

**THESE**  
**pour le**  
**DIPLÔME D'ETAT**  
**DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

par

**Marc BAUD'HUIN**

Présentée et soutenue publiquement le 26 octobre 2006

**Implication de l'IL-6, du M-CSF et du TNF $\alpha$  dans la  
différenciation ostéoclastique**

Président : M. Jean-Yves PETIT, Professeur de Pharmacologie

Membres du jury : M. Dominique HEYMANN, Maître de Conférences d'Histologie  
Mme Christine BOBIN-DUBIGEON, Maître de Conférences de  
Pharmacologie.

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>5</b>
<b>GÉNÉRALITÉS SUR LE TISSU OSSEUX.....</b>	<b>6</b>
<b>I. Structure de l'os.....</b>	<b>7</b>
1. Organisation générale.....	7
2. Organisation macroscopique.....	8
a. Os compact.....	9
b. Os spongieux.....	10
<b>II. Les composants de l'os.....</b>	<b>10</b>
1. La matrice extracellulaire.....	10
a. La matrice organique.....	10
$\alpha$ . Le collagène.....	10
$\beta$ . La substance non-collagénique.....	11
b. La matrice inorganique.....	12
2. Les cellules.....	12
a. Les ostéoblastes.....	12
$\alpha$ . Cytologie.....	13
$\beta$ . Origine et différenciation des ostéoblastes.....	13
$\gamma$ . Marqueurs phénotypiques des ostéoblastes.....	14
$\delta$ . Fonction de l'ostéoblaste mature.....	15
b. Les ostéoclastes.....	16
$\alpha$ . Cytologie.....	16
$\beta$ . Origine et différenciation.....	17
$\gamma$ . Rôle des ostéoblastes dans l'ostéoclastogenèse et dans l'initiation de la résorption.....	18
$\delta$ . Fonction : la résorption osseuse.....	20
<b>III. Le remodelage osseux.....</b>	<b>22</b>
<b>LES PRINCIPAUX RÉGULATEURS DE LA RÉSORPTION OSSEUSE.....</b>	<b>25</b>
<b>I. Les facteurs hormonaux.....</b>	<b>26</b>
1. La parathormone ou PTH.....	26
2. Le 1,25-dihydroxycholecalciférol ou 1,25 DHCC.....	26
3. La calcitonine.....	26
4. Autres hormones.....	27
<b>II. La triade OPG / RANK / RANKL.....</b>	<b>27</b>
1. Ostéoprotégérine (OPG).....	29
2. RANKL.....	30
3. RANK.....	33
<b>III. Autres cytokines induisant une différenciation ostéoclastique.....</b>	<b>35</b>
1. M-CSF et ostéoclastogenèse.....	35
2. TNF $\alpha$ et ostéoclastogenèse.....	35
3. IL-6 et ostéoclastogenèse.....	36
<b>LES PATHOLOGIES OSTÉO-ARTICULAIRES .....</b>	<b>39</b>
<b>I. Pathologies non tumorales.....</b>	<b>40</b>
1. Les pathologies ostéo-condensantes.....	40
2. Les pathologies ostéo-lytiques.....	40

<b>II. Pathologies tumorales.....</b>	<b>41</b>
1. Tumeurs primitives .....	41
a. Tumeur à cellules géantes.....	41
b. Ostéosarcome .....	42
c. Sarcome d'Ewing .....	43
d. Chondrosarcome.....	43
2. Tumeurs secondaires.....	44
<b>III. Nouvelles approches thérapeutiques.....</b>	<b>45</b>
1. Potentiel thérapeutique de la triade OPG / RANKL / RANK .....	45
2. Immunothérapies.....	46
<b>TRAVAUX DE RECHERCHE.....</b>	<b>48</b>
<b>I. Matériel et méthodes .....</b>	<b>49</b>
1. Cultures cellulaires.....	49
a. Milieux, solutions et matériel utilisés .....	49
α. Milieux : .....	49
β. Cytokines et inhibiteurs : .....	49
b. Culture de la lignée RAW 264.7 .....	50
2. Détection et numération des ostéoclastes .....	50
a. Coloration May-Grünwald-Giemsa .....	51
b. Coloration TRAP.....	51
3. Etude de l'expression des transcrits par RT-PCR semi-quantitative.....	51
a. Extraction des ARN totaux .....	51
b. Reverse-Transcription (RT).....	52
c. Polymerase Chain Reaction (PCR).....	52
4. Analyse de la transduction du signal par Western blot .....	53
a. Culture des cellules et stimulation .....	53
b. Electrophorèse et transfert.....	54
c. Révélation par chimioluminescence .....	54
5. Cytométrie en flux.....	55
6. Transduction des cellules RAW 264.7 par des particules lentivirales.....	56
7. Statistiques .....	57
<b>II. Résultats.....</b>	<b>58</b>
1. Effets de l'IL-6 sur les cultures de cellules RAW 264.7 .....	58
a. L'hIL-6 réduit le nombre d'ostéoclastes.....	58
b. L'effet inhibiteur de l'hIL-6 est dose-dépendant.....	59
c. L'hIL-6 inhibe l'ostéoclastogénèse de façon irréversible.....	59
d. L'inhibition de l'ostéoclastogénèse n'est pas due à une augmentation de prolifération.....	60
e. L'hIL-6 inhibe l'ostéoclastogénèse en différenciant les RAW 264.7 en macrophages .....	61
α Etude de l'expression des marqueurs ostéoclastiques et macrophagiques par RT-PCR.....	61
β Etude par cytométrie en flux des marqueurs membranaires et intracellulaire des cellules RAW 264.7 après différenciation .....	63
2. Etude des voies de différenciation impliquées dans l'inhibition de l'ostéoclastogénèse .....	65
a. Effets des inhibiteurs de MAPKinases .....	65
b. Effet de l'inhibiteur de PI3Kinase .....	66
c. Effet des inhibiteurs de STAT3 .....	67
d. Transduction des cellules RAW 264.7 par le lentivirus STAT3Δ.....	69
3. Effets du facteur de croissance M-CSF sur l'ostéoclastogénèse des cellules RAW 264.7 induite par hRANKL.....	71
4. Effets du TNFα sur l'ostéoclastogénèse des cellules RAW 264.7 .....	72
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>73</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>80</b>

<b>ANNEXES .....</b>	<b>92</b>
Annexe 1 .....	93
Annexe 2 .....	94

# INTRODUCTION

Les plus anciens fossiles de Vertébrés connus sont datés du Cambrien, il y a 530 millions d'années. Les seules traces de ces animaux sont leur squelette osseux, qui comporte en particulier une colonne vertébrale. Le tissu osseux qui compose ce squelette est un tissu conjonctif spécialisé formé d'une fraction organique et d'une fraction minérale qui lui confère ses propriétés de rigidité et d'élasticité. Il s'agit d'un tissu de soutien servant de point d'ancrage au système musculaire squelettique. Il remplit également des fonctions de protection pour un certain nombre d'organes vitaux en formant de grandes cavités : les os du crâne protègent les hémisphères cérébraux et le cervelet, la rachis vertébral renferme la moelle épinière, la cage thoracique préserve le cœur et les poumons. Enfin, le tissu osseux possède un rôle métabolique important puisqu'il constitue la principale réserve d'ions minéraux (calcium, phosphate, magnésium).

Le tissu osseux est le résultat de l'équilibre entre les activités ostéoblastique et ostéoclastique respectivement responsable des phénomènes de formation et de dégradation de l'os. Des pathologies ostéo-articulaires peuvent apparaître en cas de dérèglement de cette balance.

La connaissance des mécanismes fondamentaux impliqués dans la biologie de l'os permet de mieux comprendre la physiopathologie de ces maladies, et surtout peut conduire à la découverte de nouveaux traitements. Durant cette année de master II, nous nous sommes penchés sur la différenciation des précurseurs ostéoclastiques en ostéoclastes ; et plus particulièrement à l'implication de l'IL-6 dans ce processus.

# **1<sup>ERE</sup> PARTIE**

## **GÉNÉRALITÉS SUR LE TISSU OSSEUX**

Le squelette humain est composé de plus ou moins 206 os, supportés et étayés par des ligaments, tendons, muscles et du cartilage. L'os le plus long du corps est le fémur (50 cm pour un homme de 1,80 m), le plus petit se situant dans l'oreille (étrier : 2,6 à 3,4 mm).

## **I. Structure de l'os**

### **1. Organisation générale**

Au sein du squelette humain 3 types d'os peuvent être décrits :

- a. *Les os longs* comme l'humérus, le fémur ou le tibia, présentent une de leurs dimensions nettement plus grande que les deux autres. Ils servent classiquement de modèle pour décrire la structure des os.
- b. *Les os courts* ont leurs trois dimensions sensiblement égales. Ils sont composés d'un noyau d'os spongieux entouré d'une corticale d'os compact. Les vertèbres et les phalanges en sont des représentants.
- c. *Les os plats*, comme le sternum et les os pariétaux, ont une dimension nettement plus courte que les deux autres. Ils sont composés de deux couches d'os compact, les tables externe et interne, enfermant une couche d'os spongieux.

Un os long typique chez l'adulte est constitué d'une partie centrale cylindrique appelée diaphyse, et de deux extrémités élargies et arrondies appelées épiphyses, couvertes de cartilage articulaire. Des régions coniques, appelées métaphyses, connectent la diaphyse à chaque épiphyse. La forme particulière des os longs leur confère la capacité de résister aux forces de tension, de traction et de cisaillement. Histologiquement, on distingue l'os compact (ou cortical) et l'os spongieux (ou trabéculaire), l'ensemble étant entouré d'une enveloppe externe, le périoste, sauf au niveau du cartilage articulaire et aux endroits d'insertion de tendons et de ligaments (figure 1).

La croissance en longueur des os longs est possible grâce à la persistance d'une plaque cartilagineuse appelée « cartilage de conjugaison » entre les épiphyses et la diaphyse. Cette plaque épiphysaire de cartilage contient de nombreux chondrocytes en multiplication tandis que la plaque diaphysaire contient une matrice cartilagineuse calcifiée par modification des chondrocytes. Vers l'âge de 18 ans, la plaque de croissance est remplacée par de l'os

spongieux, ce qui provoque la fusion de l'épiphyse et de la métaphyse. La disparition du cartilage suite à la fusion de deux masses est appelée fermeture du cartilage.

