inhibant la transcription de facteurs de transcription impliqués dans l'ostéogénèse. Les facteurs de transcription Dlx5, Runx2 et Ostérix sont des effecteurs de la voie des BMP. La quantification de l'ARNm montre un effet inhibiteur du CLCF1 sur l'expression de l'ARNm codant pour les facteurs de transcription de la voie des BMP sans que le niveau de la β -caténine soit affecté. Ceci suggère que le CLCF1 régule la différenciation des MSC en ostéoblastes en agissant sur la voie des BMP et non la voie wnt/ β -caténine.

3.3 Le CLCF1 inhibe la différenciation des MSC en ostéoblastes.

Une fois différenciés, les ostéocytes déposent une matrice extracellulaire sur laquelle se forment des dépôts de calcium (124). Plusieurs cytokines de la famille de CLCF1 sont capables de réguler la différenciation des MSC. À titre d'exemple, il a été montré que l'OSM favorise la différenciation des MSC en ostéoblastes (87, 167, 168). Nos résultats montrent que l'ajout du CLCF1 lors de l'induction de la différenciation des MSC en ostéoblastes réduit significativement la minéralisation (caractérisée par les dépôts extracellulaires de calcium détectables par coloration à l'alzarine rouge et diminue l'activité de la phosphatase alcaline, une enzyme impliquée dans l'ostéogénèse. Ces résultats confirment que le CLCF1 inhibe la différenciation des MSC en ostéoblastes.

Nos observations sont en accord avec ceux d'une étude montrant une inhibition de 1) la minéralisation de cellules primaires ostéoblastiques en provenance du calvarium de souris et 2) l'expression du facteur de transcription Ostérix suite à un traitement avec du CLCF1.

Toutefois dans cette étude, aucun effet sur le niveau des ARNm codants pour d'autres facteurs de transcription ou marqueurs associés à l'ostéogenèse n'a été détecté. Cette même étude a montré un effet similaire suite au traitement de ces cellules avec du CNTF (77).

Comme discuté dans l'introduction, l'OSM, le LIF et la CT-1 favorisent la minéralisation osseuse alors que le CNTF et le CLCF1 démontrent un effet inverse sur la minéralisation, bien que l'ensemble de ces cytokines induisent leur signalisation à travers les chaînes de récepteur LIFR β /gp130. Cela suggère que la liaison du CNTF et du CLCF1 sur le récepteur CNTFR/LIFR β /gp130 induit l'activation de voies de signalisation différentes, et ce bien que le CNTFR α soit une protéine à ancre GPI. Une explication alternative serait que le CNTF et le CLCF1 inhibent la minéralisation en recrutant un récepteur comprenant la sortiline.

4. Conclusion

En conclusion, nous avons démontré que le CLCF1 module à la baisse la différenciation des MSC en ostéoblastes. Nos résultats suggèrent que le CLCF1 joue un rôle dans la formation osseuse. Le CLCF1 constitue ainsi une cible thérapeutique pouvant être inhibé dans les maladies du métabolisme osseux comme dans l'ostéoporose. Cependant, le rôle du CLCF1 dans le métabolisme osseux *in vivo* reste à explorer.

5. Perspectives

5.1 Mode d'action du CLCF1 lors de la régulation de la différenciation des MSC.

Dans le but de trouver par quelle voie de signalisation le CLCF1 exerce son effet sur les MSC, il serait intéressant de quantifier l'ARNm codant pour des facteurs de transcription impliqués dans chacune des voies de signalisation : BMP ou wnt/ β -caténine. Nos résultats suggèrent que l'effet du CLCF1 passe par la voie des BMP. Pour valider cela, il serait utile de quantifier l'ARNm codant pour les effecteurs de la voie des BMP qui se trouvent en amont du Dlx5 comme les Smad1 et 5 et le BMP-2 et, les effecteurs qui se trouvent en amont de la β -caténine comme le wnt. En outre, sachant que le CLCF1 induit l'activation de STAT1 et de STAT3, il serait intéressant d'induire la différenciation des MSC en ostéoblastes en présence du CLCF1 et d'un inhibiteur de la voie des JAK/STAT comme le ruxolitinib. Ceci permettrait de déterminer si le CLCF1 régule la différenciation des MSC en ostéoblaste à travers la voie des JAK/STAT.

5.2 Le récepteur de CLCF1 sur les MSC.

La cytokine composite CLCF1/CRLF1 est un ligand du CNTFR, de la sortiline et de SorLA (25, 64). Il a été montré que l'expression de la sortiline est augmentée durant la différenciation des MSC en ostéoblastes ce qui favorise la minéralisation (195). Comme expliqué dans l'introduction, le CLCF1 interagit avec la chaîne CNTFR α via le site 1 (55). Le site d'interaction du CLCF1 avec la sortiline reste à identifier. Des résultats préliminaires (figure S3) montrent que le CLCF1 dont le site d'interaction avec le CNTFR α (site 1) est muté (CLCF1-mut-1) lie les MSC et active les phospho-STAT1 et 3 dans les MSC. Ceci suggère que le CLCF1 pourrait aussi exercer un effet sur les MSC à travers un autre récepteur que le

CNTFR. Afin d'identifier l'identité de ce récepteur, il serait intéressant d'induire des MSC provenant de souris déficientes pour le gène *SORT1* (196) qui code pour la sortiline à se différencier en ostéoblastes et d'étudier l'effet de CLCF1 sur la minéralisation osseuse et sur l'expression des facteurs de transcription régulant l'ostéogenèse.

5.3 L'effet direct et indirect du CLCF1 sur la différenciation des MSC en adipocytes.

Des résultats préliminaires suggèrent un effet du CLCF1 sur la différenciation des MSC en adipocytes. En effet, l'ajout du CLCF1 lors de l'induction de la différenciation des MSC purifiées de la moelle osseuse de souris diminue légèrement, mais significativement la différenciation en adipocytes (figure S2, A et B). Dans des expériences effectuées sur des MSC à un passage moins avancé et donc contaminés par des cellules myéloïdes, l'effet de CLCF1 est plus marqué (figure S2, C et D). Ces résultats suggèrent aussi que le CLCF1 régule la différenciation des MSC en adipocyte à la baisse, et ce de façon indirecte à travers les macrophages. Plusieurs études ont montré que les macrophages avaient des effets indirects sur la régulation de la différenciation des MSC : une co-culture de MSC et de monocytes/macrophages favorise la différenciation des MSC humains et des MSC murins en ostéoblastes (197, 198). La stimulation des macrophages dérivés de la moelle osseuse (BMDM) à l'aide du CLCF1 induit la sécrétion d'une panoplie de cytokines susceptibles d'influencer la différenciation des MSC en adipocytes comme l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-9, l'IL-10, l'IL-12, le G-CSF, le GM-CSF et le TNF α (54).

5.4 Étudier l'effet du CLCF sur la différenciation des MSC in vivo.

Dans le but de valider le potentiel de CLCF1 comme cible thérapeutique, il serait intéressant d'étudier son effet sur la capacité de régénération osseuse in vivo. Il serait ainsi possible, dans un premier temps, de vérifier l'expression du CLCF1 dans les souris ostéoporotiques et de bloquer ensuite cette cytokine à l'aide d'anticorps spécifiques pour évaluer son rôle dans un modèle de cette pathologie en étudiant notamment la variation dans le nombre d'ostéoclastes et d'ostéoblastes et dans la surface de minéralisation. À cet effet, il existe plusieurs modèles de souris ayant un phénotype ostéoporotique comme les souris ovariectomisées qui constituent le modèle d'ostéoporose induite par la ménopause le plus utilisé (199, 200). La présence d'un effet du CLCF1 sur le phénotype ostéoporotique permettra de considérer le CLCF1 comme une cible thérapeutique.

Une autre stratégie complémentaire serait d'induire la déplétion du gène codant pour le CLCF1 dans une souris ostéoporotique par ovariectomisation pour étudier l'effet de l'absence du CLCF1 sur le phénotype et le développement de l'ostéoporose. La délétion homozygote du CLCF1 chez les souris est létale de façon périnatale (201). Il serait intéressant de produire une souris exprimant un CLCF1 floxé. Le croisement cette dernière avec une souris exprimant une recombinase CRE inducible, suite à une injection de tamoxifène par exemple, génèrera des souris dont la déplétion du CLCF1 peut être induite après la fin du développement.

5.5 Étude de l'effet du CLCF1 sur la résorption osseuse

Les résultats obtenus plus haut montrent que le CLCF1 inhibe l'ostéoblastogenèse or, pour considérer le CLCF1 une cible thérapeutique dans l'ostéoporose il serait intéressant d'étudier aussi l'effet de cette cytokine sur la résorption osseuse. Pour cela, il serait utile d'étudier l'effet du CLCF1 sur la différenciation des cellules hématopoïétique en ostéoclastes, acteurs clés de la résorption osseuse. Des résultats préliminaires (Figure S4) suggèrent que l'ajout du CLCF1 durant la différenciation des MSC en ostéoblastes augmente l'expression de

l'ARNm codant pour RANKL et diminue l'expression de l'ARNm codant pour OPG. Ceci suggère que le CLCF1 agit aussi sur l'axe de signalisation RANK/RANKL/OPG. Comme mentionné dans l'introduction, RANKL est responsable de l'induction de l'ostéoclastogenèse alors que, OPG est responsable de l'inhibition du RANKL. L'hypothèse serait que le CLCF1 favoriserait la différenciation des cellules souches hématopoïétique en ostéoclastes. De plus, une étude récente a montré que RANKL régule négativement la différenciation des MSC en ostéoblaste, ceci vient renforcer la conclusion que le CLCF1 inhibe la différenciation des MSC en ostéoblastes. Donc, RANKL joue non seulement un rôle dans l'ostéoclastogenèse mais aussi dans l'ostéoblastogenèse.

