

## 1

## Facteurs de croissance et cytokines

Les connaissances sur la biologie cellulaire du tissu osseux ont fait des avancées considérables ces dernières années. Il est bien établi maintenant que des relations importantes existent entre le système hématolymphopoiétique et l'os. Les deux types de cellules osseuses, ostéoclastes et ostéoblastes, proviennent en effet respectivement des cellules souches hématopoiétiques et des cellules stromales de la moelle osseuse. Les cytokines produites dans le microenvironnement participent au remodelage osseux en régulant la différenciation et l'activité de ces cellules osseuses. Le turnover osseux est également régulé par des interactions complexes entre les hormones systémiques, les facteurs de croissance, dont la synthèse se fait au niveau local, et les cellules osseuses.

### Ostéoclaste et résorption osseuse

Au cours de ces cinq dernières années, un effort considérable a été effectué pour analyser la fonction de résorption ainsi que sa régulation. Cet effort a été possible grâce à la mise au point de techniques permettant d'isoler les ostéoclastes. Certains points fondamentaux de la biologie de l'ostéoclaste ont ainsi été acquis récemment et font qu'aujourd'hui, les ostéoclastes sont des cibles pharmacologiques potentielles pour des médicaments anti-ostéoporotiques.

L'attachement de l'ostéoclaste sur la matrice osseuse permet de créer un micro-compartiment entre la bordure plissée de l'ostéoclaste et la matrice osseuse. Cet attachement se fait grâce à l'intégrine  $\beta_3 \alpha_v$  (Davies et coll., 1989) qui a pour ligand les protéines adhésives synthétisées par les ostéoblastes et incorporées dans la matrice osseuse : la thrombospondine, l'ostéopontine et la *bone sialoprotein* (Helfrich et coll., 1992). Un anticorps dirigé contre la chaîne  $\alpha_v$  ou des peptides RGDS inhibent la résorption par les ostéoclastes isolés laissant penser que des molécules ayant cette fonction pourraient être des inhibiteurs sélectifs de la résorption.

L'acidification et le relargage d'enzymes se font dans ce compartiment grâce à une pompe à protons. La pompe à protons de l'ostéoclaste est de type vacuolaire (Blair et coll., 1989). La détermination de sa séquence est en cours et sa composition biochimique exacte n'est pas encore connue. La recherche d'inhibiteurs spécifiques de cette pompe à protons vacuolaire semble difficile.

Récemment, il a été montré que des souris transgéniques chez lesquelles le proto-oncogène *src* a été supprimé présentent comme seule anomalie notable une ostéopétrose, c'est-à-dire une ostéocondensation due à une absence de résorption par les ostéoclastes (Soriano et coll., 1991). Ce résultat a initié toute une série de travaux destinés d'une part, à connaître le rôle de ce proto-oncogène dans la résorption osseuse et d'autre part, à étudier la relation entre *c-src*, l'intégrine  $\alpha_v\beta$  et la signalisation intracellulaire par la voie phosphatidylinositol triphosphate. Dans toutes les autres cellules de l'organisme, les autres tyrosine-kinases de la famille *src* (*yes*, *lin...*) suppléent l'action de *src*. Il est donc envisageable que des inhibiteurs de *src* aient la capacité de bloquer la résorption osseuse.

La régulation de la résorption osseuse intervient principalement au moment de la différenciation cellulaire. Peu de facteurs systémiques ou locaux ont un effet direct sur l'ostéoclaste. Les deux seuls facteurs qui agissent directement sur les ostéoclastes sont la calcitonine (les ostéoclastes expriment environ un million de sites récepteurs) et la prostaglandine E2 qui, toutes deux, diminuent la résorption osseuse.