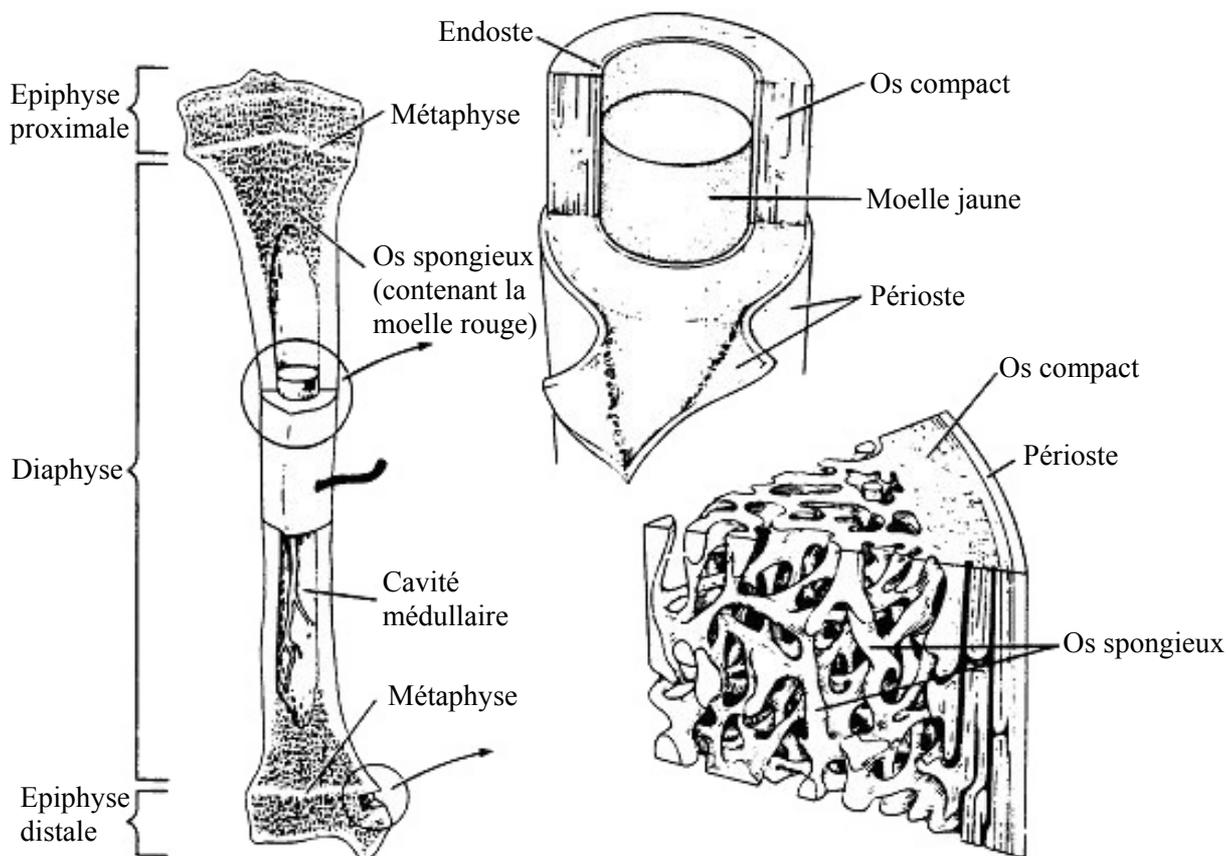


Figure 1 : Organisation structurale d'un os long.

## 2. Organisation macroscopique

La classification en os compact et trabéculaire est basée sur le degré de porosité :

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

### a. Os compact

Il s'agit d'os mature, dense, contenant moins de 10% de tissu mou, présent dans la couche externe de tout os (figure 2). Son architecture rectiligne, est faite d'un grand nombre d'ostéons contigus. L'ostéon est l'élément structural unitaire de l'os compact. Il s'agit d'un cylindre de 200 à 250 micromètres de largeur, parallèle à l'axe longitudinal de la corticale de l'os. Il consiste en une apposition de lamelles concentriques (de 20 à 30) de fibres de collagène autour d'un canal. Ce canal, appelé canal de Havers, large de 40 à 50 micromètres permet le passage de vaisseaux, de fibres nerveuses amyéliniques mais aussi la connexion intercellulaire. Largement ouvert dans les ostéons primaires, le canal de Havers est délimité par les cellules ostéoprogénitrices et les ostéoblastes. Ces cellules prendront le nom d'ostéocytes lors de la maturation des ostéons, conduisant au comblement du canal. Enfin, les ostéons sont reliés entre eux par des canaux transverses dits de Volkmann assurant l'homéostasie phospho-calcique mais aussi la communication entre le périoste et la moelle osseuse.

L'os compact, qui représente jusqu'à 80% de la masse squelettique, a un rôle mécanique et métabolique important comme nous le suggère sa microstructure.

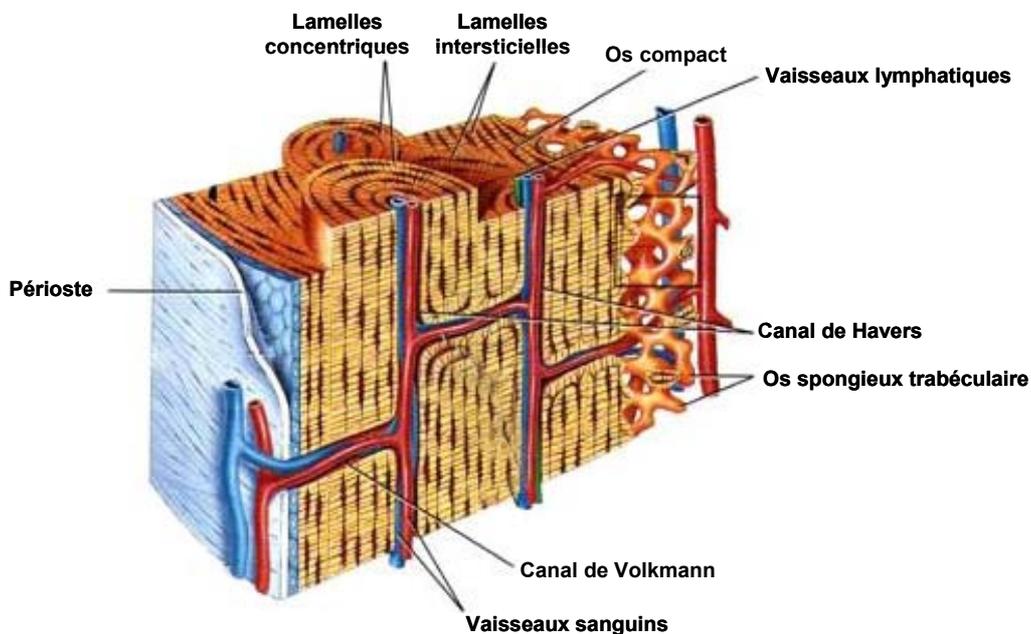


Figure 2 : Représentation schématique d'un os compact.

### **b. Os spongieux**

Il est constitué de trabécules plates ou rondes qui s'entremêlent dans la moelle osseuse. Celle-ci pouvant être jaune (tissu adipeux) ou rouge (hématopoïétique), représente 75 % du volume total de l'os spongieux. De part sa microstructure, l'os spongieux a des échanges particuliers avec la moelle osseuse, d'autant plus que sa surface d'échange est développée. Ceci explique le rôle hématopoïétique de l'os spongieux en fournissant les progéniteurs des différentes lignées sanguines.

## **II. Les composants de l'os**

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

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

Elle peut être subdivisée en matrice organique (22 %) et inorganique (69 %). La teneur en eau, environ 9%, est très variable en fonction de l'âge et du degré de minéralisation.

#### **a. La matrice organique**

La matrice organique représente 22% de la masse osseuse et forme ce que l'on appelle l'ostéoïde ou substance pré-osseuse. Les principales classes de macromolécules qui la composent forment la substance fibrillaire (90 %) contenant des protéines fibreuses structurales (collagène et élastine) ou adhérentes (fibronectine) ainsi que la substance interfibrillaire (10 %) appelée également substance non-collagénique.

##### **α. Le collagène**

Le collagène est la protéine la plus abondante de l'organisme, allant de 30 à 35% des protéines totales chez les Mammifères. Actuellement, 19 types de collagène différents sont décrits dont cinq ont une structure hélicoïdale, chaque type ayant ses particularités

structurales et fonctionnelles. Seul le type I est présent dans l'os, mais on le rencontre également dans d'autres tissus tels que la peau, les tendons, la cornée,...

Le collagène se présente en microscopie électronique sous forme de fibrilles constituées par l'assemblage latéral de fibres de collagène, elles-mêmes faites d'un regroupement de microfibrilles. La séquence primaire du collagène, c'est-à-dire sa composition chimique, contient de 1024 à 1029 acides aminés. Cette structure primaire s'enroule sous forme de deux hélices  $\alpha$  pour constituer la structure secondaire de la protéine. C'est l'assemblage de deux types de protéines (2 chaînes  $\alpha 1$  et 1 chaîne  $\alpha 2$ ) qui donne la structure tertiaire de la molécule (ou tropocollagène) Le collagène est donc constitué de macromolécules hétérodimériques. Enfin, l'association de ces molécules de tropocollagène constitue la structure quaternaire du collagène et forme les microfibrilles (figure 3). Cette protéine, de part sa flexibilité et l'orientation de ces fibres, confère à l'os ses propriétés de résistance à la tension et à l'élongation.

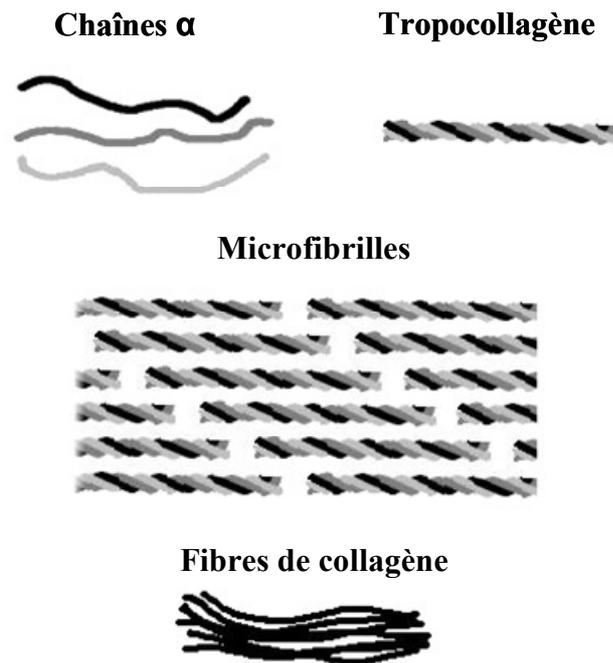


Figure 3 : Schéma des différents stades de formation du collagène.

### B. La substance non-collagénique

Elle est constituée essentiellement d'eau à 80%. Mais elle comprend également des glycosaminoglycanes (GAG) et protéoglycanes, des petites protéines non collagéniques

comme l'ostéopontine, l'ostéonectine, l'ostéocalcine et les sialoprotéines osseuses ainsi que des lipides en petites quantités. Dans le tissu osseux, ces molécules préviennent de la déformation par les forces de contrainte et sont des initiateurs de la minéralisation.