Le CLCF1 pourrait aussi agir sur l'ostéoclastogenèse par l'intermédiaire des MSC. Pour vérifier cela, il serait intéressant de traiter des MSC avec du CLCF1 et d'utiliser le milieu conditionné lors de l'induction de la différenciation des cellules hématopoïétiques en ostéoclaste.

Bibliographie

1. Katherine A. Fitzgerald LAJON, Andy J.H. Gearing, Robin E. Callard. The cytokine facts Book. 2^e éd: Academic Press; 2001.
2. Rozwarski DA, Gronenborn AM, Clore GM, Bazan JF, Bohm A, Wlodawer A, et al. Structural comparisons among the short-chain helical cytokines. Structure (London, England : 1993). 1994;2(3):159-73. Epub 1994/03/15.
3. Bazan JF. Neuropoietic cytokines in the hematopoietic fold. Neuron. 1991;7(2):197-208. Epub 1991/08/01.
4. Luttkicken C, Wegenka U, Yuan J, Buschmann J, Schindler C, Ziemiecki A, et al. Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130. Science. 1994;263(5143):89-92.
5. Taga T, Kishimoto T. gp130 AND THE INTERLEUKIN-6 FAMILY OF CYTOKINES. Annual Review of Immunology. 1997;15(1):797-819.
6. März P, Cheng J-G, Gadiant RA, Patterson PH, Stoyan T, Otten U, et al. Sympathetic neurons can produce and respond to interleukin 6. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1998;95(6):3251.
7. Sendtner M, Arakawa Y, Stockli KA, Kreutzberg GW, Thoenen H. Effect of ciliary neurotrophic factor (CNTF) on motoneuron survival. Journal of cell science Supplement. 1991;15:103-9. Epub 1991/01/01.
8. Forger NG, Prevet D, deLapeyriere O, de Bovis B, Wang S, Bartlett P, et al. Cardiotrophin-like cytokine/cytokine-like factor 1 is an essential trophic factor for lumbar and facial motoneurons in vivo. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. 2003;23(26):8854-8. Epub 2003/10/03.
9. Castell JV, Gómez-Lechón MJ, David M, Hirano T, Kishimoto T, Heinrich PC. Recombinant human interleukin-6 (IL-6/BSF-2/HSF) regulates the synthesis of acute phase proteins in human hepatocytes. FEBS Letters. 1988;232(2):347-50.
10. Savin VJ, Sharma M, Zhou J, Genzochi D, Fields T, Sharma R, et al. Renal and Hematological Effects of CLCF-1, a B-Cell-Stimulating Cytokine of the IL-6 Family. Journal of Immunology Research. 2015;2015:11.
11. Nicola N. Guidebook to cytokines and their receptors. Oxford

New York: Oxford

New York : Oxford University Press; 1994.

12. Thoreau E, Petridou B, Kelly PA, Djiane J, Mornon JP. Structural symmetry of the extracellular domain of the Cytokine/Growth hormone/Prolactin receptor family and Interferon receptors revealed by Hydrophobic Cluster Analysis. *FEBS Letters*. 1991;282(1):26-31.
13. Ghilardi N, Li J, Hongo J-A, Yi S, Gurney A, de Sauvage FJ. A Novel Type I Cytokine Receptor Is Expressed on Monocytes, Signals Proliferation, and Activates STAT-3 and STAT-5. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(19):16831-6.
14. Bazan JF. Haemopoietic receptors and helical cytokines. *Immunology Today*. 1990;11:350-4.
15. Miyazaki T, Maruyama M, Yamada G, Hatakeyama M, Taniguchi T. The integrity of the conserved 'WS motif' common to IL-2 and other cytokine receptors is essential for ligand binding and signal transduction. *The EMBO journal*. 1991;10(11):3191-7. Epub 1991/11/01.
16. Taga T, Hibi M, Hirata Y, Yamasaki K, Yasukawa K, Matsuda T, et al. Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell*. 1989;58(3):573-81.
17. Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F, Graeve L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *The Biochemical journal*. 1998;334 (Pt 2):297-314. Epub 1998/08/26.
18. Garland JM. Rapid phosphorylation of a specific 33-kDa protein (p33) associated with growth stimulated by murine and rat IL3 in different IL3-dependent cell lines, and its constitutive expression in a malignant independent clone. *Leukemia*. 1988;2(2):94-102. Epub 1988/02/01.
19. Ihle JN. STATs: signal transducers and activators of transcription. *Cell*. 1996;84(3):331-4. Epub 1996/02/09.
20. Nicola NA, Greenhalgh CJ. The suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins: important feedback inhibitors of cytokine action. *Experimental hematology*. 2000;28(10):1105-12. Epub 2000/10/12.
21. Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD. How cells respond to interferons. *Annual review of biochemistry*. 1998;67:227-64. Epub 1998/10/06.

22. Schindler C, Levy DE, Decker T. JAK-STAT Signaling: From Interferons to Cytokines. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(28):20059-63.
23. Hirahara K, Onodera A, Villarino Alejandro V, Bonelli M, Sciumè G, Laurence A, et al. Asymmetric Action of STAT Transcription Factors Drives Transcriptional Outputs and Cytokine Specificity. *Immunity*. 2015;42(5):877-89.
24. Chen X, Vinkemeier U, Zhao Y, Jeruzalmi D, Darnell JE, Kuriyan J. Crystal Structure of a Tyrosine Phosphorylated STAT-1 Dimer Bound to DNA. *Cell*. 1998;93(5):827-39.
25. Elson GC, Lelievre E, Guillet C, Chevalier S, Plun-Favreau H, Froger J, et al. CLF associates with CLC to form a functional heteromeric ligand for the CNTF receptor complex. *Nat Neurosci*. 2000;3(9):867-72. Epub 2000/08/31.
26. Lelievre E, Plun-Favreau H, Chevalier S, Froger J, Guillet C, Elson GC, et al. Signaling pathways recruited by the cardiotrophin-like cytokine/cytokine-like factor-1 composite cytokine: specific requirement of the membrane-bound form of ciliary neurotrophic factor receptor alpha component. *J Biol Chem*. 2001;276(25):22476-84. Epub 2001/04/11.
27. Zhong Z, Wen Z, Darnell JE. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science*. 1994;264(5155):95.
28. Li X, Leung S, Qureshi S, Darnell JE, Jr., Stark GR. Formation of STAT1-STAT2 heterodimers and their role in the activation of IRF-1 gene transcription by interferon-alpha. *J Biol Chem*. 1996;271(10):5790-4. Epub 1996/03/08.
29. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *The Biochemical journal*. 2003;374(Pt 1):1-20. Epub 2003/05/30.
30. Gotoh N, Tojo A, Shibuya M. A novel pathway from phosphorylation of tyrosine residues 239/240 of Shc, contributing to suppress apoptosis by IL-3. *The EMBO journal*. 1996;15(22):6197-204. Epub 1996/11/15.
31. Collins LR, Ricketts WA, Yeh L, Cheresch D. Bifurcation of cell migratory and proliferative signaling by the adaptor protein Shc. *The Journal of cell biology*. 1999;147(7):1561-8. Epub 1999/12/30.
32. Goncharova EA, Ammit AJ, Irani C, Carroll RG, Eszterhas AJ, Panettieri RA, et al. PI3K is required for proliferation and migration of human pulmonary vascular smooth muscle

- cells. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2002;283(2):L354-63. Epub 2002/07/13.
33. Gao N, Zhang Z, Jiang B-H, Shi X. Role of PI3K/AKT/mTOR signaling in the cell cycle progression of human prostate cancer. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003;310(4):1124-32.
34. Hansen SH, Olsson A, Casanova JE. Wortmannin, an inhibitor of phosphoinositide 3-kinase, inhibits transcytosis in polarized epithelial cells. *J Biol Chem*. 1995;270(47):28425-32. Epub 1995/11/24.
35. Adler R, Landa KB, Manthorpe M, Varon S. Cholinergic neuronotrophic factors: intraocular distribution of trophic activity for ciliary neurons. *Science*. 1979;204(4400):1434-6. Epub 1979/06/29.
36. Skaper SD, Varon S. Age-dependent control of dorsal root ganglion neuron survival by macromolecular and low-molecular-weight trophic agents and substratum-bound laminins. *Brain research*. 1986;389(1-2):39-46. Epub 1986/01/01.
37. Oppenheim RW, Prevette D, Yin QW, Collins F, MacDonald J. Control of embryonic motoneuron survival in vivo by ciliary neurotrophic factor. *Science*. 1991;251(5001):1616-8. Epub 1991/03/29.
38. Rudge JS, Alderson RF, Pasnikowski E, McClain J, Ip NY, Lindsay RM. Expression of Ciliary Neurotrophic Factor and the Neurotrophins-Nerve Growth Factor, Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neurotrophin 3-in Cultured Rat Hippocampal Astrocytes. *The European journal of neuroscience*. 1992;4(6):459-71. Epub 1992/01/01.
39. Stöckli KA, Lottspeich F, Sendtner M, Masiakowski P, Carroll P, Götz R, et al. Molecular cloning, expression and regional distribution of rat ciliary neurotrophic factor. *Nature*. 1989;342:920.
40. Masu Y, Wolf E, Holtmann B, Sendtner M, Brem G, Thoenen H. Disruption of the CNTF gene results in motor neuron degeneration. *Nature*. 1993;365(6441):27-32. Epub 1993/09/02.
41. Takahashi R, Yokoji H, Misawa H, Hayashi M, Hu J, Deguchi T. A null mutation in the human CNTF gene is not causally related to neurological diseases. *Nature Genetics*. 1994;7:79.