Tous les facteurs de croissance ainsi que les cytokines agissent sur la différenciation des ostéoclastes. Par ailleurs, presque tous, à l'exception du TGF $\beta$  (*Transforming Growth Factor*) et de l'interféron  $\gamma$  activent la différenciation. A des concentrations extrêmement faibles, l'interleukine 1 (IL-1) augmente le recrutement des ostéoclastes par son action positive sur la prolifération des précurseurs. Elle est le composant majeur de l'activité OAF (*Osteoclast Activating Factor*) qui avait été décrite dans les surnageants de cellules mononuclées sanguines activées. L'interleukine 6 (IL-6), produite en grande quantité par les ostéoblastes, provoque la prolifération des précurseurs des ostéoclastes. L'hyper-sécrétion d'IL6 pourrait être un des facteurs responsables de l'ostéolyse observée au cours du myélome et dans la perte osseuse liée à la ménopause. Une variété d'ostéopétrose animale, la mutation *op/op* de la souris, a permis de démontrer qu'un des facteurs ostéoblastiques responsable de la différenciation des ostéoclastes est le M-CSF (*Macrophage-Colony Stimulating Factor*). Il est vraisemblable que d'autres cytokines produites par les ostéoblastes sont impliquées dans ce processus de différenciation (Suda et coll., 1992).

## Ostéoblaste et ostéoformation

Les ostéoblastes ont pour origine une cellule mésenchymateuse présente chez l'adulte essentiellement dans le stroma médullaire. Les cellules ostéogéniques du stroma médullaire proviennent de la prolifération de clones de cellules souches pluripotentes pouvant donner naissance à des clones de cellules adipeuses, mésenchymateuses ou chondroblastiques après induction par des facteurs hormonaux et locaux (Owen, 1988).

La différenciation des ostéoblastes correspond à un processus complexe qui met en jeu des interactions multiples entre les cellules et la matrice. Après une étape de prolifération initiale des cellules précurseurs, l'ostéoblaste acquiert progressivement les caractéristiques d'une cellule fonctionnelle différenciée. Sa fonction essentielle est de synthétiser et de minéraliser la matrice organique osseuse constituée essentiellement de collagène, de protéines non collagéniques et de facteurs de croissance.

De plus, les cellules de la lignée ostéoblastique jouent un rôle important dans le contrôle du remodelage osseux, d'une part par leur capacité à synthétiser de nombreux facteurs de croissance, d'autre part en tant que cellules cibles des hormones contrôlant la différenciation des ostéoclastes (Suda et coll., 1992).

L'analyse histomorphométrique du tissu osseux a montré que la formation osseuse dépend non seulement du nombre d'ostéoblastes arrivés à maturation après différenciation, mais aussi de l'activité de synthèse de chaque cellule. Des travaux récents indiquent cependant que la formation de l'os dépend essentiellement du nombre d'ostéoblastes, plutôt que de l'activité de chacun d'entre eux. En outre, ils mettent en évidence l'importance de l'étape de prolifération cellulaire à partir des précurseurs ostéoblastiques dans le contrôle de la formation osseuse normale et pathologique, et soulignent le rôle primordial des facteurs de croissance affectant le recrutement et la prolifération des ostéoblastes (Marie et de Vernejoul, 1993).

La régulation de la formation osseuse fait appel principalement à des facteurs de croissance et accessoirement à des cytokines (Goldring et coll., 1990 ; de Vernejoul et coll., 1993) Tableau 1.1). Les facteurs de croissance sont synthétisés par les cellules de la lignée ostéoblastique elles-mêmes (probablement de façon différente selon le stade de différenciation cellulaire) et peuvent donc jouer un rôle autocrine et paracrine. Bien que, à l'exception de l'interleukine 6 (IL6), de nombreuses cytokines soient produites en quantité minime par les cellules de la lignée ostéoblastique (Roodman, 1992), les cytokines qui agissent principalement sur la différenciation des ostéoclastes, sont essentiellement produites au niveau local par les cellules médullaires.