### **b. La matrice inorganique**

L'os est un réservoir métabolique de sels minéraux. Durant la croissance, ils prendront progressivement la place de l'eau au cours de la minéralisation de la substance ostéoïde néoformée. Si l'on traite un fragment d'os avec un acide faible ou des agents chélateurs, les sels minéraux seront éliminés. L'os conserve sa forme et son organisation générale mais devient mou et flexible. Par contre, si l'on extrait la matrice organique, l'os garde sa forme et dans une certaine mesure son organisation, mais il devient cassant comme de la porcelaine (Fawcett, 1994). Les sels minéraux les plus abondants sont le calcium (27 %) et le phosphore (12 %) présents sous forme de cristaux d'hydroxyapatite ( $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ). Les origines du calcium sont multiples : dans le plasma, la concentration globale de calcium est de 10 mg/dL ou 2,5 mM. Le calcium se trouve soit sous une forme non diffusible (40 %) liée à des protéines spécifiques, soit sous une forme diffusible (60%) auquel cas, il sera libre ou complexé. Le calcium libre (5 mg/dL ou 1,5 mM) migre rapidement vers les espaces interstitiels, notamment dans la matrice osseuse, où sa concentration sera sensiblement la même que dans le plasma. Dans le compartiment intracellulaire, la majeure partie du calcium se trouve sous forme liée à des protéines  $\text{Ca}^{2+}$  binding ou est stocké dans des granules mitochondriaux. Le  $\text{Ca}^{2+}$  libre étant cytotoxique, un taux cytoplasmique très bas est maintenu grâce à des symports  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$  et des pompes ATPasiques  $\text{Mg}^{2+} - \text{Ca}^{2+}$ . Le phosphate a, quant à lui, une origine essentiellement plasmatique. Les ions calcium et phosphate se combinent pour former un grand nombre de sels relativement instables au cours de la minéralisation du tissu osseux.

## **2. Les cellules**

### **a. Les ostéoblastes**

Les ostéoblastes sont des cellules ostéoformatrices, responsables de la production des constituants de la matrice osseuse et de sa minéralisation.

### α. Cytologie

L'ostéoblaste mature (figure 4) est une cellule cuboïde, polyédrique ou vésiculeuse, polarisée, dont le noyau est excentré et dont le cytoplasme est rempli d'organites impliqués dans la synthèse et la sécrétion de macromolécules matricielles. L'ostéoblaste est limité par une membrane plasmique classique possédant toutefois quelques modifications structurelles associées à sa polarité cellulaire. En effet, la portion de membrane plasmique adjacente à l'os en développement se trouve hérissée d'un nombre important de processus cytoplasmiques qui peuvent s'étendre profondément entre les fibrilles de collagène de l'ostéoïde. Par contre, la portion de membrane plasmique située au pôle opposé de la cellule, c'est-à-dire celui qui n'est pas en contact avec l'os en formation, possède peu d'expansions.

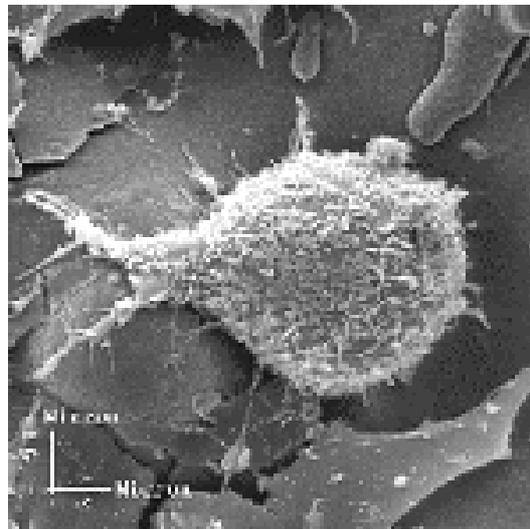


Figure 4 : Ostéoblaste (microcopie électronique).

### β. Origine et différenciation des ostéoblastes

Les ostéoblastes ont pour origine une cellule souche mésenchymateuse présente principalement dans le stroma médullaire, mais que l'on peut retrouver au niveau du périoste et de l'endoste. Ces cellules ostéogéniques du stroma médullaire proviennent de la prolifération clonale de cellules souches pluripotentes pouvant donner naissance à des clones de cellules adipeuses mésenchymateuses ou chondroblastiques après induction par des facteurs hormonaux et locaux. Ceci suggère l'existence d'un précurseur commun aux

chondroblastes, aux ostéoblastes, aux adipocytes, aux myoblastes et aux fibroblastes (Owen, 1988).

La différenciation des précurseurs vers la voie ostéoblastique se caractérise *in vitro* par la succession d'une phase de prolifération cellulaire, associée à l'expression de gènes précoces (oncogènes fos et myc, histone H4), puis d'une phase de maturation cellulaire caractérisée par l'induction de gènes associés à la production de la matrice extracellulaire (phosphatase alcaline, collagène de type 1, TGF  $\beta$ , fibronectine, ostéopontine), puis associés à sa minéralisation (sialoprotéine osseuse, ostéocalcine) (Owen et al., 1990 ; Machwate et al., 1995). De plus, les contacts cellule-cellule entre les ostéoblastes et les interactions entre les cellules et les protéines matricielles sont importants pour l'expression du phénotype ostéoblastique. D'autre part, les protéines non collagéniques jouent un rôle dans l'attraction et l'adhérence cellulaire (la fibronectine et l'ostéopontine, par exemple, favorisent l'adhésion cellulaire) et pourraient ainsi être impliquées dans la régulation de l'activité fonctionnelle des cellules osseuses.

#### $\gamma$ . Marqueurs phénotypiques des ostéoblastes

Leur cytoplasme des ostéoblastes est riche en réticulum endoplasmique granulaire, en mitochondries et présente un appareil de Golgi très développé, démontrant une activité de synthèse très importante. Les cellules préostéoblastiques ont le même aspect morphologique, mais ne montrent pas d'activité de biosynthèse importante. Les ostéoblastes matures, en tant que cellules différenciées, ne se divisent pas. A la fin de leur activité de synthèse, certains ostéoblastes sont englobés dans la matrice, et deviennent des ostéocytes reliés entre eux et aux ostéoblastes par des jonctions cellulaires (Franz-Odenaal et al., 2006). D'autres cellules prennent un aspect aplati le long de la nouvelle matrice et sont dites bordantes.

Les différents marqueurs caractéristiques du phénotype ostéoblastique au cours de la différenciation sont :

- **une activité phosphatase alcaline** : celle-ci est précoce et apparaît dès le stade de précurseur ostéoblastique. Son activité se traduit par l'hydrolyse des pyrophosphates inorganiques, inhibiteurs de la calcification ;
- **une production de collagène de type I et d'ostéopontine** : le collagène forme une trame fibrillaire, qui sera ensuite minéralisée. L'ostéopontine est une phosphoglycoprotéine qui n'est pas spécifique de l'os. Elle comporte une séquence RGD (arginine-glycine-aspartate) et intervient dans la phase d'ancrage des ostéoblastes à la matrice osseuse minéralisée. Son

degré de phosphorylation pourrait moduler la mobilité des ostéoblastes à la surface de la matrice. Lorsqu'elle est phosphorylée, elle inhibe la formation des cristaux d'hydroxyapatite et pourrait donc réguler le processus de minéralisation de la matrice osseuse.

- **la sialoprotéine osseuse et l'ostéocalcine** sont des marqueurs plus tardifs et ne sont exprimés que par les ostéoblastes différenciés. La sialoprotéine osseuse est une phosphoglycoprotéine également synthétisée par les ostéoclastes. Elle a les mêmes effets que l'ostéopontine sur les ostéoclastes, mais par contre favorise, *in vitro*, la formation et la nucléation de cristaux d'hydroxyapatite. L'ostéocalcine est spécifique du tissu osseux et y existe en quantité abondante, représentant 15 à 25 % des protéines non collagéniques de l'os. Elle semble avoir un rôle chimiotactique pour les ostéoclastes et favoriser l'adhésion et l'étalement de ces cellules.

#### δ. Fonction de l'ostéoblaste mature

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

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

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

L'ostéoblaste mature synthétise du collagène de type I, qui forme la majorité de la substance organique osseuse et les molécules de collagène s'assemblent dans le milieu extracellulaire en fibrilles après coupure enzymatique des propeptides C et N terminaux. Un rôle important de la trame collagénique osseuse est de se lier aux protéines non collagéniques et aux facteurs de croissance produits par l'ostéoblaste ; cette liaison assure leur stabilité moléculaire.

##### **- Minéralisation de la matrice**

Le processus de minéralisation du tissu osseux dépend d'une part de la présence d'une structure matricielle extracellulaire, et d'autre part d'une concentration adéquate en minéraux. La minéralisation de la matrice proprement dite se déroule en deux phases :

- 1. *La phase de nucléation* : c'est le passage à l'état solide de substances contenant du calcium et du phosphate, sous forme de granules dans les mitochondries des cellules ostéoformatrices. Ces granules se mêlent dans la cellule aux fibrilles de collagène intracellulaire.

➤ 2. *Phase de maturation* : c'est l'augmentation de taille par accrétion des cristaux de minéraux. La rapidité et l'intensité de cette maturation varient en fonction de la structure et de la composition du cristal.

### **b. Les ostéoclastes**

Les ostéoclastes sont les seules cellules de l'organisme capables de résorber l'os. Ils jouent non seulement un rôle critique dans le développement et le maintien du squelette, mais ils sont également impliqués dans de nombreuses pathologies osseuses telles que l'ostéoporose, les ostéolyses tumorales...

#### **α. Cytologie**

Les ostéoclastes sont des cellules géantes multinucléées contenant le plus souvent de 10 à 20 noyaux (figure 5). Ces cellules sont visibles au fond des lacunes de résorption appelées lacunes de Howship, au contact de la matrice osseuse calcifiée. Une des caractéristiques propres à l'ostéoclaste actif est sa bordure en brosse constituée d'une succession d'expansions et d'invaginations de la membrane cytoplasmique apicale adjacente à la surface osseuse (Suda et al., 1992). Ce domaine membranaire spécifique est formé par la fusion de vésicules intracellulaires acides avec la région de la membrane plasmique qui fait face à la surface calcifiée.

Lorsque les ostéoclastes sont actifs et forment cette bordure en brosse, une zone spécialisée dénommée zone claire est observée. Cette zone, dépourvue d'organites intracellulaires et riche en filaments d'actine, correspond à une région où la membrane plasmique est en contact avec l'os délimitant ainsi un compartiment clos entre la bordure en brosse et la surface osseuse. Le processus de résorption est réalisé dans ce compartiment appelé chambre de résorption (Holtrop et King, 1977).

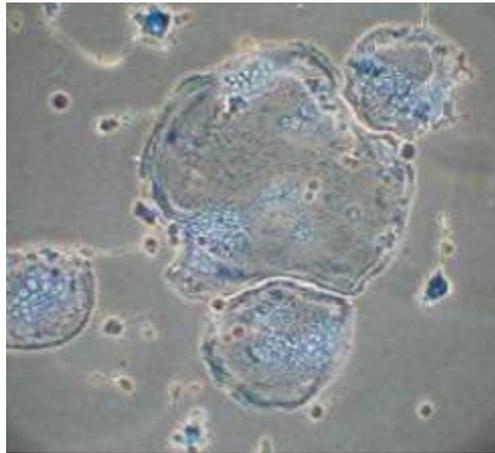


Figure 5 : Ostéoclastes obtenus par différenciation de cellules RAW 264.7 en présence de RANKL (100ng/mL) pendant 5 jours ; coloration au May-Grünwald-Giemsa (grossissement original : x100).