42. Stahl N, Boulton TG, Farruggella T, Ip NY, Davis S, Witthuhn BA, et al. Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components. *Science*. 1994;263(5143):92-5. Epub 1994/01/07.
43. Davis S, Aldrich TH, Valenzuela DM, Wong VV, Furth ME, Squinto SP, et al. The receptor for ciliary neurotrophic factor. *Science*. 1991;253(5015):59-63. Epub 1991/07/05.
44. Davis S, Aldrich TH, Ip NY, Stahl N, Scherer S, Farruggella T, et al. Released form of CNTF receptor alpha component as a soluble mediator of CNTF responses. *Science*. 1993;259(5102):1736-9. Epub 1993/03/19.
45. Kuhlmann T, Remington L, Cognet I, Bourbonniere L, Zehntner S, Guilhot F, et al. Continued administration of ciliary neurotrophic factor protects mice from inflammatory pathology in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol*. 2006;169(2):584-98.
46. Chew EY, Clemons TE, Jaffe GJ, Johnson CA, Farsiu S, Lad EM, et al. Effect of Ciliary Neurotrophic Factor on Retinal Neurodegeneration in Patients with Macular Telangiectasia Type 2: A Randomized Clinical Trial. *Ophthalmology*. 2018. Epub 2018/10/08.
47. Boutin JM, Jolicoeur C, Okamura H, Gagnon J, Edery M, Shirota M, et al. Cloning and expression of the rat prolactin receptor, a member of the growth hormone/prolactin receptor gene family. *Cell*. 1988;53(1):69-77. Epub 1988/04/08.
48. Elson GC, Graber P, Losberger C, Herren S, Gretener D, Menoud LN, et al. Cytokine-like factor-1, a novel soluble protein, shares homology with members of the cytokine type I receptor family. *J Immunol*. 1998;161(3):1371-9. Epub 1998/08/01.
49. Herholz J, Meloni A, Marongiu M, Chiappe F, Deiana M, Herrero CR, et al. Differential secretion of the mutated protein is a major component affecting phenotypic severity in CRLF1-associated disorders. *European journal of human genetics : EJHG*. 2011;19(5):525-33. Epub 2011/02/18.
50. Senaldi G, Varnum BC, Sarmiento U, Starnes C, Lile J, Scully S, et al. Novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3: a cytokine of the IL-6 family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(20):11458-63.
51. Benigni F, Fantuzzi G, Sacco S, Sironi M, Pozzi P, Dinarello CA, et al. Six different cytokines that share GP130 as a receptor subunit, induce serum amyloid A and potentiate the induction of interleukin-6 and the activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis by interleukin-1. *Blood*. 1996;87(5):1851-4. Epub 1996/03/01.

52. DeChiara TM, Vejsada R, Poueymirou WT, Acheson A, Suri C, Conover JC, et al. Mice lacking the CNTF receptor, unlike mice lacking CNTF, exhibit profound motor neuron deficits at birth. *Cell*. 1995;83(2):313-22.
53. Schmidt-Ott KM, Yang J, Chen X, Wang H, Paragas N, Mori K, et al. Novel regulators of kidney development from the tips of the ureteric bud. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2005;16(7):1993-2002. Epub 2005/05/27.
54. Pasquin S, Laplante V, Kouadri S, Milasan A, Mayer G, Tormo AJ, et al. Cardiotrophin-like Cytokine Increases Macrophage-Foam Cell Transition. *J Immunol*. 2018. Epub 2018/09/14.
55. Perret D, Guillet C, Elson G, Froger J, Plun-Favreau H, Rousseau F, et al. Two different contact sites are recruited by cardiotrophin-like cytokine (CLC) to generate the CLC/CLF and CLC/sCNTFRalpha composite cytokines. *J Biol Chem*. 2004;279(42):43961-70.
56. Plun-Favreau H, Elson G, Chabbert M, Froger J, deLapeyriere O, Lelievre E, et al. The ciliary neurotrophic factor receptor alpha component induces the secretion of and is required for functional responses to cardiotrophin-like cytokine. *The EMBO journal*. 2001;20(7):1692-703. Epub 2001/04/04.
57. Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood*. 1995;86(4):1243-54. Epub 1995/08/15.
58. Petersen CM, Nielsen MS, Nykjaer A, Jacobsen L, Tommerup N, Rasmussen HH, et al. Molecular identification of a novel candidate sorting receptor purified from human brain by receptor-associated protein affinity chromatography. *J Biol Chem*. 1997;272(6):3599-605. Epub 1997/02/07.
59. Hermans-Borgmeyer I, Hermey G, Nykjaer A, Schaller C. Expression of the 100-kDa neurotensin receptor sortilin during mouse embryonal development. *Brain research Molecular brain research*. 1999;65(2):216-9. Epub 1999/03/05.
60. Munck Petersen C, Nielsen MS, Jacobsen C, Tauris J, Jacobsen L, Gliemann J, et al. Propeptide cleavage conditions sortilin/neurotensin receptor-3 for ligand binding. *The EMBO journal*. 1999;18(3):595-604. Epub 1999/02/02.

61. Nykjaer A, Lee R, Teng KK, Jansen P, Madsen P, Nielsen MS, et al. Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature*. 2004;427(6977):843-8. Epub 2004/02/27.
62. Teng HK, Teng KK, Lee R, Wright S, Tevar S, Almeida RD, et al. ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2005;25(22):5455-63. Epub 2005/06/03.
63. Nilsson SK, Christensen S, Raarup MK, Ryan RO, Nielsen MS, Olivecrona G. Endocytosis of apolipoprotein A-V by members of the low density lipoprotein receptor and the VPS10p domain receptor families. *J Biol Chem*. 2008;283(38):25920-7. Epub 2008/07/08.
64. Larsen JV, Hansen M, Moller B, Madsen P, Scheller J, Nielsen M, et al. Sortilin facilitates signaling of ciliary neurotrophic factor and related helical type 1 cytokines targeting the gp130/leukemia inhibitory factor receptor beta heterodimer. *Molecular and cellular biology*. 2010;30(17):4175-87. Epub 2010/06/30.
65. Nannenber EA, Bijlmer R, Van Geel BM, Hennekam RC. Neonatal paroxysmal trismus and camptodactyly: the Crisponi syndrome. *American journal of medical genetics Part A*. 2005;133a(1):90-2. Epub 2005/01/08.
66. Crisponi L, Crisponi G, Meloni A, Toliat MR, Nurnberg G, Usala G, et al. Crisponi syndrome is caused by mutations in the CRLF1 gene and is allelic to cold-induced sweating syndrome type 1. *American journal of human genetics*. 2007;80(5):971-81. Epub 2007/04/17.
67. Rousseau F, Gauchat J-F, McLeod JG, Chevalier S, Guillet C, Guilhot F, et al. Inactivation of cardiotrophin-like cytokine, a second ligand for ciliary neurotrophic factor receptor, leads to cold-induced sweating syndrome in a patient. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(26):10068-73.
68. Kola I, Davey A, Gough NM. Localization of the Murine Leukemia Inhibitory Factor Gene Near the Centromere on Chromosome 11. *Growth Factors*. 1990;2(2):235-40.
69. Boulanger MJ, Bankovich AJ, Kortemme T, Baker D, Garcia KC. Convergent Mechanisms for Recognition of Divergent Cytokines by the Shared Signaling Receptor gp130. *Molecular Cell*. 2003;12(3):577-89.

70. Gearing DP, Gough NM, King JA, Hilton DJ, Nicola NA, Simpson RJ, et al. Molecular cloning and expression of cDNA encoding a murine myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF). *Embo J.* 1987;6(13):3995-4002.
71. Escary J-L, Perreau J, Duménil D, Ezine S, Brûlet P. Leukaemia inhibitory factor is necessary for maintenance of haematopoietic stem cells and thymocyte stimulation. *Nature.* 1993;363:361.
72. Gouin F, Couillaud S, Cottrel M, Godard A, Passuti N, Heymann D. Presence of leukaemia inhibitory factor (LIF) and LIF-receptor chain (gp190) in osteoclast-like cells cultured from human giant cell tumour of bone. Ultrastructural distribution. *Cytokine.* 1999;11(4):282-9. Epub 1999/05/18.
73. Williams RL, Hilton DJ, Pease S, Willson TA, Stewart CL, Gearing DP, et al. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature.* 1988;336:684.
74. Sims NA, Johnson RW. Leukemia inhibitory factor: A paracrine mediator of bone metabolism. *Growth Factors.* 2012;30(2):76-87.
75. Metcalf D, Nicola NA, Gearing DP. Effects of injected leukemia inhibitory factor on hematopoietic and other tissues in mice. *Blood.* 1990;76(1):50-6. Epub 1990/07/01.
76. Walker EC, McGregor NE, Poulton IJ, Solano M, Pompolo S, Fernandes TJ, et al. Oncostatin M promotes bone formation independently of resorption when signaling through leukemia inhibitory factor receptor in mice. *The Journal of Clinical Investigation.* 2010;120(2):582-92.
77. McGregor NE, Poulton IJ, Walker EC, Pompolo S, Quinn JM, Martin TJ, et al. Ciliary neurotrophic factor inhibits bone formation and plays a sex-specific role in bone growth and remodeling. *Calcified tissue international.* 2010;86(3):261-70. Epub 2010/02/17.
78. Dagoneau 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. *American journal of human genetics.* 2004;74(2):298-305. Epub 2004/01/24.
79. Jung C, Dagoneau N, Baujat G, Le Merrer M, David A, Di Rocco M, et al. Stüve-Wiedemann syndrome: long-term follow-up and genetic heterogeneity. *Clinical Genetics.* 2010;77(3):266-72.