Qu'ils soient incorporés passivement dans la matrice osseuse par adsorption sur l'hydroxyapatite ou qu'ils soient synthétisés par les cellules

ostéoblastiques, puis incorporés dans la matrice osseuse, de nombreux facteurs de croissance agissant sur les cellules osseuses sont présents dans la matrice osseuse. La matrice extracellulaire sert ainsi de réservoir à ces facteurs qui sont protégés de la protéolyse enzymatique par leur liaison avec les glycosaminoglycanes et les protéines matricielles. Les principaux facteurs de croissance identifiés dans la matrice osseuse sont le *Fibroblast Growth Factor* (FGF), les *Insulin-like Growth Factors* (IGF-I et II), le *Transforming Growth Factor  $\beta$*  (TGF $\beta$ ) et une famille de protéines, appelées *Bone Morphogenetic Proteins* (BMP), qui ont des propriétés ostéoinductives in vivo.

Le fait que ces facteurs, en particulier les IGF et le TGF $\beta$  qui sont produits par les ostéoblastes, soient également présents dans la matrice osseuse, libérés lors de la résorption osseuse et qu'ils agissent sur la prolifération et la différenciation ostéoblastique, indique qu'ils pourraient intervenir comme facteurs de couplage entre la résorption et la formation osseuse.

Les FGF basique et acide stimulent la prolifération cellulaire et augmentent l'expression de l'ostéocalcine et de l'ostéopontine. In vitro, ils inhibent la synthèse de collagène et l'activité des phosphatases alcalines, mais sont capables, in vivo chez le rat, de stimuler la synthèse de l'endoste.

Les IGFs sont synthétisés par les ostéoblastes, l'IGF-II étant produit, chez l'homme, en plus grande quantité que l'IGF-I. Par le biais d'une action sur la transcription, les IGF-I et II stimulent la prolifération des ostéoblastes et, dans les cultures cellulaires, augmentent la synthèse de collagène effectuée par les ostéoblastes. Les effets des IGFs sur les ostéoblastes dépendent de la présence de protéines porteuses (*Binding Proteins*, BPs) (Schmid et coll., 1992). Ces protéines sont synthétisées par les ostéoblastes et certaines d'entre elles, dont la BP3, modulent l'activité biologique des IGFs en stabilisant ces facteurs ou en bloquant leur liaison aux récepteurs. Dans l'os humain, l'IGF semble être principalement liée à l'IGF-BP5 qui a une forte affinité pour le calcium. Par ailleurs, l'IGF-I pourrait agir comme facteur mitogène, médiateur des forces de compression, sur les cellules précurseurs des ostéoblastes. L'IGF-I semble également jouer un rôle dans la réparation osseuse, car après fracture, l'expression de l'IGF-I est augmentée dans l'os néoformé.

Les ostéoblastes produisent du TGF $\beta$ -I, II et III et possèdent des sites récepteurs à ces facteurs. D'une façon générale, l'effet anabolique du TGF $\beta$  fait appel à une augmentation de la production de matrice extracellulaire, une augmentation de l'adhérence et une augmentation de la prolifération et de la différenciation des ostéoblastes accompagnées d'une inhibition de la dégradation de la matrice. Les effets stimulateurs du TGF $\beta$  sur le recrutement des ostéoblastes et la production de la matrice osseuse ainsi que la régulation de l'activité biologique du TGF $\beta$  suggèrent que celui-ci pourrait jouer un rôle important dans le contrôle local de la

formation et du remodelage osseux. En effet, dans de nombreux modèles *in vitro*, le TGF $\beta$  a un effet négatif sur la résorption osseuse. D'autre part, l'expression du TGF $\beta$  est augmentée lors de la réparation de fractures osseuses, ce qui suggère que ce facteur serait également impliqué dans l'ostéogenèse réparatrice (Centrella et coll., 1991).

Les BMPs constituent un ensemble de protéines présentes dans la matrice osseuse. *In vivo*, elles sont ostéoinductives. Six protéines de la famille des BMPs (BMP 2 à 7) présentent une forte homologie de séquence avec le TGF $\beta$ -I et ont des effets proches de ceux des TGF $\beta$ -I et II. Certaines BMPs stimulent la prolifération cellulaire des ostéoblastes en culture, alors que d'autres, la BM2 et la BMP3 (ou ostéogénine), semblent être de puissants agents stimulateurs de la différenciation des ostéoblastes. L'effet ostéoinductif des BMPs observé *in vivo* résulte probablement de l'effet combiné de ces protéines.