Un grand nombre de lysosomes, de mitochondries, de granules denses et un ou plusieurs appareils de Golgi périnucléaires, sont les principales caractéristiques cytologiques ultrastructurales de l'ostéoclaste. Ils expriment également de nombreux récepteurs à la calcitonine (inhibiteur de la résorption) ainsi qu'à la vitronectine (rôle dans l'adhésion de l'ostéoclaste à son support) et possèdent une importante activité TRAP (Phosphatase Acide Résistante au Tartrate).

### B. Origine et différenciation

Les ostéoclastes se différencient à partir de cellules hématopoïétiques (Hattersley et Chambers, 1989 ; Suda et al., 1992). Cette différenciation comporte plusieurs étapes illustrées dans la figure 6. Les cellules souches hématopoïétiques donnent naissance aux cellules mononucléées circulantes appelées CFU-GM (Colony Forming Unit Granulocyte-Macrophage). Le M-CSF (Macrophage-monocyte Colony Stimulating Factor) stimule la prolifération de ces CFU-GM afin de maintenir un pool de cellules mononucléées appartenant à la lignée monocyte/macrophage, ces cellules étant considérées comme les précurseurs des ostéoclastes et caractérisées par l'absence de deux marqueurs ostéoclastiques, TRAP et le récepteur à la calcitonine (CTR).

Les précurseurs mononucléés sont ensuite attirés vers un site de résorption, par chimiotactisme, puis se fixent à la matrice osseuse pour se différencier, sous l'action de M-CSF et RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand), en ostéoclastes

mononucléés exprimant le CTR et TRAP. Ces cellules, toujours sous l'effet de M-CSF et RANKL, fusionnent pour former des cellules multinucléées qui ne sont pas encore actives et ne développent pas de bordure en brosse. L'activation des ostéoclastes est due à RANKL qui va stimuler la formation de la bordure en brosse (Lacey et al., 1998 ; Suda et al., 1999).

#### γ. Rôle des ostéoblastes dans l'ostéoclastogenèse et dans l'initiation de la résorption

En 1981, Rodan et Martin (Rodan et Martin, 1981) ont émis l'hypothèse selon laquelle la régulation de la résorption osseuse par les hormones ostéotropiques serait médiée par les ostéoblastes. Ils se basaient sur le fait que les ostéoclastes ne semblaient pas avoir de récepteurs à la PTH (hormone parathyroïdienne), à la calcitonine, ni aux autres hormones ostéotropiques alors que les ostéoblastes possédaient de tels récepteurs. Cette hypothèse a cependant été récemment invalidée puisqu'il a été démontré que les ostéoclastes expriment un récepteur à la PTH (Dempster et al., 2005). Des expériences de co-cultures de cellules stromales/ostéoblastes et de cellules spléniques/cellules de moelle osseuse ont par ailleurs permis de mettre en évidence que les ostéoblastes sont nécessaires au développement des ostéoclastes et que les contacts cellule-cellule sont indispensables à leur différenciation et activation (Chambers, 1988 ; Takahashi et al., 1988). Ceci est dû au fait que les ostéoblastes produisent deux facteurs nécessaires et suffisants pour l'ostéoclastogenèse : M-CSF et RANKL (Lacey et al., 1998 ; Yasuda et al., 1998b). Ce contact cellule-cellule est également très important pour la fonction des ostéoclastes matures. En effet, si les cellules ostéoblastiques et les ostéoclastes sont cultivés dans des chambres de culture séparées par une membrane, et que les contacts entre ces cellules sont ainsi bloqués, la formation des lacunes de résorption par les ostéoclastes est fortement diminuée (Jimi et al., 1996).

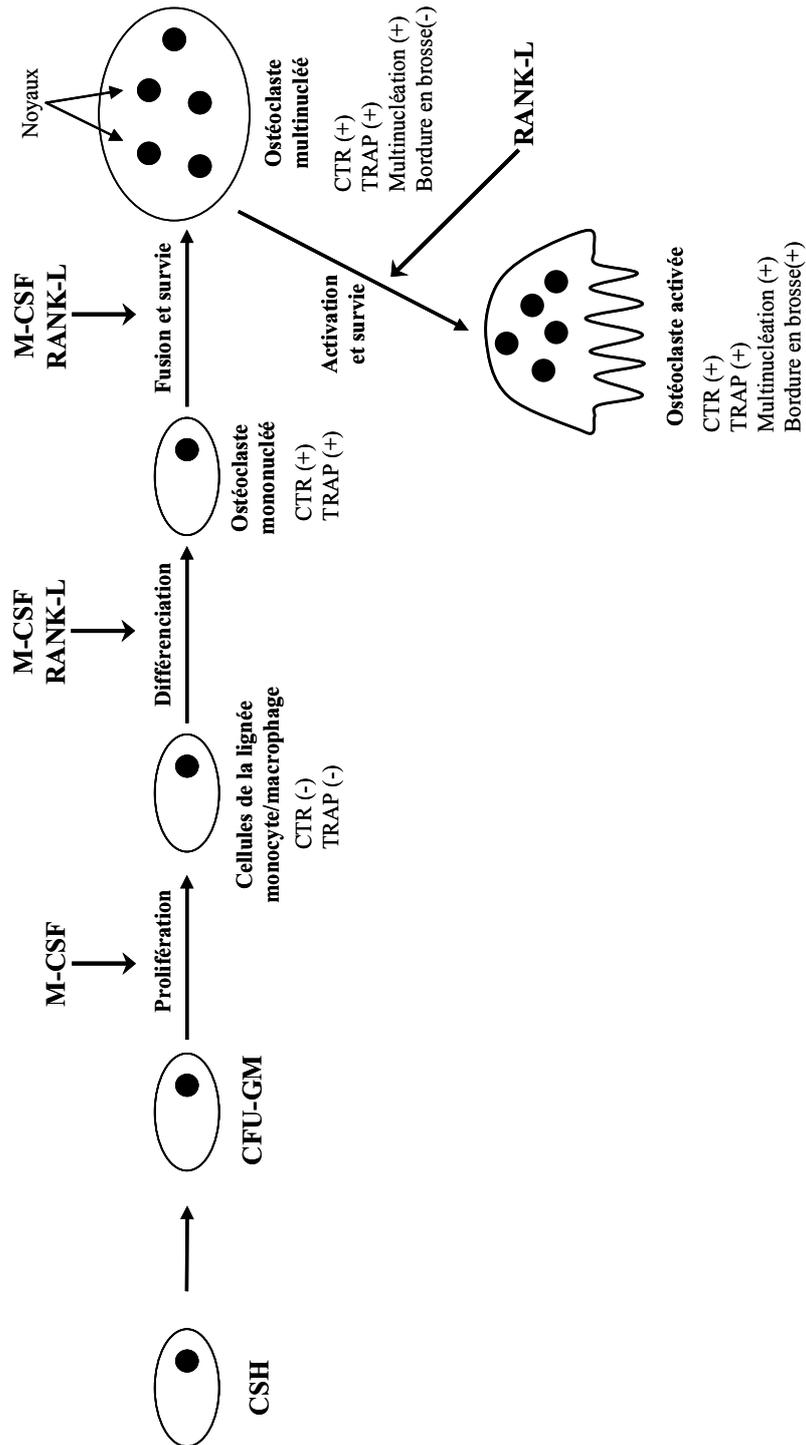


Figure 6 : Voie de différenciation des ostéoclastes (d'après Feng, 2005).

*CSH* : Cellules souches hématopoïétiques ; *CFU-GM* : Colony Forming Unit Granulocyte-Macrophage ; *M-CSF* : Macrophage-Monocyte Colony Stimulating Factor ; *TRAP* : Tartrate Resistant Acide Phosphatase ; *CTR* : Récepteur à la Calcitonine ; *RANKL* : Receptor Activator of Nuclear Factor  $\kappa$ B Ligand

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

#### δ. Fonction : la résorption osseuse

La fonction essentielle des ostéoclastes est la résorption osseuse. Durant la première phase de ce processus une réorganisation du cytosquelette des ostéoclastes est observée : les microfilaments d'actine, de vinculine et de taline s'organisent en anneaux ce qui est indispensable à la formation de la zone claire (Lakkakorpi et Vaananen, 1996). L'activité de résorption dépend alors de la capacité des ostéoclastes à générer, dans la chambre de résorption et grâce à une pompe à protons, un microenvironnement acide nécessaire à la solubilisation de la fraction minérale (figure 7). La digestion de la trame organique s'effectue ensuite sous l'action des enzymes protéolytiques contenues dans les lysosomes.

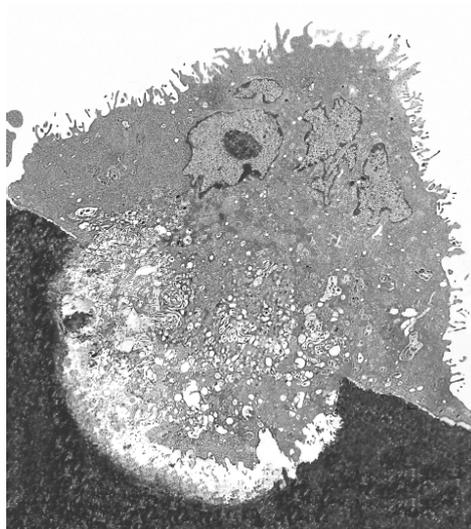


Figure 7 : Ostéoclaste résorbant le tissu osseux.

Lorsque l'ostéoclaste devient actif pour la résorption, la membrane plasmique au contact de l'os s'organise en deux domaines spécialisés : la zone d'ancrage et la bordure plissée. La résorption de la matrice osseuse s'effectue en deux étapes : dissolution de la phase minérale (cristaux d'hydroxyapatite) par acidification du compartiment de résorption puis dégradation de la matrice protéique sous l'action d'enzymes lysosomales (cathepsines) et de collagénases (figure 8).