80. Ware CB, Horowitz MC, Renshaw BR, Hunt JS, Liggitt D, Koblar SA, et al. Targeted disruption of the low-affinity leukemia inhibitory factor receptor gene causes placental, skeletal, neural and metabolic defects and results in perinatal death. *Development*. 1995;121(5):1283-99.
81. Bruce AG, Hoggatt IH, Rose TM. Oncostatin M is a differentiation factor for myeloid leukemia cells. *The Journal of Immunology*. 1992;149(4):1271-5.
82. Horn D, Fitzpatrick WC, Gompfer PT, Ochs V, Bolton-Hansen M, Zarling J, et al. Regulation of cell growth by recombinant oncostatin M. *Growth Factors*. 1990;2(2-3):157-65. Epub 1990/01/01.
83. Bruce AG, Hoggatt IH, Rose TM. Oncostatin M is a differentiation factor for myeloid leukemia cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1992;149(4):1271-5. Epub 1992/08/15.
84. Kitchen D, Hoffman RC, Moy FJ, Powers R. Homology model for oncostatin M based on NMR structural data. *Biochemistry*. 1998;37(30):10581-8. Epub 1998/08/07.
85. Rose TM, Bruce AG. Oncostatin M is a member of a cytokine family that includes leukemia-inhibitory factor, granulocyte colony-stimulating factor, and interleukin 6. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1991;88(19):8641-5.
86. Deller MC, Hudson KR, Ikemizu S, Bravo J, Jones EY, Heath JK. Crystal structure and functional dissection of the cytostatic cytokine oncostatin M. *Structure (London, England : 1993)*. 2000;8(8):863-74. Epub 2000/09/21.
87. Guihard P, Danger Y, Brounais B, David E, Brion R, Delecrin J, et al. Induction of osteogenesis in mesenchymal stem cells by activated monocytes/macrophages depends on oncostatin M signaling. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2012;30(4):762-72. Epub 2012/01/24.
88. Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood*. 2001;98(8):2396-402. Epub 2001/10/06.
89. Yang SH, Park MJ, Yoon IH, Kim SY, Hong SH, Shin JY, et al. Soluble mediators from mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation by inducing IL-10. *Experimental & molecular medicine*. 2009;41(5):315-24. Epub 2009/03/25.
90. Liotta F, Angeli R, Cosmi L, Fili L, Manuelli C, Frosali F, et al. Toll-like receptors 3 and 4 are expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and can inhibit

their T-cell modulatory activity by impairing Notch signaling. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2008;26(1):279-89. Epub 2007/10/27.

91. Park CW, Kim KS, Bae S, Son HK, Myung PK, Hong HJ, et al. Cytokine secretion profiling of human mesenchymal stem cells by antibody array. *International journal of stem cells*. 2009;2(1):59-68. Epub 2009/05/01.

92. Trounson A, McDonald C. Stem Cell Therapies in Clinical Trials: Progress and Challenges. *Cell stem cell*. 2015;17(1):11-22. Epub 2015/07/04.

93. Horwitz EM, Prockop DJ, Gordon PL, Koo WW, Fitzpatrick LA, Neel MD, et al. Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta. *Blood*. 2001;97(5):1227-31. Epub 2001/02/27.

94. Petite H, Viateau V, Bensaid W, Meunier A, de Pollak C, Bourguignon M, et al. Tissue-engineered bone regeneration. *Nature biotechnology*. 2000;18(9):959-63. Epub 2000/09/06.

95. Whitfield MJ, Lee WCJ, Van Vliet KJ. Onset of heterogeneity in culture-expanded bone marrow stromal cells. *Stem Cell Research*. 2013;11(3):1365-77.

96. Goldstein S. Replicative senescence: the human fibroblast comes of age. *Science*. 1990;249(4973):1129-33. Epub 1990/09/07.

97. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*. 1961;25(3):585-621.

98. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7. Epub 2006/08/23.

99. Noth U, Osyczka AM, Tuli R, Hickok NJ, Danielson KG, Tuan RS. Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2002;20(5):1060-9. Epub 2002/10/18.

100. Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D, Hosseini MM, Davies JE. Human Umbilical Cord Perivascular (HUCPV) Cells: A Source of Mesenchymal Progenitors. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2005;23(2):220-9.

101. Tropel P, Noël D, Platet N, Legrand P, Benabid A-L, Berger F. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. *Experimental Cell Research*. 2004;295(2):395-406.
102. Dickinson H, Milton P, Jenkin G. The isolation and characterization of putative mesenchymal stem cells from the spiny mouse. *Cytotechnology*. 2012;64(5):591-9. Epub 2012/03/01.
103. Rostovskaya M, Anastassiadis K. Differential Expression of Surface Markers in Mouse Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cell Subpopulations with Distinct Lineage Commitment. *PLOS ONE*. 2012;7(12):e51221.
104. Bernardo ME, Emons JA, Karperien M, Nauta AJ, Willemze R, Roelofs H, et al. Human mesenchymal stem cells derived from bone marrow display a better chondrogenic differentiation compared with other sources. *Connective tissue research*. 2007;48(3):132-40. Epub 2007/05/25.
105. Yang Y-HK, Ogando CR, Wang See C, Chang T-Y, Barabino GA. Changes in phenotype and differentiation potential of human mesenchymal stem cells aging in vitro. *Stem Cell Research & Therapy*. 2018;9(1):131.
106. Lian JB, Gravalles EM, Stein GS. 5 - Osteoblasts and their Signaling Pathways: New Frontiers for Linkage to the Immune System. Dans: Lorenzo J, Choi Y, Horowitz M, Takayanagi H, rédacteurs. *Osteoimmunology*. San Diego: Academic Press; 2011. p. 101-40.
107. Lee TC, Staines A, Taylor D. Bone adaptation to load: microdamage as a stimulus for bone remodelling. *Journal of anatomy*. 2002;201(6):437-46. Epub 2002/12/20.
108. Johnell O, Kanis JA. An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 2006;17(12):1726-33. Epub 2006/09/20.
109. Kanis JA. WHO Technical Report. 2007(66).
110. Cooper C. The crippling consequences of fractures and their impact on quality of life. *The American Journal of Medicine*. 1997;103(2, Supplement 1):S12-S9.
111. Udagawa N, Nakamura M, Sato N, Takahashi N. The Mechanism of Coupling between Bone Resorption and Formation. *Journal of Oral Biosciences*. 2006;48(3):185-97.

112. Ebeling PR, Atley LM, Guthrie JR, Burger HG, Dennerstein L, Hopper JL, et al. Bone turnover markers and bone density across the menopausal transition. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1996;81(9):3366-71. Epub 1996/09/01.
113. Ritter CS, Armbrecht HJ, Slatopolsky E, Brown AJ. 25-Hydroxyvitamin D(3) suppresses PTH synthesis and secretion by bovine parathyroid cells. *Kidney international*. 2006;70(4):654-9. Epub 2006/06/30.
114. Christakos S, Dhawan P, Porta A, Mady LJ, Seth T. Vitamin D and intestinal calcium absorption. *Molecular and cellular endocrinology*. 2011;347(1-2):25-9. Epub 2011/06/01.
115. Ziambaras K, Dagogo-Jack S. Reversible muscle weakness in patients with vitamin D deficiency. *The Western journal of medicine*. 1997;167(6):435-9. Epub 1998/01/14.
116. Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocrine reviews*. 1999;20(3):345-57. Epub 1999/06/16.
117. Li J, Sarosi I, Yan X-Q, Morony S, Capparelli C, Tan H-L, et al. RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000;97(4):1566.
118. Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2008;473(2):139-46. Epub 2008/04/09.
119. Eghbali-Fatourehchi G, Khosla S, Sanyal A, Boyle WJ, Lacey DL, Riggs BL. Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. *J Clin Invest*. 2003;111(8):1221-30. Epub 2003/04/17.
120. Flanagan AM, Chambers TJ. Inhibition of bone resorption by bisphosphonates: interactions between bisphosphonates, osteoclasts, and bone. *Calcified tissue international*. 1991;49(6):407-15. Epub 1991/12/01.
121. McClung MR. Inhibition of RANKL as a treatment for osteoporosis: Preclinical and early clinical studies. *Current Osteoporosis Reports*. 2006;4(1):28-33.
122. Lindsay R, Nieves J, Formica C, Henneman E, Woelfert L, Shen V, et al. Randomised controlled study of effect of parathyroid hormone on vertebral-bone mass and fracture incidence among postmenopausal women on oestrogen with osteoporosis. *Lancet (London, England)*. 1997;350(9077):550-5. Epub 1997/08/23.

123. Ominsky MS, Vlasseros F, Jolette J, Smith SY, Stouch B, Doellgast G, et al. Two doses of sclerostin antibody in cynomolgus monkeys increases bone formation, bone mineral density, and bone strength. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2010;25(5):948-59. Epub 2010/03/05.
124. Huang W, Yang S, Shao J, Li YP. Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2007;12:3068-92. Epub 2007/05/09.
125. Derynck R, Piek E, Schneider RA, Choy L, Alliston T. 21 TGF- β Family Signaling in Mesenchymal Differentiation 2008.
126. Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *Journal of cellular biochemistry*. 1997;64(2):295-312. Epub 1997/02/01.
127. Langenbach F, Handschel J. Effects of dexamethasone, ascorbic acid and β -glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro. *Stem Cell Research & Therapy*. 2013;4(5):117.
128. Chung U-i, Schipani E, McMahon AP, Kronenberg HM. Indian hedgehog couples chondrogenesis to osteogenesis in endochondral bone development. *The Journal of Clinical Investigation*. 2001;107(3):295-304.
129. Gaur T, Lengner CJ, Hovhannisyan H, Bhat RA, Bodine PV, Komm BS, et al. Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *J Biol Chem*. 2005;280(39):33132-40. Epub 2005/07/27.
130. Zamurovic N, Cappellen D, Rohner D, Susa M. Coordinated activation of notch, Wnt, and transforming growth factor-beta signaling pathways in bone morphogenic protein 2-induced osteogenesis. Notch target gene *Hey1* inhibits mineralization and Runx2 transcriptional activity. *J Biol Chem*. 2004;279(36):37704-15. Epub 2004/06/05.
131. Gori F, Thomas T, Hicok KC, Spelsberg TC, Riggs BL. Differentiation of human marrow stromal precursor cells: bone morphogenetic protein-2 increases OSF2/CBFA1, enhances osteoblast commitment, and inhibits late adipocyte maturation. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 1999;14(9):1522-35. Epub 1999/09/01.

