

Le TNF- α et l'IL-1 β stimulent la phosphatase alcaline indépendamment de RUNX2 : possible implication dans les calcifications ectopiques

LENCEL Philippe¹, GHALI Olfa¹, BROUX Odile¹, PILET Paul², SOURICE Sophie², CAUDRILLIER Axelle³, CHAUVEAU Christophe¹, HARDOUIN Pierre¹, MAGNE David¹

¹Laboratoire de Recherche sur les Biomatériaux et les Biotechnologies LR2B EA2603, Université Lille Nord de France, Boulogne/Mer, ²Laboratoire d'Ingénierie OstéoArticulaire et Dentaire LIOAD, INSERM U791, Nantes ; ³INSERM ERI-12, Amiens, France.

Bien que les maladies inflammatoires chroniques comme la polyarthrite rhumatoïde, entraînent des pertes osseuses, l'inflammation est suspectée stimuler des ossifications ectopiques, comme les ostéophytes et syndesmophytes des spondylarthropathies et les calcifications vasculaires associées au diabète de type 2 ou à l'athérosclérose. Puisque certaines cytokines comme le TNF- α sont suspectées à la fois diminuer la formation et induire les calcifications ectopiques *in vivo* (Al-Aly, *Arterioscler Thromb vasc Biol* 2007), notre objectif était de déterminer l'effet des cytokines inflammatoires sur la formation osseuse normale et ectopique. Nous avons montré très récemment que le TNF- α et l'IL-1 β stimulent l'activité de la phosphatase alcaline et la minéralisation en culture de cellules souches mésenchymateuses (CSM) humaines, bien qu'elles réduisent l'activité de RUNX2, et la synthèse de collagène de type 1 (Jian D, *Life Sci* 2009). Nous avons de plus observé que RUNX2 n'est pas impliqué dans les effets des cytokines sur la minéralisation. Ces résultats suggèrent que le TNF- α et l'IL-1 β pourraient induire des calcifications ectopiques dans des tissus riches en collagène, indépendamment de RUNX2.

Afin de valider cette hypothèse, nous avons d'abord étudié les effets *in vitro* du TNF- α en culture de cellules musculaire lisses humaines, qui sont responsables des calcifications vasculaires. Dans ces cellules, le TNF- α stimule de façon dose-dépendante (0.1 à 10 ng/ml) l'expression et l'activité de la phosphatase alcaline (ALP), sans stimuler l'expression de RUNX2.

Afin de vérifier notre hypothèse dans un complexe un peu plus physiologique, nous avons ensuite étudié l'effet des cytokines sur le remodelage osseux et les calcifications ectopiques *ex vivo* en culture organotypique d'os de souris de 12 semaines. Notre hypothèse ici était que l'inflammation des enthèses lors des spondylarthropathies joue un rôle direct sur les pertes osseuses et les calcifications des tendons. Les pattes postérieures ont été débarrassées de la peau et des muscles et traités pendant 5 jours avec 1 ng/ml de TNF- α et 0.1 ng/ml d'IL-1 β . Le microscanner indique que dans ces conditions, les cytokines réduisent significativement la densité minérale osseuse tibiale et fémorale (environ 25%). L'analyse histologique des tendons n'a cependant pas révélé de calcifications. Nous suspectons que Dickkopf1, sécrété notamment par la synoviale en réponse au TNF- α est impliqué dans le blocage des effets du TNF- α sur l'ALP et donc sur la minéralisation des tendons (Diarra D, *Nat Med* 2007). Nous avons observé que DKK-1, bien qu'exprimé en réponse au TNF- α (PCR quantitative), ne réduit pas la minéralisation en culture de CSM, ce qui semble confirmer que les effets du TNF- α ne sont pas dus à l'activation de facteurs Wnt canoniques. Nos expériences aujourd'hui visent à identifier les membres Wnt non canoniques responsables des effets du TNF- α *in vitro* et *ex vivo*.