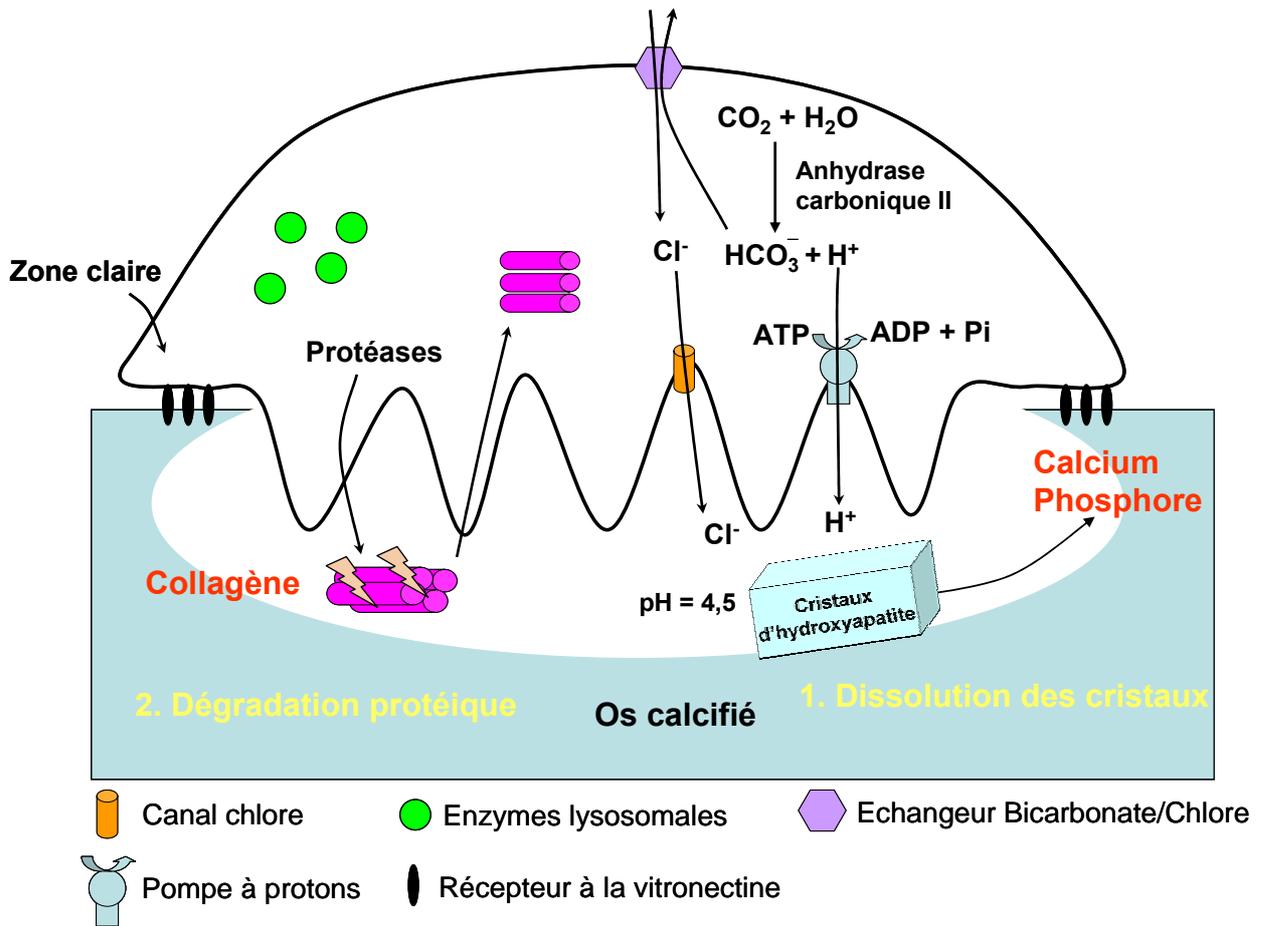


Figure 8 : Schéma d'un ostéoclaste actif (d'après Heymann et Rousselle, 2000).

### **III. Le remodelage osseux**

Le remodelage osseux est un processus complexe qui fait intervenir deux activités opposées mais complémentaires, conduisant au maintien de la masse osseuse : la formation du tissu osseux par les ostéoblastes et sa destruction par les ostéoclastes. C'est ainsi que le squelette se renouvelle de 4% par an pour l'os compact et de 25% pour l'os spongieux. Ce mécanisme permet au tissu osseux de remplir son rôle métabolique (libération de sels minéraux lors de la résorption) et son rôle de soutien (adaptations architecturales aux changements de conditions mécaniques).

Le signal qui déclenche le remodelage osseux peut être de nature mécanique (altération de l'architecture locale de l'os : fracture, prise de poids...) (Turner et Pavalko, 1998) ou hormonal comme c'est le cas dans l'ostéoporose où une diminution du taux d'œstrogène entraîne une augmentation du nombre et de l'activité des ostéoclastes (Pacifci, 1998). Le remodelage en lui-même présente une succession de quatre phases parfaitement définies : activation, résorption, inversion et formation (Hill, 1998) (figure 9).

A l'état quiescent la surface de la matrice extracellulaire de l'os est recouverte par une bordure d'ostéoblastes (cellules bordantes), qui empêchent l'accès de la matrice aux ostéoclastes. Ces cellules bordantes ont une activité métabolique très réduite, mais peuvent se multiplier ou se différencier à nouveau en ostéoblastes fonctionnels sous l'influence de stimuli mécaniques ou moléculaires. Lors de la phase d'activation, sous l'action des facteurs ostéorésorbants [PTH, vitamine D3 et prostaglandine E2,...], les ostéoblastes se rétractent et laissent la place aux précurseurs mononucléés des ostéoclastes, ou pré-ostéoclastes, qui peuvent adhérer à la matrice. Des travaux récents ont également montré que les ostéoclastes matures sont capables de migrer au travers de couches de cellules incluant des lignées de pré-ostéoblastes, de cellules endothéliales ou d'adipocytes (Saltel et al., 2005). Cette transmigration n'a pas encore été observée *in vivo* mais elle pourrait constituer, dans le cadre du remodelage osseux, un mécanisme utilisé par les pré-ostéoclastes pour atteindre la surface osseuse. Les ostéoblastes situés à proximité des pré-ostéoclastes vont alors favoriser leur différenciation en ostéoclastes matures via la production de différentes cytokines dont RANKL qui va interagir avec son récepteur RANK présent à la surface des pré-ostéoclastes.

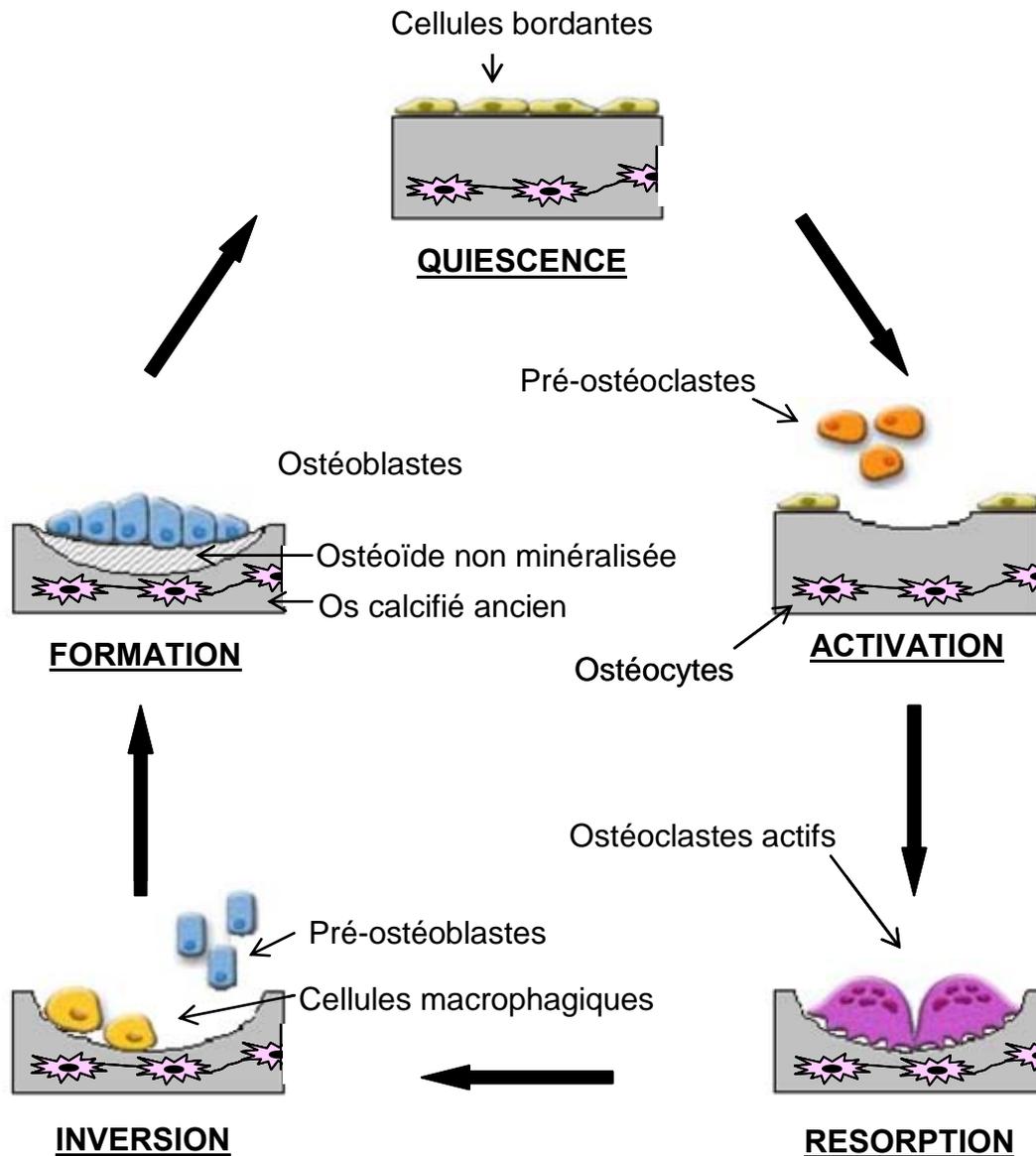


Figure 9 : Les différentes étapes du remodelage osseux.

Débutent alors la phase de résorption. Les pré-ostéoclastes adhèrent à la surface osseuse au niveau de la zone claire puis il y a formation d'une zone de scellement conduisant à la polarisation de la cellule et à la formation de la bordure en brosse. Cette adhérence est assurée par l'interaction entre la matrice organique (notamment la vitronectine) et les intégrines de la membrane ostéoclastique ( $\alpha 2\beta 1$  et  $\alpha V\beta 3$ ). Ces intégrines sont elles-mêmes associées au cytosquelette de l'ostéoclaste (Lakkakorpi et al., 1993). La zone claire délimite ainsi la chambre de résorption dont le pH acide est favorable à la dissolution de la phase minérale de l'os. La matrice organique est ensuite détruite par les enzymes protéolytiques lysosomales déversées dans la chambre de résorption.

Lorsque la profondeur maximale d'érosion est atteinte, la phase d'inversion peut commencer. Les ostéoclastes se détachent de la surface osseuse et meurent par apoptose vraisemblablement médiée par le système Fas/Fas ligand (Wu et al., 2003). Ces ostéoclastes sont alors remplacés par des cellules mononucléées de type macrophagique qui vont éliminer les derniers résidus de matrice présents dans le fond de la lacune.

L'ultime phase de ce cycle est la phase de formation osseuse. Elle est caractérisée par le recrutement des ostéoblastes au fond de la lacune de résorption qu'ils comblent en apposant une nouvelle matrice collagénique non minéralisée (ou ostéoïde) qui sera secondairement minéralisée.