Il est nécessaire de signaler ici qu'il n'existe aucun facteur de croissance ni aucune cytokine spécifique du tissu osseux, et que tous ces facteurs sont susceptibles d'agir sur d'autres organes.

**Tableau 1-I – Régulateurs potentiels du remodelage osseux**

		Facteurs systémiques	Facteurs locaux
Résorption	<i>Stimulation</i>	PTH Calcitriol Hormones thyroïdiennes	PGE <sub>2</sub> IL-1 TGF- $\alpha$ TNFs EGF VIP
	<i>Inhibition</i>	Calcitonine Œstrogènes Androgènes Progestérone	Interféron- $\gamma$ TGF- $\beta$ IL-6 « Ostéostatines »
Formation	<i>Stimulation</i>	PTH Calcitriol Insuline Hormones thyroïdiennes Androgènes ? Œstrogènes ? Progestérone ?	IGFs Prostaglandines TGF- $\beta$ BMPs
	<i>Inhibition</i>	Glucocorticoïdes	Interféron- $\alpha$ IL-1

Le calcitriol possède une activité potentielle de résorption osseuse *in vitro*, mais il est classiquement décrit comme étant antirésorptif *in vivo*. La stimulation de la formation osseuse par le calcitriol est indirecte (via l'augmentation de la disponibilité en calcium et en phosphate), ou directe.

TGF : *transforming growth factor* ; TNF : *tumor necrosis factor* ; EGF : *epidermal growth factor* ;

VIP : *vasoactive intestinal peptide* ; BMP : *bone morphogenic protein* ; PTH : *parathormone* ;

PGE : *Prostaglandine E* ; IL : *interleukine* ; IGF : *Insulin growth factor*.

## Régulation hormonale

On sait que la régulation de la plupart des facteurs de croissance fait intervenir de nombreuses hormones et que certains facteurs servent de relais à l'action locale des hormones calciotropes. Un grand nombre d'hormones modulent la synthèse des facteurs de croissance produits par les ostéoblastes.

Chez l'homme, la production des IGFs et de leurs protéines porteuses est régulée par l'hormone de croissance, la parathormone (PTH), les œstrogènes et les androgènes dont les effets mitogènes sur les ostéoblastes font en partie appel à une augmentation de la production d'IGF-I. Par le biais également d'une action sur la transcription, la PTH et les œstrogènes stimulent la synthèse de TGF $\beta$ . Les effets mitogènes de ces hormones font intervenir une augmentation de la production de TGF $\beta$ .

Chez le rat, la production d'IL-6 par les cellules stromales est modulée par les œstrogènes. Ce fait n'a pas été retrouvé chez l'homme. Ainsi, les effets locaux de certains facteurs sur les cellules osseuses peuvent être modulés et amplifiés par les hormones calciotropes et les œstrogènes.

Lors de la carence en œstrogène, on observe au niveau tissulaire une augmentation du nombre d'ostéoclastes et sans doute également, une augmentation de leur activité conduisant à la perforation des travées osseuses. Il n'est pas certain qu'il existe des récepteurs aux œstrogènes sur les ostéoclastes (Ernst et coll., 1989), alors que leur présence sur les ostéoblastes (Ernst et coll., 1989) et les macrophages est bien démontrée. L'hypothèse de travail de nombreux groupes est donc que la modulation par les œstrogènes de la sécrétion de cytokines produites par les ostéoblastes ou les macrophages serait peut-être responsable de l'augmentation de la différenciation des ostéoclastes au moment de la ménopause (de Vernejoul et coll., 1993).