132. Fujita T, Meguro T, Fukuyama R, Nakamuta H, Koida M. New signaling pathway for parathyroid hormone and cyclic AMP action on extracellular-regulated kinase and cell proliferation in bone cells. Checkpoint of modulation by cyclic AMP. *J Biol Chem.* 2002;277(25):22191-200. Epub 2002/04/17.
133. Nakagawa N, Kinoshita M, Yamaguchi K, Shima N, Yasuda H, Yano K, et al. RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochemical and biophysical research communications.* 1998;253(2):395-400. Epub 1999/01/08.
134. Fiedler J, Roderer G, Gunther KP, Brenner RE. BMP-2, BMP-4, and PDGF-bb stimulate chemotactic migration of primary human mesenchymal progenitor cells. *Journal of cellular biochemistry.* 2002;87(3):305-12. Epub 2002/10/25.
135. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science.* 1988;242(4885):1528-34. Epub 1988/12/16.
136. Chen G, Deng C, Li YP. TGF-beta and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *International journal of biological sciences.* 2012;8(2):272-88. Epub 2012/02/03.
137. Heo JS, Lee SG, Kim HO. Distal-less homeobox 5 is a master regulator of the osteogenesis of human mesenchymal stem cells. *International journal of molecular medicine.* 2017;40(5):1486-94. Epub 2017/09/28.
138. Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, et al. *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell.* 1997;89(5):765-71. Epub 1997/05/30.
139. Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, et al. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell.* 1997;89(5):755-64. Epub 1997/05/30.
140. Nishio Y, Dong Y, Paris M, O'Keefe RJ, Schwarz EM, Drissi H. Runx2-mediated regulation of the zinc finger Osterix/Sp7 gene. *Gene.* 2006;372:62-70. Epub 2006/04/01.
141. Lapunzina P, Aglan M, Temtamy S, Caparros-Martin JA, Valencia M, Leton R, et al. Identification of a frameshift mutation in Osterix in a patient with recessive osteogenesis imperfecta. *American journal of human genetics.* 2010;87(1):110-4. Epub 2010/06/29.

142. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*. 2002;108(1):17-29. Epub 2002/01/17.
143. Cantatore FP, Corrado A, Grano M, Quarta L, Colucci S, Melillo N. Osteocalcin synthesis by human osteoblasts from normal and osteoarthritic bone after vitamin D3 stimulation. *Clinical rheumatology*. 2004;23(6):490-5. Epub 2005/04/01.
144. Zhao M, Qiao M, Harris SE, Chen D, Oyajobi BO, Mundy GR. The zinc finger transcription factor Gli2 mediates bone morphogenetic protein 2 expression in osteoblasts in response to hedgehog signaling. *Molecular and cellular biology*. 2006;26(16):6197-208. Epub 2006/08/02.
145. Xiao G, Jiang D, Thomas P, Benson MD, Guan K, Karsenty G, et al. MAPK pathways activate and phosphorylate the osteoblast-specific transcription factor, Cbfa1. *J Biol Chem*. 2000;275(6):4453-9. Epub 2000/02/08.
146. Ozawa R, Yamada Y, Nagasaka T, Ueda M. A comparison of osteogenesis-related gene expression of mesenchymal stem cells during the osteoblastic differentiation induced by Type-I collagen and/or fibronectin. *International Journal of Oral-Medical Sciences*. 2003;1(2):139-46.
147. Sharma U, Pal D, Prasad R. Alkaline phosphatase: an overview. *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB*. 2014;29(3):269-78. Epub 2014/06/27.
148. Siffert RS. The role of alkaline phosphatase in osteogenesis. *J Exp Med*. 1951;93(5):415-26. Epub 1951/05/01.
149. Zhao M, Qiao M, Oyajobi BO, Mundy GR, Chen D. E3 ubiquitin ligase Smurf1 mediates core-binding factor alpha1/Runx2 degradation and plays a specific role in osteoblast differentiation. *J Biol Chem*. 2003;278(30):27939-44. Epub 2003/05/10.
150. Bialek P, Kern B, Yang X, Schrock M, Sosic D, Hong N, et al. A twist code determines the onset of osteoblast differentiation. *Developmental cell*. 2004;6(3):423-35. Epub 2004/03/20.
151. Bourgeois P, Bolcato-Bellemin AL, Danse JM, Bloch-Zupan A, Yoshioka K, Stoetzel C, et al. The variable expressivity and incomplete penetrance of the twist-null heterozygous mouse phenotype resemble those of human Saethre-Chotzen syndrome. *Human molecular genetics*. 1998;7(6):945-57. Epub 1998/06/13.

152. Yousfi M, Lasmoles F, Marie PJ. TWIST inactivation reduces CBFA1/RUNX2 expression and DNA binding to the osteocalcin promoter in osteoblasts. *Biochemical and biophysical research communications*. 2002;297(3):641-4. Epub 2002/09/25.
153. Isenmann S, Arthur A, Zannettino AC, Turner JL, Shi S, Glackin CA, et al. TWIST family of basic helix-loop-helix transcription factors mediate human mesenchymal stem cell growth and commitment. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2009;27(10):2457-68. Epub 2009/07/18.
154. Miraoui H, Severe N, Vaudin P, Pages JC, Marie PJ. Molecular silencing of Twist1 enhances osteogenic differentiation of murine mesenchymal stem cells: implication of FGFR2 signaling. *Journal of cellular biochemistry*. 2010;110(5):1147-54. Epub 2010/06/22.
155. Willert K, Nusse R. Wnt proteins. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2012;4(9):a007864. Epub 2012/09/07.
156. Holmen SL, Zylstra CR, Mukherjee A, Sigler RE, Faugere MC, Bouxsein ML, et al. Essential role of beta-catenin in postnatal bone acquisition. *J Biol Chem*. 2005;280(22):21162-8. Epub 2005/04/02.
157. Li X, Zhang Y, Kang H, Liu W, Liu P, Zhang J, et al. Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(20):19883-7.
158. Piters E, Boudin E, Van Hul W. Wnt signaling: a win for bone. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2008;473(2):112-6. Epub 2008/03/28.
159. Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, MacArthur BD, Lira SA, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*. 2010;466:829.
160. Le Blanc K, Mougiakakos D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nature reviews Immunology*. 2012;12(5):383-96. Epub 2012/04/26.
161. Bernardo Maria E, Fibbe Willem E. Mesenchymal Stromal Cells: Sensors and Switchers of Inflammation. *Cell stem cell*. 2013;13(4):392-402.
162. Cho DI, Kim MR, Jeong HY, Jeong HC, Jeong MH, Yoon SH, et al. Mesenchymal stem cells reciprocally regulate the M1/M2 balance in mouse bone marrow-derived macrophages. *Experimental & molecular medicine*. 2014;46:e70. Epub 2014/01/11.
163. Tian Y, Deng YB, Huang YJ, Wang Y. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells decrease acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cells transplantation. *Immunological investigations*. 2008;37(1):29-42. Epub 2008/01/25.

164. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Experimental hematology*. 2002;30(1):42-8. Epub 2002/02/02.
165. Bastidas-Coral AP, Bakker AD, Zandieh-Doulabi B, Kleverlaan CJ, Bravenboer N, Forouzanfar T, et al. Cytokines TNF-alpha, IL-6, IL-17F, and IL-4 Differentially Affect Osteogenic Differentiation of Human Adipose Stem Cells. *Stem cells international*. 2016;2016:1318256. Epub 2016/09/27.
166. Malik N, Haugen HS, Modrell B, Shoyab M, Clegg CH. Developmental abnormalities in mice transgenic for bovine oncostatin M. *Molecular and cellular biology*. 1995;15(5):2349-58. Epub 1995/05/01.
167. Song HY, Jeon ES, Kim JI, Jung JS, Kim JH. Oncostatin M promotes osteogenesis and suppresses adipogenic differentiation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Journal of cellular biochemistry*. 2007;101(5):1238-51. Epub 2007/01/18.
168. Walker EC, McGregor NE, Poulton IJ, Solano M, Pompolo S, Fernandes TJ, et al. Oncostatin M promotes bone formation independently of resorption when signaling through leukemia inhibitory factor receptor in mice. *J Clin Invest*. 2010;120(2):582-92. Epub 2010/01/07.
169. 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. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2004;19(11):1850-61. Epub 2004/10/13.
170. Cornish J, Callon K, King A, Edgar S, Reid IR. The effect of leukemia inhibitory factor on bone in vivo. *Endocrinology*. 1993;132(3):1359-66. Epub 1993/03/01.
171. Walker EC, McGregor NE, Poulton IJ, Pompolo S, Allan EH, Quinn JM, et al. Cardiotrophin-1 is an osteoclast-derived stimulus of bone formation required for normal bone remodeling. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2008;23(12):2025-32. Epub 2008/07/31.
172. Liu Y, Wang L, Kikuri T, Akiyama K, Chen C, Xu X, et al. Mesenchymal stem cell-based tissue regeneration is governed by recipient T lymphocytes via IFN-gamma and TNF-alpha. *Nature medicine*. 2011;17(12):1594-601. Epub 2011/11/22.