## **2<sup>EME</sup> PARTIE**

### **LES PRINCIPAUX RÉGULATEURS DE LA RÉSORPTION OSSEUSE**

Le remodelage osseux est un processus complexe faisant intervenir deux types cellulaires aux activités opposées mais complémentaires. La maturation et l'activité de ces cellules sont sous la dépendance de facteurs de régulation (hormones, cytokines,...)

## **I. Les facteurs hormonaux**

### **1. La parathormone ou PTH**

Cette hormone peptidique de 84 acides aminés est la principale hormone responsable de l'homéostasie calcique. En effet, une élévation de la concentration plasmatique de PTH stimule la résorption osseuse par activation des ostéoclastes et inhibe l'ostéogenèse par un processus de dédifférenciation des ostéoblastes. Elle provoque également :

- l'augmentation de l'excrétion urinaire de phosphore inorganique,
- la réabsorption tubulaire des ions calcium,
- l'augmentation de l'absorption intestinale de calcium et de phosphore,
- la formation du 1,25-dihydroxycholécalférol par stimulation de 1- $\alpha$ -hydroxylase.

### **2. Le 1,25-dihydroxycholécalférol ou 1,25 DHCC**

C'est le métabolite actif de la vitamine D3 que l'on retrouve dans le jaune d'œuf et l'huile de foie de morue. Cette vitamine peut provenir également de l'irradiation du 7-hydroxycholestérol de la peau.

Cette hormone active le remaniement osseux à savoir l'activité ostéolytique (synergie avec la PTH) sur l'os vieux et l'ostéogenèse par minéralisation de l'ostéoïde. Elle augmente l'absorption intestinale de calcium et de phosphore. Elle favorise la réabsorption rénale de calcium et de phosphore et diminue la sécrétion tubulaire.

### **3. La calcitonine**

Cette protéine de 32 acides aminés est antagoniste de la PTH. Elle est synthétisée par les cellules C contenues dans la thyroïde. La calcitonine inhibe la résorption osseuse en réduisant la durée de vie des ostéoclastes mais par contre stimule l'activité ostéoblastique. Elle diminue la quantité de calcium et de phosphore inorganique circulant.

Tableau I : Récapitulatif de l'action des différentes hormones calciques sur l'os.

	Origine	Rôles
Parathormone	Les glandes parathyroïdes	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Augmentation de la calcémie</li> <li>• Diminution de la phosphatémie</li> <li>• Augmentation du rapport phosphocalcique</li> </ul> <p><b>HYPERCALCEMIANTE</b> <b>HYPOPHOSPHATEMINANTE</b></p>
Calcitonine	Cellules C de la thyroïde	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diminution de la calcémie</li> <li>• Diminution du rapport phosphocalcique</li> </ul> <p><b>HYPOCALCEMIANTE</b></p>
1,25 dihydroxycholécalférol	Alimentation	Augmentation de la calcémie et de la phosphatémie afin que le rapport phosphocalcique soit constant

#### 4. Autres hormones

La thyroïde produit deux hormones principales : la triiodothyronine (T3) et la thyroxine (T4) sont indispensables au développement des os longs. Lors d'une hyperthyroïdie, on observe une hypercalcémie et une accélération du remaniement osseux associée à une diminution de la vitesse de formation osseuse.

Les hormones sexuelles sont également impliquées dans le maintien de la masse osseuse. En effet, la chute du taux d'œstrogène chez la femme et de testostérone chez l'homme a pour conséquence l'augmentation de la résorption osseuse.

Les corticoïdes agissent par diminution de l'absorption intestinale de calcium et hypersécrétion de parathormone. Au long terme, ils inhibent la formation osseuse par arrêt de la synthèse de collagène et diminution de l'activité des phosphatases alcalines.

## II. La triade OPG / RANK / RANKL

La découverte récente en 1997 de l'ostéoprotégérine (OPG) et l'identification consécutive de son ligand RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand) et de RANK ont révolutionné les connaissances sur les mécanismes moléculaires de

régulation du remodelage osseux. Cette triade moléculaire OPG / RANKL / RANK participe activement à l'équilibre entre apposition et résorption en étant l'effecteur final des différents paramètres (cellulaires, hormonaux, moléculaires) qui agissent sur le tissu osseux (figure 10).

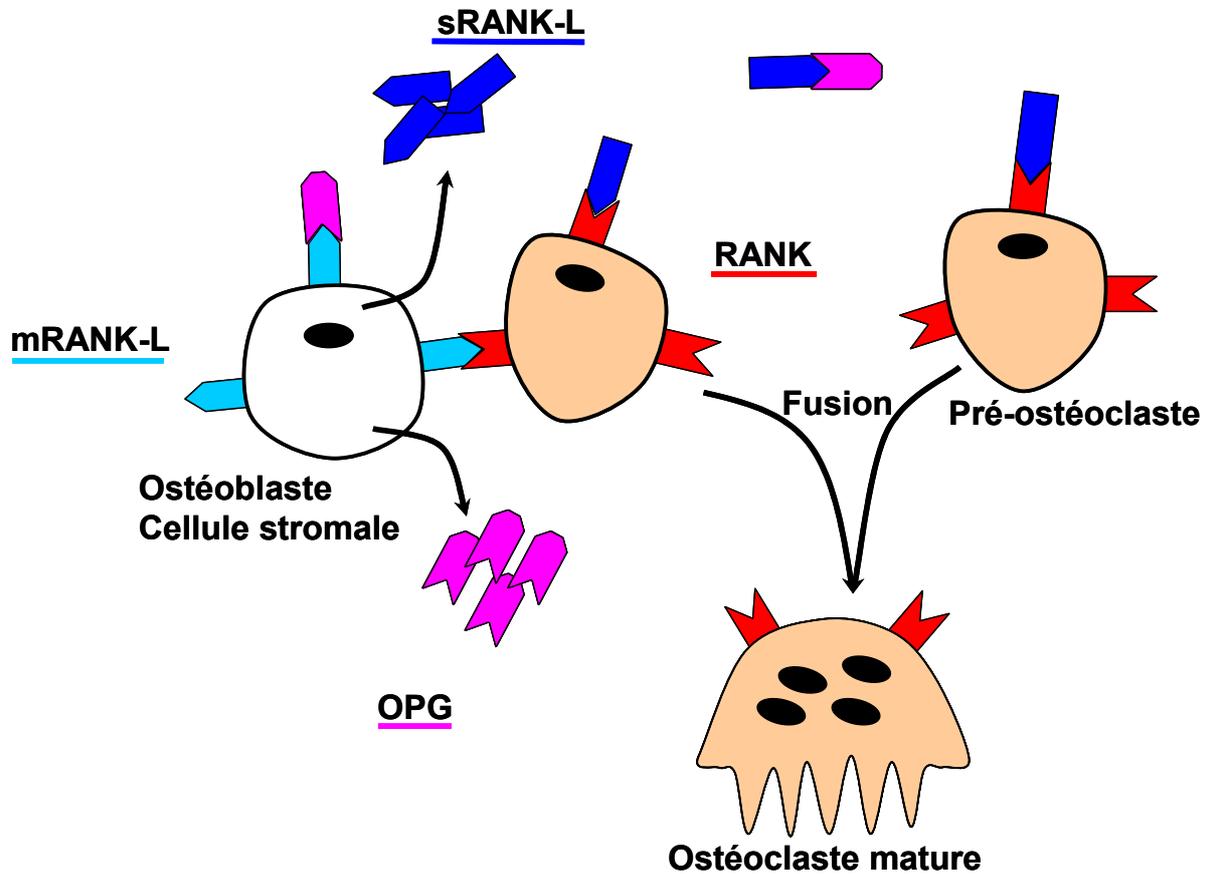


Figure 10 : Implication de la triade OPG / RANKL / RANK dans la différenciation ostéoclastique.

*RANKL* : Receptor Activator of Nuclear Factor  $\kappa$ B Ligand ; m : membranaire ; s : soluble ;  
*RANK* : Receptor Activator of Nuclear Factor  $\kappa$ B ; *OPG* : ostéoprotégérine.

## 1. Ostéoprotégérine (OPG)

L'OPG a été identifiée comme un nouveau membre de la superfamille des récepteurs au TNF (Simonet et al., 1997 ; Yasuda et al., 1998a). L'OPG est une protéine de 380 acides aminés, exprimée de façon prédominante par les cellules stromales de la moelle osseuse



Figure 11 : Structure de l'ostéoprotégérine.

La production de l'OPG est modulée par un très grand nombre de facteurs (tableau II). Parmi eux, on peut citer l'effet stimulateur de la vitamine D3, des estrogènes, du TNF $\alpha$ , du TGF $\beta$  et de l'interleukine-1 (IL-1) (Hofbauer et al., 1998 ; Saika et al., 2001 ; Thirunavukkarasu et al., 2001). La PTH et la prostaglandine E2 ont, au contraire, un effet inhibiteur sur l'expression de l'OPG (Brandstrom et al., 2001 ; Gao et al., 1998 ; Lee et al., 2002). Les glucocorticoïdes diminuent également l'expression d'OPG et sont de ce fait responsables de l'apparition d'ostéoporose chez les patients traités à long terme avec ces molécules (Hofbauer et al., 1999).

Afin d'étudier les fonctions de l'OPG, des souris transgéniques surexprimant l'OPG ont été générées. Ces souris présentent une ostéopétrose sévère accompagnée d'une splénomégalie due à une hématoïèse compensatoire extramédullaire et à un défaut de développement thymique. Une augmentation de l'os trabéculaire minéralisé associée à une diminution du nombre d'ostéoclastes est également observée (Simonet et al., 1997).

Au contraire, les souris invalidées pour l'OPG présentent une ostéoporose et une diminution de la densité minérale osseuse accompagnée de multiples fractures et d'une accentuation du renouvellement osseux (Bucay et al., 1998). Ces phénomènes sont réversibles par l'injection intraveineuse d'OPG recombinante (Min et al., 2000). La présence d'OPG est donc absolument indispensable au maintien de la masse osseuse.

L'OPG fonctionne en réalité comme un récepteur compétiteur de RANK puisqu'elle se fixe à RANKL empêchant ce dernier d'interagir avec RANK. L'OPG inhibe par conséquent

la différenciation et l'activation ostéoclastiques. Un autre ligand de l'OPG a été mis en évidence, il s'agit de TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand). La fixation d'OPG à TRAIL inhibe l'effet apoptotique de TRAIL qui en retour bloque l'activité anti-ostéoclastique de l'OPG (Emery et al., 1998). L'OPG peut enfin interagir avec des molécules de la famille de l'héparine et ce par son domaine de liaison spécifique (Yamaguchi et al., 1998). Il a notamment été montré que l'OPG est capable de se fixer à la surface des cellules de myélome via un protéoglycane, le syndecan-1 (Borset et al., 2000).

## 2. RANKL

RANKL a été identifié par deux groupes de recherche différents, l'un à partir d'une lignée de cellules stromales de la moelle osseuse murine ST2 (Yasuda et al., 1998b), et l'autre à partir de cellules myélomonocytaires murine 32D (Lacey et al., 1998). RANKL est un polypeptide membre de la superfamille du TNF. C'est une protéine transmembranaire de type II (partie N-terminale intracellulaire) sans peptide signal (Hofbauer et al., 2000) (figure 12).