Toute une série de travaux ont étudié les rapports entre œstrogènes et production de cytokines par les monocytes circulants. Le schéma pathologique envisagé est le suivant : il existe, près de la surface osseuse, des monocytes ou des macrophages médullaires dont les produits de sécrétion pourraient influencer la différenciation des ostéoclastes. Les monocytes circulants reflèteraient cette activité, et il a été montré qu'en post-ménopause, mais aussi chez certaines femmes plus âgées ayant une ostéoporose, la production d'une activité IL-1 par des monocytes non activés était augmentée (Pacifi et coll., 1989). Ces auteurs ont par ailleurs démontré que l'IL-1-Ra, un inhibiteur physiologique de l'IL-1, était capable, chez la rate, de freiner la perte osseuse survenant à distance de l'ovariectomie. D'autres groupes n'ont pas retrouvé ces résultats, mais ont observé que la production de TNF $\alpha$  par les monocytes circulants était augmentée en post-ménopause récente. Les surnageants de monocytes prélevés chez des femmes en post-ménopause ont montré une activité de résorption importante in

vitro. Cette activité était liée à la libération d'IL-1, de TNF $\alpha$  et d'IL-6 (Cohen-Solal et coll., 1993).

Comme il a été montré précédemment, certaines cytokines ou certains facteurs de croissance produits par les ostéoblastes et intervenant dans la régulation de la différenciation des ostéoclastes sont eux-mêmes soumis à une régulation par les œstrogènes. Dans le tissu osseux humain, la production de TGF $\beta$  par les ostéoblastes est augmentée par le 17 $\beta$ -œstradiol. De par son effet négatif sur la prolifération des précurseurs, le TGF $\beta$  pourrait donc être l'un des médiateurs de l'hyper-résorption survenant lors de la ménopause, mais à l'heure actuelle, cette hypothèse n'est étayée par aucun résultat. En revanche, les résultats obtenus chez la souris avec l'IL-6 produite par les cellules stromales sont très clairs : le 17 $\beta$ -œstradiol diminue très nettement l'ARN messager de l'IL-6 ainsi que la libération de l'IL-6 stimulée par le TNF $\alpha$  ou l'IL-1.

Par ailleurs, *in vivo*, chez la souris, un anticorps anti-IL-6 bloque l'hyper-résorption secondaire à l'ovariectomie (Jilka et coll., 1992). Enfin, des souris ayant une mutation « nulle » pour l'IL-6 ne perdent pas d'os après ovariectomie. L'IL-6 pourrait donc être un des facteurs responsables de la perte osseuse liée à la ménopause chez la souris. Pour la femme, on ne dispose actuellement d'aucune donnée à ce sujet.

En conclusion, il s'agit d'un domaine actuellement en pleine évolution où les données obtenues chez l'animal sont plus claires que celles obtenues en clinique. Dans la mesure où des inhibiteurs de cytokines pourraient constituer une approche thérapeutique nouvelle, il est indispensable que les recherches soient poursuivies.

## Facteurs de croissance au cours du vieillissement

Comme nous l'avons rappelé, la synthèse d'IGF et de TGF $\beta$  est modulée par les œstrogènes. Il n'est pas impossible que, dans le déterminisme de la perte osseuse, un déficit de production de ces facteurs lors de la ménopause puisse intervenir. Les données préliminaires d'un groupe américain suggèrent que le taux des facteurs de croissance de l'os pourrait être diminué lors du vieillissement, comme le sont les taux circulants d'IGF.

Quelques études réalisées d'une part chez l'animal et d'autre part en clinique se sont intéressées au rôle thérapeutique potentiel de l'IGF dans l'ostéoporose. *In vivo*, l'IGF est capable d'augmenter la synthèse de la matrice osseuse et de prévenir partiellement la perte osseuse due à l'ovariectomie. Cependant, si les études à court terme réalisées chez l'homme et la femme ont confirmé que l'IGF pouvait augmenter les marqueurs de l'ostéoformation, le remodelage osseux dans son ensemble est stimulé et il existe également une augmentation des marqueurs de résorption. Ainsi, il

semble peu vraisemblable que l'IGF puisse être utilisé pour le traitement ou la prévention de l'ostéoporose, d'autant plus que des effets systémiques (hypoglycémie) peuvent difficilement être évités.