173. Scheller EL, Song J, Dishowitz MI, Soki FN, Hankenson KD, Krebsbach PH. Leptin functions peripherally to regulate differentiation of mesenchymal progenitor cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2010;28(6):1071-80. Epub 2010/05/28.
174. Turner RT, Kalra SP, Wong CP, Philbrick KA, Lindenmaier LB, Boghossian S, et al. Peripheral leptin regulates bone formation. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2013;28(1):22-34. Epub 2012/08/14.
175. Chang YJ, Shih DT, Tseng CP, Hsieh TB, Lee DC, Hwang SM. Disparate mesenchyme-lineage tendencies in mesenchymal stem cells from human bone marrow and umbilical cord blood. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2006;24(3):679-85. Epub 2005/09/24.
176. Ducy P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling AF, Beil FT, et al. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell*. 2000;100(2):197-207. Epub 2000/02/05.
177. Parekkadan B, Milwid JM. Mesenchymal stem cells as therapeutics. *Annual review of biomedical engineering*. 2010;12:87-117. Epub 2010/04/27.
178. Reinders MEJ, Dreyer GJ, Bank JR, Roelofs H, Heidt S, Roelen DL, et al. Safety of allogeneic bone marrow derived mesenchymal stromal cell therapy in renal transplant recipients: the neptune study. *Journal of Translational Medicine*. 2015;13(1):344.
179. Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringden O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Experimental hematology*. 2003;31(10):890-6. Epub 2003/10/11.
180. Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*. 2003;75(3):389-97. Epub 2003/02/18.
181. Klyushnenkova E, Mosca JD, Zernetkina V, Majumdar MK, Beggs KJ, Simonetti DW, et al. T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression. *Journal of biomedical science*. 2005;12(1):47-57. Epub 2005/05/03.
182. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*. 2002;99(10):3838-43. Epub 2002/05/03.

183. Lalu MM, McIntyre L, Pugliese C, Fergusson D, Winston BW, Marshall JC, et al. Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells (SafeCell): a systematic review and meta-analysis of clinical trials. PLoS One. 2012;7(10):e47559. Epub 2012/11/08.
184. Mi F, Gong L. Secretion of interleukin-6 by bone marrow mesenchymal stem cells promotes metastasis in hepatocellular carcinoma. Bioscience reports. 2017;37(4). Epub 2017/07/01.
185. Gu Y, He M, Zhou X, Liu J, Hou N, Bin T, et al. Endogenous IL-6 of mesenchymal stem cell improves behavioral outcome of hypoxic-ischemic brain damage neonatal rats by suppressing apoptosis in astrocyte. Sci Rep. 2016;6:18587. Epub 2016/01/15.
186. Evaluation of PROCHYMAL® for Treatment-refractory Moderate-to-severe Crohn's Disease : ; . Disponible: <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT01233960>
187. The STem Cell Application Researches and Trials In NeuroloGy-2 (STARTING-2) Study : ; . Disponible: <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT01716481>
188. Efficacy and Safety of Adult Human Mesenchymal Stem Cells to Treat Steroid Refractory Acute Graft Versus Host Disease : ; . Disponible: <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT00366145>
189. Reicin C, McMahon E, Chung C. Stem Cell Therapy Regulation In Canada: Implications Of the Prochymal Approval. Westlaw Journal. 2012;28(8):1-4.
190. Ratcliffe E, Glen KE, Naing MW, Williams DJ. Current status and perspectives on stem cell-based therapies undergoing clinical trials for regenerative medicine: case studies. British medical bulletin. 2013;108:73-94. Epub 2013/11/10.
191. Konomi K, Tobita M, Kimura K, Sato D. New Japanese initiatives on stem cell therapies. Cell stem cell. 2015;16(4):350-2. Epub 2015/04/07.
192. European Medicines Agency : 2018 ; . Disponible: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/alofisel>
193. Shu B, Zhao Y, Wang Y, Wang G, Shang X, Britt M, et al. Oleanolic Acid Enhances Mesenchymal Stromal Cell Osteogenic Potential by Inhibition of Notch Signaling. Sci Rep. 2017;7(1):7002. Epub 2017/08/03.
194. Forni MF, Peggion J, Trudeau K, Shirihai O, Kowaltowski AJ. Murine Mesenchymal Stem Cell Commitment to Differentiation Is Regulated by Mitochondrial Dynamics. Stem cells (Dayton, Ohio). 2016;34(3):743-55. Epub 2015/12/08.

195. Maeda S, Nobukuni T, Shimo-Onoda K, Hayashi K, Yone K, Komiya S, et al. Sortilin is upregulated during osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells and promotes extracellular matrix mineralization. *Journal of cellular physiology*. 2002;193(1):73-9. Epub 2002/09/05.
196. Li J, Matye DJ, Wang Y, Li T. Sortilin 1 knockout alters basal adipose glucose metabolism but not diet-induced obesity in mice. *FEBS Lett*. 2017;591(7):1018-28. Epub 2017/02/27.
197. Gong L, Zhao Y, Zhang Y, Ruan Z. The Macrophage Polarization Regulates MSC Osteoblast Differentiation in vitro. *Annals of clinical and laboratory science*. 2016;46(1):65-71. Epub 2016/03/02.
198. Cantu DA, Hematti P, Kao WJ. Cell encapsulating biomaterial regulates mesenchymal stromal/stem cell differentiation and macrophage immunophenotype. *Stem cells translational medicine*. 2012;1(10):740-9. Epub 2012/12/01.
199. Komori T. Animal models for osteoporosis. *European journal of pharmacology*. 2015;759:287-94. Epub 2015/03/31.
200. Jilka RL, Hangoc G, Girasole G, Passeri G, Williams DC, Abrams JS, et al. Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. *Science*. 1992;257(5066):88-91. Epub 1992/07/03.
201. Kass DJ. Cytokine-like factor 1 (CLF1): life after development? *Cytokine*. 2011;55(3):325-9. Epub 2011/06/28.

Appendix

Étude de la liaison du CRLF1 avec le cholestérol

Introduction

Le *cardiotrophine-like cytokine factor 1* (CLCF1) est une cytokine de la famille de l'IL-6 qui joue un rôle dans la survie des cellules neuronales, dans la prolifération des cellules B et dans le système immunitaire (1-3). Le récepteur soluble *cytokine-like factor 1* (CLF1 ou CRLF1) permet la sécrétion de CLCF1 (4). Le complexe CLCF1/CRLF1 forme une cytokine composite jouant un rôle dans le système immunitaire, le système nerveux le rein et le métabolisme (5).

Il a été montré que CLCF1 interagit avec l'apolipoprotéine E (ApoE) et que cette interaction module l'activité biologique de la cytokine au niveau neuronal et métabolique (6). Les lipoprotéines jouent un rôle important dans le transport des lipides à travers la circulation sanguine. L'ApoE est spécifiquement impliqué dans le métabolisme du cholestérol (7).

Une étude protéomique à large échelle a identifié 250 protéines qui lient le cholestérol incluant le CRLF1 (8). Dans cette étude, une méthode de bio-conjugaison appelé réaction click ou *copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition* (CuCAA) est utilisée. Cette réaction permet la bio-conjugaison de deux molécules ayant l'une un groupement azide et l'autre un groupement amide.

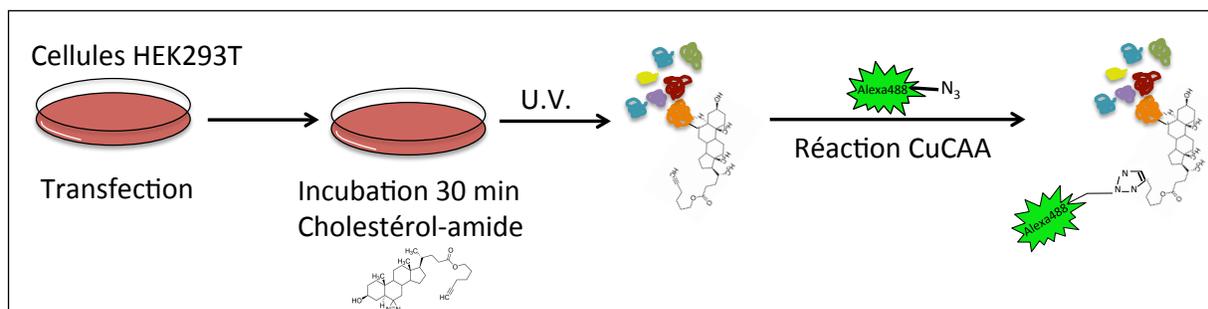


Figure 8. Schéma représentatif de la méthode de bio-conjugaison CuCAA.

Notre hypothèse est que le cholestérol interagit avec la cytokine composite CLCF1/CRLF1 et régule son activité biologique et que les médicaments qui modulent les niveaux de cholestérol pourraient moduler de la sécrétion de la cytokine. Les statines sont des molécules capables d'inhiber la synthèse du cholestérol (9). Elles sont fréquemment employées en clinique pour le traitement de l'hypercholestérolémie dans le but de prévenir les maladies cardiovasculaires (10). Le premier objectif est de confirmer la liaison du CRLF1, seul ou en complexe avec le CLCF1, avec le cholestérol à l'aide de la réaction de bio-conjugaison CuCAA. Pour cela, un cholestérol exogène ayant un groupement amide sera utilisé pour induire la formation d'un complexe CRLF1-cholestérol dans des cellules qui surexpriment le CRLF1. Pour détecter ce complexe, un fluorochrome ayant un groupement azide sera ensuite bio-conjugué in vitro avec le cholestérol exogène (8). Le deuxième objectif est d'étudier l'effet de l'inhibition de la synthèse du cholestérol, à l'aide d'une statine, sur la sécrétion de la cytokine composite CLCF1/CRLF1.