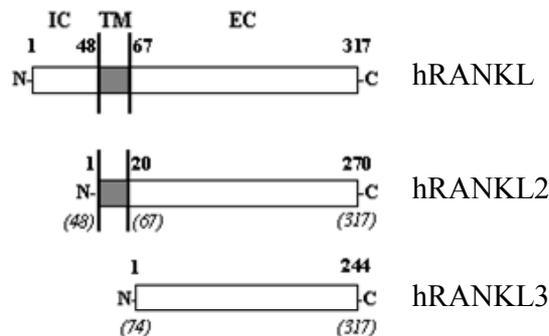


Figure 12 : Caractéristiques structurales de RANKL humain (hRANKL) (Suzuki et al., 2004 ; Theoleyre et al., 2004).

IC : domaine intracellulaire ; TM : domaine transmembranaire ; EC : domaine extracellulaire ; N : extrémité N-terminale ; C : extrémité C-terminale.

RANKL existe sous trois isoformes résultant de l'épissage alternatif d'un même gène (Ikeda et al., 2001 ; Suzuki et al., 2004). L'isoforme RANKL1 correspond à une protéine transmembranaire de 316 acides aminés, possédant un domaine intra-cytoplasmique complet lui permettant d'interagir avec des molécules intracellulaires. A l'inverse, RANKL3 est une protéine soluble de 244 acides aminés, déléetée en N-terminal pour les acides aminés correspondant aux domaines intra-cytoplasmique et transmembranaire de RANKL1.

RANKL est exprimé par un grand nombre de cellules et de tissus. Plus particulièrement, il est fortement présent au niveau du squelette (os, moelle osseuse, cartilage) (Lacey et al., 1998 ; Yasuda et al., 1998b), dans le tissu lymphoïde (ganglions, thymus, rate, foie fœtal) et dans le système vasculaire (Collin-Osdoby et al., 2001).

De la même manière que l'OPG, l'expression de RANKL est régulée par de très nombreux facteurs (tableau II). Notamment, le taux d'ARNm de RANKL est stimulé par la vitamine D3, l'IL-1, l'IL-6, l'IL-11, le TNF $\alpha$ , l'oncostatine M, la PTH et la prostaglandine E2 (Hofbauer et al., 1998 ; Huang et al., 2004 ; Nakashima et al., 2000 ; Palmqvist et al., 2002). A l'opposé, il est inhibé notamment par le TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ) et l'IL-13 (Nakashima et al., 2000).

Pour mieux comprendre les effets biologiques de RANKL, des souris ont été invalidées pour ce gène. Ces souris présentent une ostéopétrose sévère associée à une absence totale d'ostéoclastes due à l'incapacité des ostéoblastes à supporter l'ostéoclastogenèse, induisant une augmentation de la densité minérale osseuse et une hématopoïèse compensatoire extramédullaire (Kong et al., 1999b). Ces résultats mettent en évidence le rôle clé de RANKL dans la résorption osseuse. En effet, *in vitro*, RANKL en se fixant à son récepteur RANK présent à la surface des pré-ostéoclastes (Nakagawa et al., 1998) induit, en présence de M-CSF, leur différenciation en ostéoclastes (Lacey et al., 1998). RANKL est en outre un facteur de survie des ostéoclastes matures (Fuller et al., 1998 ; Wong et al., 1999).

Tableau II : Facteurs influençant l'expression d'OPG et de RANKL.

(+) expression augmentée ; (-) expression diminuée ; (=) pas de modulation.

	OPG	RANKL
Vitamine D3	+	+
PTH	-	+
Estrogène	+	=
IL-1	+	+
IL-6	+	+
IL-11	+	+
IL-13	+	-
IL-17	-	+
TNF $\alpha$	+	+
Interféron $\gamma$	+	+
Leukemia inhibitory factor	+	+
Oncostatine M	+	+
BMP-2	+	
TGF $\beta$	+	-
Glucocorticoïdes	-	+
Dexaméthasone	-	+
Prostaglandine E2	-	+
Calcium	+	+
IGF-1	-	+
Rapamycine	-	+
Ciclosporine A	-	+
Tacrolimus	-	+
Ionomycine	-	+
Vasoactive Intestinal Peptide	+	-
Indian Hedgehog	-	+
LPS	+	=

### 3. RANK

RANK appartient à la famille des récepteurs au TNF. C'est une protéine transmembranaire de type I (partie N-terminale extracellulaire) de 616 acides aminés possédant un peptide signal (Anderson et al., 1997) et qui est présentée à la membrane sous forme de trimère. Le domaine extracellulaire de RANK contient 4 motifs riches en cystéine et deux sites de N-glycosylation (Hofbauer et al., 2000) (figure 13). RANK, le récepteur de RANKL, est présent à la surface des précurseurs ostéoclastiques ou des ostéoclastes matures, des lymphocytes T et des cellules dendritiques.

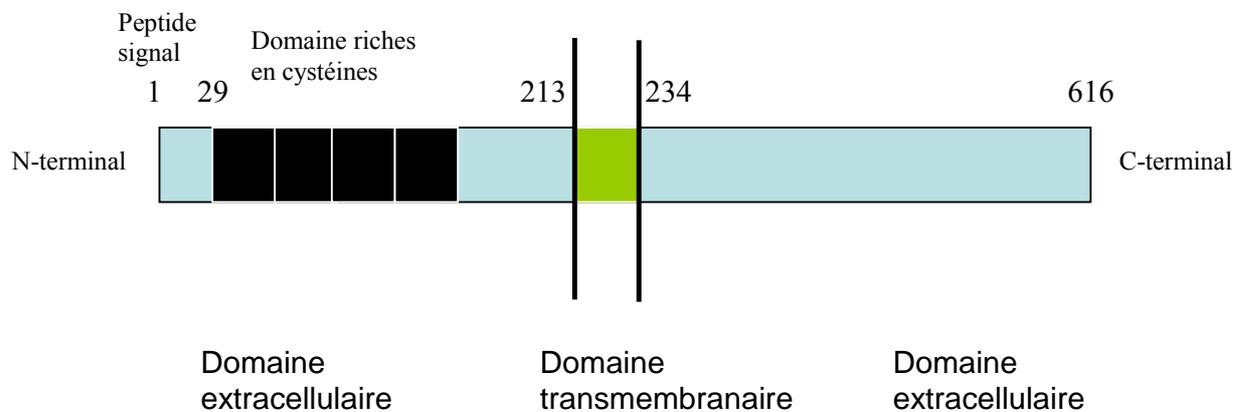


Figure 13 : Structure de RANK.

L'expression des ARNm de RANK a été détectée dans différents tissus comme le muscle squelettique, la peau, le cerveau, les poumons, le foie (Anderson et al., 1997 ; Min et al., 2003 ; Nakagawa et al., 1998). L'expression de RANK peut-être stimulée par le CD40-Ligand sur les cellules dendritiques et par l'engagement du TCR associée au TGF $\beta$  et à l'IL-4 sur les lymphocytes T. Par contre, son expression sur les pré-ostéoclastes et les ostéoclastes matures ne semble pas régulée par les principaux agents ostéotropiques.

L'inactivation du gène RANK chez des souris (RANK  $-/-$ ) a permis de mettre en évidence les différentes activités biologiques de ce récepteur. Ces animaux présentent une ostéopétrose sévère associée à un déficit en ostéoclastes matures tout comme les souris délétées pour le gène de RANKL (Li et al., 2000). Différentes études ont montré que RANKL se lie spécifiquement à RANK à la surface des pré-ostéoclastes avec une affinité de 3 nM et que cette liaison entraîne l'activation de RANK indispensable à l'ostéoclastogenèse

(Hsu et al., 1999 ; Nakagawa et al., 1998). Ces souris RANK<sup>-/-</sup> présentent également une absence de ganglions lymphoïdes et un défaut de maturation des lymphocytes B et T alors qu'elles ont un développement thymique normal contrairement aux souris RANKL<sup>-/-</sup> (Li et al., 2000).

Des souris transgéniques exprimant la protéine de fusion soluble RANK-Fc présentent quant à elles un phénotype squelettique similaire à celui des souris transgéniques pour l'OPG c'est-à-dire, une diminution de l'ostéoclastogenèse et de la résorption osseuse, et une ostéopétrose (Hsu et al., 1999).

L'ensemble de ces études montre donc que la fixation de RANKL à RANK induit la transduction d'un signal conduisant notamment à la différenciation des précurseurs ostéoclastiques et à l'activation des ostéoclastes (figure 14).

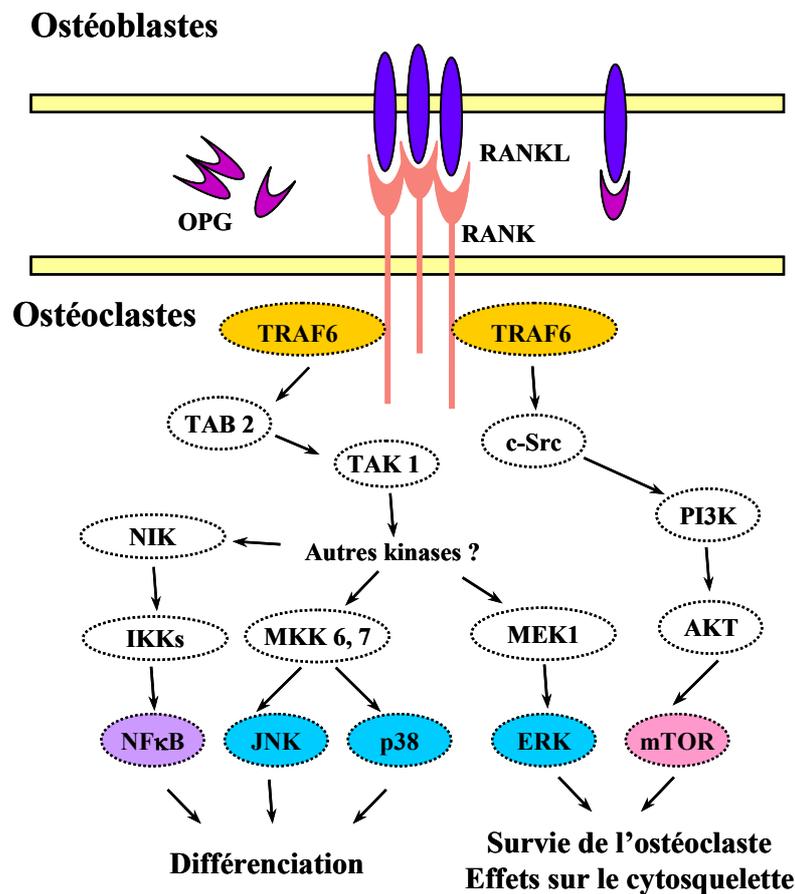


Figure 14 : Schéma de la signalisation RANK / RANKL dans l'ostéoclaste (d'après Theoleyre et al., 2004).