En dehors de son action sur le tissu osseux, le TGF $\beta$  a de trop nombreux effets pour que l'on puisse raisonnablement envisager d'en faire un traitement potentiel de l'ostéoporose. Les BMP, de même que le TGF, peuvent en revanche être utilisés en application locale comme facteurs de réparation des pertes osseuses. Les BMP et le TGF ont, en effet, fait la preuve dans de nombreux modèles animaux de leur efficacité en la matière. Si les applications thérapeutiques en orthopédie pour la consolidation des pseudo-arthroses semblent évidentes, leur intérêt potentiel dans le traitement de l'ostéoporose reste cependant à imaginer.

#### BIBLIOGRAPHIE

- BLAIR HC, TEITELBAUM SL, GHISELLI R, BLUCK S. Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science* 1989, **245** : 855-857
- CENTRELLA M, MCCARTHY TL, CANALIS EC. Transforming Growth factor-beta and remodeling of bone. *J Bone Joint Surg* 1991, **73** : 1418-1428
- COHEN-SOLAL M, GRAULET AM, DENNE MA, GUERIS J, BAYLINK D, DE VERNEJOL MC. Peripheral monocyte culture supernatants of menopausal women can induce bone resorption : involvement of growth factors. *J Clin Endocrinol Metab* 1993, **78** : 1648-1653
- DAVIES J, WARWICK J, TOTTY N, PHILP R, HELFRICH M, HORTON M. The osteoclast functional antigen, implicated in the regulation of bone resorption, is biochemically related to the vitronectin receptor. *J Cell Biol* 1989, **109** : 1817-1826
- ERNST M, HEATH JK, SCHMID C, FROESCH RE, RODAN GA. Evidence for a direct effect of oestrogen on bone cells in vitro. *J Steroid Biochem* 1989, **34** : 279-284
- GOLDRING MB, GOLDRING SR. Basic science and pathology skeletal tissue response to cytokines. *Clin Orthop* 1990, **258** : 245-278
- HELFRICH MH, NESBITT SA, DOREY EL, HORTON MA. Rat osteoclast adhere to a wide range of RGD (Arg-Gly-Asp) peptide-containing proteins, including the bone sialoproteins and fibronectin, via a  $\beta 3$  integrin. *J Bone Miner Res* 1992, **7** : 335-343
- JILKA RL, HANGOC G, GIRASOLE G, PASSERI G, WILLIAMS DC, ABRAMS JS, BOYCE B, BROXMEYER H, MANOLOGAS SC. Increased osteoclast development after estrogen loss : mediation by interleukin-6. *Science* 1992, **257** : 87-91
- MARIE PJ, DE VERNEJOL MC. Proliferation of bone surface-derived osteoblastic cells and control of bone formation. *Bone* 1993, **14** : 463-468
- OWEN M. Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci* 1988, suppl **10**, 63-76
- PACIFICI R, RIFAS L, MCCRAKEN R, VERED I, MCMURTRY C, AVIOLI LV, PECK WA. Ovarian steroid treatment blocks a postmenopausal increase in blood monocyte interleukin-1 release. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, **86** : 2398-2402

ROODMAN GD. Perspectives interleukin-6: an osteotrophic factor ? *J Bone Miner Res* 1992, **7** : 475-478

SCHMID C, ERNST M. Insulin-like growth factors. In: Gowen M (ed) *Cytokines and bone Metabolism*. CRC Press 1992, 229-265

SORIANO P, MONTGOMERY C, GESKE R, BRADLEY A. Target disruption of the c-src proto-oncogene leads to osteopetrosis in mice. *Cell* 1991, **64** : 693-702

SUDA T, TAKAHASHI N, MARTIN TJ. Modulation of osteoclast differentiation. *Endocrine Rev* 1992, **13** : 66-80

DE VERNEJOL MC, COHEN-SOLAL M, ORCEL P. Bone cytokines. *Curr Opinion Rheum* 1993, **5** : 332-338