Matériels et Méthodes

Réaction de bio-conjugaison.

Le protocole de la réaction de bio-conjugaison est adapté de l'étude de J. Hulce, 2013. Des plasmides contenant les ADNc codant pour CRLF1-flag, ADPGK ou JAGN1 sont transfectés dans des cellules HEK293T. En parallèle, les ADNc codant pour CRLF1-flag et CLCF1, contenus chacun dans un plasmide d'expression, sont co-transfectés dans des cellules HEK293T. Quarante-huit heures après la transfection, les cellules sont incubées avec du cholestérol-amide (10 μ M) pour 30 min à 37 °C dans l'obscurité. À cet effet, un mélange de cholestérol-amide (100 mM) (Sigma-Aldrich) et de méthyl- β -cyclodextrine (38 mM) (Sigma-Aldrich) est préparé et incubé à TP au moins 12 heures à l'avance. Les cellules sont ensuite irradiées à 365 nm avec une lampe UV (4 Watt et 60 Hz) à une distance de 6 cm pour 125 min dans du PBS. Les cellules sont ensuite lysées par sonication dans du PBS. La concentration en protéines du lysat cellulaire est dosé à l'aide du *Pierce BSC Protein assay kit* (Thermo Fisher Scientific) et ajusté à 1 mg/mL de protéines totales. Une partie du lysat est séparée sur un gel

en acrylamide (12%) et électro-transférée sur une membrane PVDF qui est ensuite incubée avec un anticorps monoclonal anti-flag M2 (F1804, Sigma-Aldrich). Pour la réaction de bio-conjugaison, 50 μ L du lysat est ajoutée dans un tube de 1,5 mL avec 20 μ M d'azide-fluor 488 (760765, Sigma), 1 mM TCEP (Tris(2-carboxyethyl) phosphine Hydrochloride) (Alfa Aesar, Haverhill, MA), 100 mM TBTA (Tris [(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl) methyl] amine) (510758-28-8, Alfa Aesar) et 1 mM CuSO_4 dans un volume total de 100 μ L. Les réactifs sont ensuite incubés pendant 1 h à TP et une fraction du produit de la réaction est analysée par PAGE. Le gel est ensuite scanné à 532 nm à l'aide du *Typhoon Molecular Dynamics phosphor/fluorescence imager*. Une autre fraction du produit de la réaction est analysée par immunobuvardage de type Western Blot à l'aide d'un anticorps spécifique pour l'étiquette Flag (M2).

Traitement avec la simvastatine.

Un plasmide contenant l'ADNc CRLF1-flag est transfecté seul ou en combinaison avec un plasmide contenant l'ADNc CLCF1-protC dans des cellules HEK293T. Vingt-quatre heures après la transfection, les cellules sur-exprimant le CRLF1 ou la combinaison de CLCF1 et de CRLF1 ont été traitées avec 20 μ M de simvastatine pendant 24 h. La concentration de protéines des lysats cellulaires a été quantifiée à l'aide du *Pierce BSC Protein assay kit*. Les lysats et le surnageant de chaque transfection ont été analysés par immunobuvardage de type Western blot à l'aide d'anticorps dirigés contre les étiquettes Flag ou ProtC (A00637, GenScript, NJ, USA). L'intensité des bandes a été quantifiée à l'aide du logiciel ImageJ.

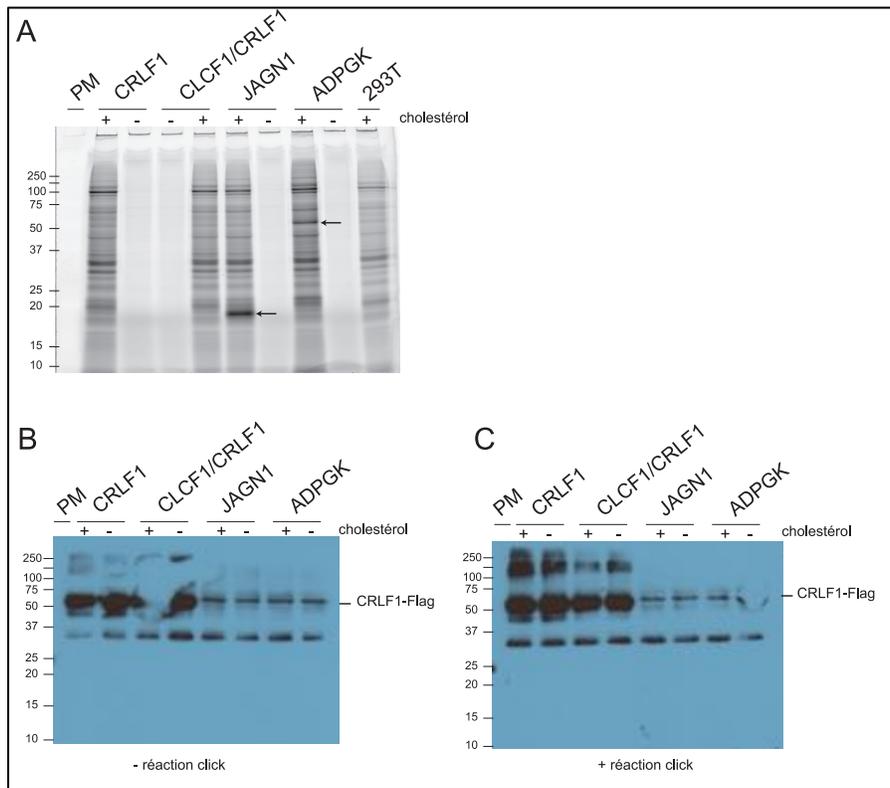


Figure 9. Le CRLF1 ne semble pas former un lien covalent avec le cholestérol. Des plasmides contenant les ADNc codants pour CRLF1, CLCF1, ADPGK ou JAGN1 ont été transfectés dans les cellules HEK293T. Les cellules ont été incubées en présence (+; 10 μ M) ou en absence de cholestérol-amide (-) pour 30 min à 37°C, irradiées à l'UV et lysées. Une partie du lysat a été séparée sur un gel en acrylamide et transférée sur une membrane avant d'être immuno-marquée à l'aide d'un anticorps anti-flag (B). Les protéines liant le cholestérol ont été marquées par la conjugaison du cholestérol-amide (lysate cellulaire à 1 mg/mL de protéines) avec de l'azide-fluor488 (20 μ M). Des échantillons du produit de la réaction de conjugaison ont été analysés sur un gel polyacrylamide-SDS qui a été photographié à 532 nm à l'aide d'un imageur biomoléculaire Typhoon. Les flèches indiquent les bandes qui correspondent aux complexes JAGN1-cholestérol et ADPGK-cholestérol. (A) Les échantillons de produit de réaction analysés par immunobuvardage de type Western blot à l'aide d'un anticorps anti-Flag (C).

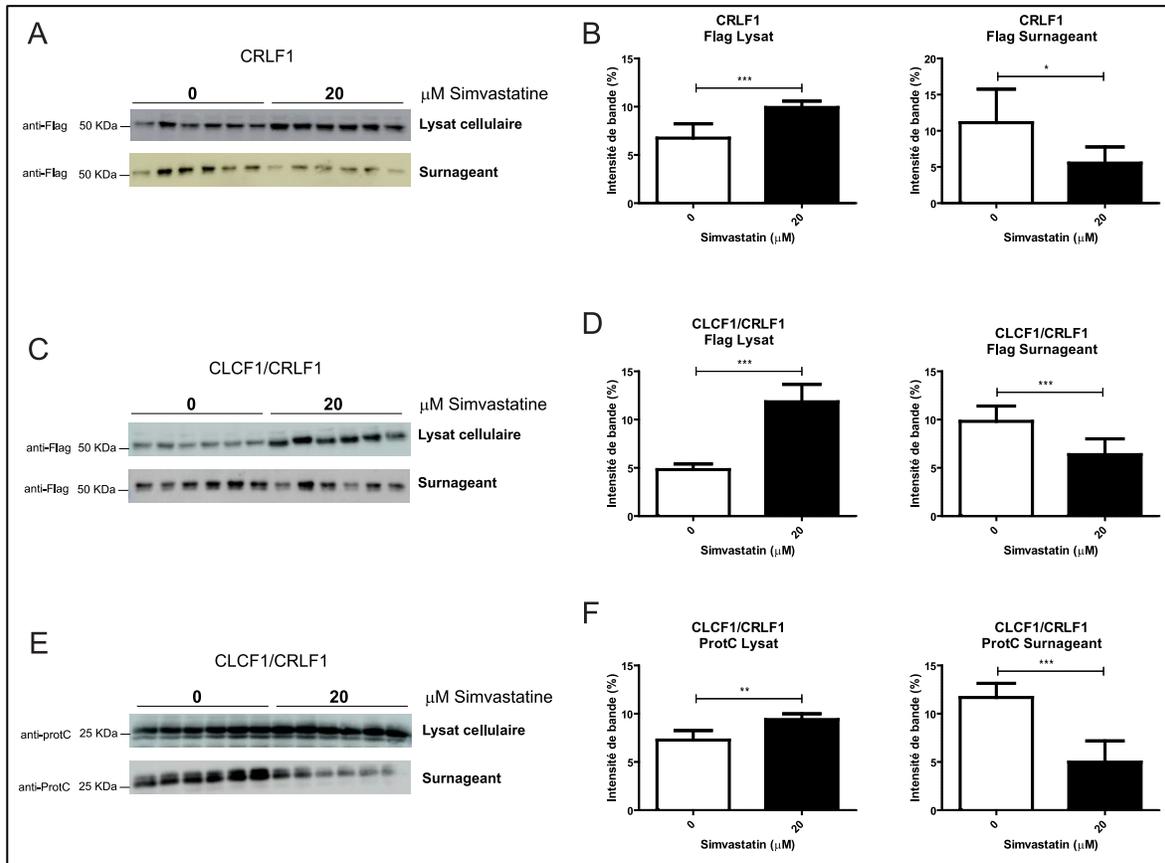


Figure 10. La simvastatine inhibe la sécrétion du CRLF1 et de la cytokine composite CLCF1/CRLF1. (A) Un plasmide contenant l'ADNc codants pour le CRLF1-flag a été transfecté dans les cellules HEK293T. (C, E) Les plasmides contenant les ADNc codant pour le CRLF1-flag ou le CLCF1-protC ont été co-transfectés dans des cellules HEK293T. Les cellules sur-exprimant le CRLF1 ou la combinaison de CRLF1 et de CLCF1 ont été traitées avec la simvastatine (0 ou 20 μM) pour 24 h. Des aliquots de lysats cellulaires correspondant à 15 μg de protéines ou de milieu de culture (15 μL de 2 ml) ont été analysé par immunobuvardage de type Western blot à l'aide d'anticorps spécifiques pour les étiquettes Flag ou Prot C. (B, D, F) L'intensité des bandes a été quantifiée à l'aide du logiciel ImageJ. Les histogrammes représentent l'intensité moyenne des bandes \pm SD. La signification statistique a été calculée à l'aide du test d'ANOVA. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Résultats et discussion

La liaison de CRLF1 avec le cholestérol n'a pu être confirmée

Dans le but de confirmer la liaison entre le cholestérol et le CRLF1, des cellules HEK293T qui surexpriment le CRLF1 ou la combinaison de CRLF1 et CLCF1 ont été incubées avec du cholestérol-amide puis irradiées à l'U.V. dans le but de stabiliser la liaison cholestérol-protéine par un lien covalent. La réaction de bio-conjugaison CuCAA a ensuite effectuée sur les lysats cellulaires pour catalyser la formation de complexes entre le cholestérol-amide et l'azide-fluor488. L'ADPGK (*ADP-specific glucokinase*) et le JAGN1 (*Jagunal Homolog 1*) ont été inclus comme contrôles positifs de la réaction. L'interaction de ces deux protéines avec le cholestérol, a été confirmée par PAGE et par analyse de fluorescence dans l'étude originale sur l'identification des protéines liant le cholestérol (8). Nous avons pu reproduire ces résultats (figure 9 A). Par contre, aucune bande spécifique indiquant que le CRLF1 ou que le CLCF1/CRLF1 forme un complexe avec le cholestérol n'a été détectée (figure 9 A). La figure 9 (B, C) montre la présence du CRLF1 dans les réactifs et dans les produits de la réaction de bio-conjugaison détectable à l'aide d'un anticorps spécifique pour l'étiquette Flag.

Pour augmenter la sensibilité de la technique, des essais de purification du CRLF1-6His bio-conjugué à la sonde de cholestérol ont été effectués par chromatographie d'affinité utilisant le nickel (IMAC). Ces essais n'ont pas été fructueux, probablement en raison de la présence du cuivre dans le produit de la réaction. En effet, les étiquettes 6-His lient très fortement les ions cuivre et, la présence du cuivre dans les échantillons pourrait empêcher l'isolation du CRLF1 par IMAC. Pour se débarrasser du cuivre et des réactifs nuisibles à la purification par chromatographie, une dialyse des produits de la réaction a été effectuée. Cependant, la dialyse semble avoir causé la perte d'une grande partie de la protéine CRLF1 (résultats non montrés). Une alternative serait d'utiliser une chromatographie d'affinité autre que l'IMAC pour enrichir le CRLF1.

La simvastatine inhibe la sécrétion du CRLF1 et de la cytokine composite CLCF1/CRLF1 dans les transfectants HEK293T.

La simvastatine est une statine capable d'inhiber l'activité de la HMG-CoA réductase, l'enzyme responsable de la transformation de l'HMG-CoA en mévalonate, inhibant ainsi la biosynthèse du cholestérol (9). L'hypothèse est que l'interaction CRLF1-cholestérol régule la sécrétion de la cytokine composite CLCF1/CRLF1 et que l'inhibition de la biosynthèse du cholestérol perturberait cette sécrétion. Le traitement de transfectants HEK293T exprimant le CRLF1 (figure 10 A et B) ou le CLCF1/CRLF1 (figure 10 C, D, E et F) avec la simvastatine induit une augmentation des niveaux de CRLF1 et du CLCF1 dans le lysat cellulaire et d'une diminution de la concentration des mêmes protéines dans le surnageant, indiquant une inhibition de la sécrétion de ces protéines. Ces résultats suggèrent un rôle du cholestérol dans la régulation de la sécrétion du CRLF1 et du CLCF1/CRLF1.

Conclusions et Perspectives

Les résultats de la réaction de bio-conjugaison CuCAA n'ont pas permis de confirmer une interaction entre le récepteur soluble CRLF1 et la cytokine composite CLCF1/CRLF1 avec le cholestérol. Cependant, le traitement avec la simvastatine des transfectants HEK293T qui sur-expriment la cytokine composite CLCF1/CRLF1 ou le récepteur soluble CRLF1 inhibe de la sécrétion de ces derniers suggérant un rôle du cholestérol le contrôle de la production de la protéine.

L'effet inhibiteur de la sécrétion que la simvastatine exerce n'est pas toujours dépendant du cholestérol. La simvastatine est notamment capable de bloquer le canal ionique VGCC (*Voltage-gated calcium channels*) impliqué dans la sécrétion d'une variété de protéines, comme l'insuline, inhibant leur sécrétion (11). Ainsi, dans le but de vérifier que la simvastatine inhibe la sécrétion de la cytokine composite CLCF1/CRLF1 en agissant sur le métabolisme du cholestérol, il serait intéressant de vérifier que l'ajout de cholestérol exogène renverse l'effet de la simvastatine. Une approche complémentaire serait de traiter, en parallèle,

des transfectants CLCF1/CRLF1 avec la cholestérol oxydase (COase) ou la cholestérol estérase (CEase) et d'observer les effets sur la sécrétion de la cytokine. Ces enzymes sont commercialement disponibles et peuvent être ajoutés au milieu de culture. En effet, la COase permet de dépléter le cholestérol en le transformant en cholesten-3-one alors que, la CEase permet d'augmenter les niveaux de cholestérol en transformant le cholestérol ester en cholestérol. Ces deux enzymes sont fréquemment utilisées dans des études de déplétion de cholestérol cellulaire et leur utilisation serait intéressante dans ce cas (12).

Bibliographie

1. Senaldi G, Stolina M, Guo J, Faggioni R, McCabe S, Kaufman SA, et al. Regulatory effects of novel neurotrophin-1/b cell-stimulating factor-3 (cardiotrophin-like cytokine) on B cell function. *J Immunol.* 2002;168(11):5690-8. Epub 2002/05/23.
2. Senaldi G, Varnum BC, Sarmiento U, Starnes C, Lile J, Scully S, et al. Novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3: a cytokine of the IL-6 family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(20):11458-63. Epub 1999/09/29.
3. Forger NG, Prevet D, deLapeyriere O, de Bovis B, Wang S, Bartlett P, et al. Cardiotrophin-like cytokine/cytokine-like factor 1 is an essential trophic factor for lumbar and facial motoneurons in vivo. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2003;23(26):8854-8. Epub 2003/10/03.
4. Elson GC, Lelievre E, Guillet C, Chevalier S, Plun-Favreau H, Froger J, et al. CLF associates with CLC to form a functional heteromeric ligand for the CNTF receptor complex. *Nat Neurosci.* 2000;3(9):867-72. Epub 2000/08/31.
5. Kass DJ, Yu G, Loh KS, Savir A, Borczuk A, Kahloon R, et al. Cytokine-like factor 1 gene expression is enriched in idiopathic pulmonary fibrosis and drives the accumulation of CD4+ T cells in murine lungs: evidence for an antifibrotic role in bleomycin injury. *Am J Pathol.* 2012;180(5):1963-78. Epub 2012/03/21.
6. Pasquin S, Chehboun S, Dejda A, Meliani Y, Savin V, Warner GJ, et al. Effect of human very low-density lipoproteins on cardiotrophin-like cytokine factor 1 (CLCF1) activity. *Sci Rep.* 2018;8(1):3990. Epub 2018/03/07.

7. Martins IJ, Hone E, Foster JK, Sünram-Lea SI, Gnjec A, Fuller SJ, et al. Apolipoprotein E, cholesterol metabolism, diabetes, and the convergence of risk factors for Alzheimer's disease and cardiovascular disease. *Molecular Psychiatry*. 2006;11:721.
8. Hulce JJ, Cognetta AB, Niphakis MJ, Tully SE, Cravatt BF. Proteome-wide mapping of cholesterol-interacting proteins in mammalian cells. *Nature Methods*. 2013;10:259.
9. Alberts AW, Chen J, Kuron G, Hunt V, Huff J, Hoffman C, et al. Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980;77(7):3957-61. Epub 1980/07/01.
10. Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, MacFarlane PW, et al. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *The New England journal of medicine*. 1995;333(20):1301-7. Epub 1995/11/16.
11. Yada T, Nakata M, Shiraishi T, Kakei M. Inhibition by simvastatin, but not pravastatin, of glucose-induced cytosolic Ca²⁺ signalling and insulin secretion due to blockade of L-type Ca²⁺ channels in rat islet β -cells. *British Journal of Pharmacology*. 1999;126(5):1205-13.
12. Abu-Arish A, Pandzic E, Goepf J, Matthes E, Hanrahan JW, Wiseman PW. Cholesterol modulates CFTR confinement in the plasma membrane of primary epithelial cells. *Biophysical journal*. 2015;109(1):85-94.