### **III. Autres cytokines induisant une différenciation ostéoclastique**

Certaines molécules, sécrétées par les cellules du microenvironnement osseux (cellules stromales, lymphocytes, ...) peuvent également induire la différenciation ostéoclastique et ce, de manière indépendante de RANKL. C'est le cas du TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor alpha). En effet, cette molécule peut, en présence de M-CSF, stimuler la formation d'ostéoclastes via un mécanisme impliquant les deux récepteurs spécifiques du TNF, TNFR1 et TNFR2, mais ne faisant pas intervenir RANKL (Azuma et al., 2000 ; Kobayashi et al., 2000). Les ostéoclastes ainsi formés sont capables de résorber l'os en présence d'interleukine-1 (IL-1). L'IL-1 peut elle aussi avoir un rôle indépendant de RANKL dans l'ostéoclastogenèse, en induisant directement la multinucléation de pré-ostéoclastes via son récepteur spécifique IL-1R1 (Jimi et al., 1999). L'interleukine-6 (IL-6) et l'interleukine-11 (IL-11) peuvent, en présence de M-CSF, stimuler la formation d'ostéoclastes à partir de monocytes CD14<sup>+</sup> du sang périphérique et ce, indépendamment de RANKL (Kudo et al., 2003).

#### **1. M-CSF et ostéoclastogenèse**

Le M-CSF est bien plus qu'un simple facteur de croissance hématopoïétique. Il s'agit d'une cytokine active sur beaucoup d'autres cellules et tissus, notamment le tissu osseux. En effet, dans les différents modèles de différenciation ostéoclastique (cellules de moelles osseuses, co-culture ostéoblastes/cellules de moelle osseuse), il est nécessaire d'ajouter du M-CSF en plus du RANKL. Le rôle majeur du M-CSF dans l'ostéoclastogenèse a été mis en évidence chez des souris op/op (Kodama et al., 1991). Ces souris présentent une mutation non-sens du M-CSF, entraînant l'absence de M-CSF biologiquement actif. Il en résulte une ostéopétrose congénitale.

#### **2. TNF $\alpha$ et ostéoclastogenèse**

Le TNF $\alpha$  a un rôle important et central dans la physiopathologie de la résorption osseuse. La balance résorption/formation nécessaire au maintien de l'homéostasie de l'os est modifiée par de fortes concentrations de TNF $\alpha$  rencontrées dans les processus inflammatoires aigus et chroniques (Maladie de Crohn, polyarthrite rhumatoïde pour revue Nanes, 2003) L'augmentation de production de TNF $\alpha$ , particulièrement chez les femmes ménopausées,

cause des dommages osseux en augmentant la résorption osseuse tout en inhibant la formation de l'os par les ostéoblastes (Pacifci, 1996).

### **3. IL-6 et ostéoclastogenèse**

L'IL-6 est une glycoprotéine de 184 acides aminés, comprenant 4 hélices  $\alpha$  (figure 15). Elle est produite par de nombreuses cellules après activation : monocytes/macrophages, lymphocytes T, cellules NK, fibroblastes, progéniteurs hématopoïétiques,... L'IL-6 est souvent produite sous l'effet d'autres cytokines. Ainsi, l'IL-1 et le TNF $\alpha$  induisent la production d'IL-6 par les monocytes/macrophages, les cellules endothéliales et les fibroblastes. L'IL-6 appartient à la famille des cytokines du type IL-6 qui comprend également l'IL-11, le LIF (Leukaemia Inhibitory Factor), l'oncostatine M (OSM), le CNTF (Ciliary Neurotrophic Factor), la cardiotrophine 1 (CT-1) et la cytokine cardiotrophine-like (CLC).

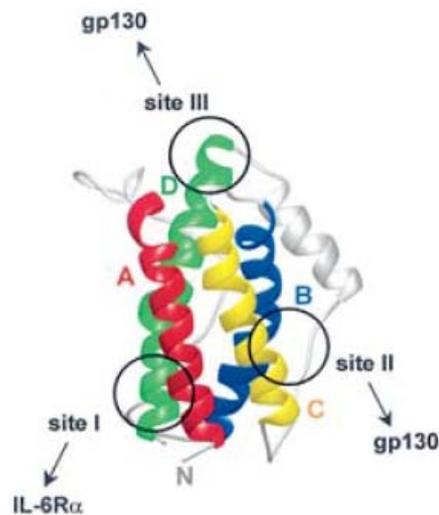


Figure 15 : Structure de l'IL-6.

Les 4 hélices  $\alpha$  sont représentées dans différentes couleurs. Les sites de liaison aux récepteurs sont indiqués par les cercles (d'après Heinrich et al., 2003).

Ils activent des gènes impliqués dans la différenciation, la survie, l'apoptose et la prolifération notamment dans le tissu osseux (Heymann et Rousselle, 2000). Ces cytokines utilisent la même sous-unité réceptrice, la glycoprotéine gp130, pour initier le signal dans la cellule, ce qui explique en partie la redondance fonctionnelle de ces molécules. Les signaux de transduction aboutissent à l'activation des facteurs de transcription de la famille STAT

(Signal Transducers and Activators of Transcription) et à l'activation de la cascade MAPKinase (Mitogen-Activated Protein Kinase) (figure 16).

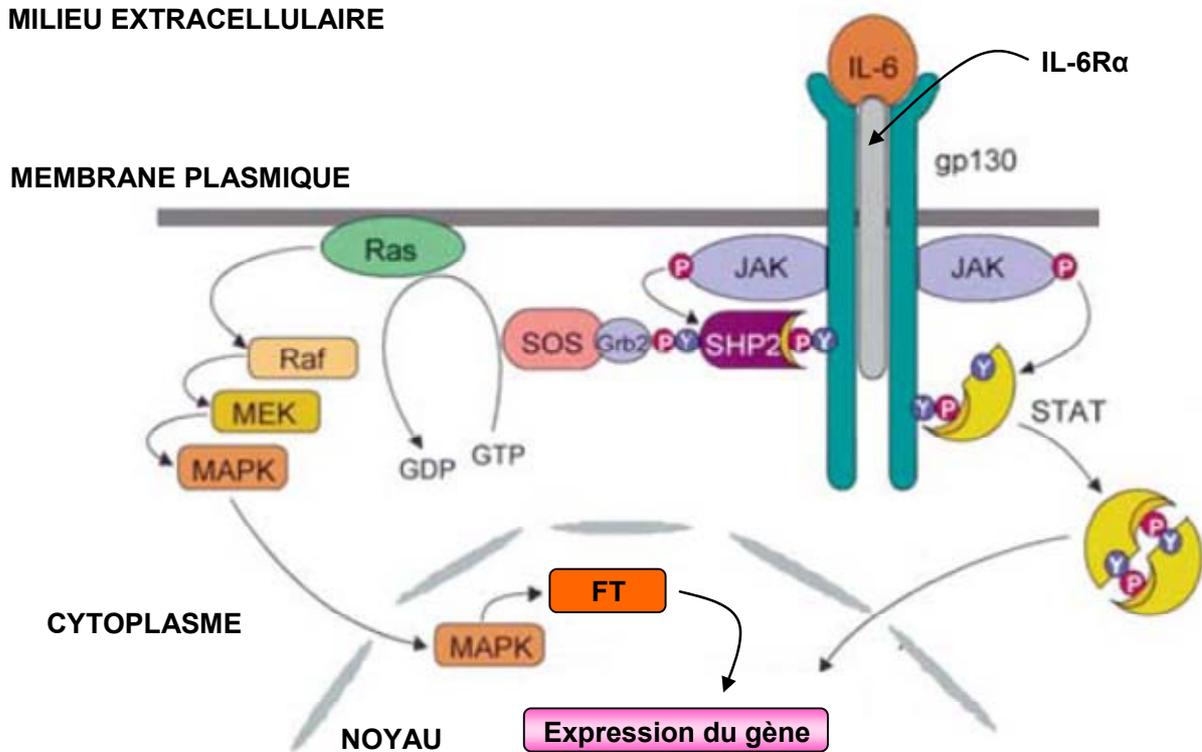


Figure 16 : Schéma de la signalisation de l'IL-6. L'IL-6 active la voie JAK/STAT et la cascade des MAPKinases (d'après Heinrich et al., 2003). FT : Facteur de transcription.

L'IL-6 est souvent impliquée dans la perte osseuse associée à certaines pathologies (Kwan Tat et al., 2004). Ainsi, des expériences ont montré que la perte osseuse qui a lieu dans l'ostéoporose post-ménopausique est due à une augmentation d'expression de l'IL-6 par les cellules stromales et les ostéoblastes (Girasole et al., 1992 ; Manolagas et Jilka, 1995). De plus, un taux élevé d'IL-6 a été mis en évidence dans des conditions où la perte osseuse est importante, comme dans la maladie de Paget (Roodman, 2001), les myélomes multiples (Klein et al., 1990), la polyarthrite rhumatoïde (Kotake et al., 1996) et l'hyperparathyroïdisme (Grey et al., 1996).

Cependant, l'effet direct de l'IL-6 sur l'ostéoclastogenèse est controversé selon les auteurs et selon le modèle d'étude employé. Ainsi, la différenciation en ostéoclastes de cellules de la moelle osseuse de souris est possible avec l'IL-6, à condition d'être couplée à

son récepteur soluble sIL-6R (Tamura et al., 1993). La même conclusion a été obtenue récemment par l'équipe de Palmqvist (Palmqvist et al., 2002) dans des cultures de cellules issues de la calvaria de souriceaux nouveau-nés. La présence du récepteur soluble de l'IL-6 est également indispensable pour induire la différenciation des cellules de moelle osseuse en culture avec des ostéoblastes et l'IL-6 (Udagawa et al., 1995). Pourtant, chez des souris transgéniques pour l'IL-6 humaine, des analyses histomorphométriques ont montré une diminution du nombre d'ostéoclastes et de la résorption osseuse (Kitamura et al., 1995).

## **3<sup>EME</sup> PARTIE**

### **LES PATHOLOGIES OSTÉO-ARTICULAIRES**

Comme tous les tissus, le système ostéoarticulaire est le siège de dérégulations conduisant à l'apparition de diverses pathologies. En effet, le maintien de l'architecture osseuse repose sur un équilibre entre deux mécanismes fondamentaux, la résorption osseuse et la formation osseuse, toute modification de cet équilibre étant à l'origine du développement de pathologies ostéo-condensantes, ostéolytiques, bénignes ou malignes.

## **I. Pathologies non tumorales**

### **1. Les pathologies ostéo-condensantes**

Parmi les non tumorales, l'ostéopétrose et la pycnodysostose sont les plus fréquentes. Dans ces maladies, la balance du remodelage osseux est déséquilibrée en faveur de la formation osseuse. Une des causes de ce défaut de résorption est la non expression d'une enzyme protéolytique majeure : la cathepsine K (Motyckova et al., 2001 ; Saftig et al., 1998). La dégradation de la matrice collagénique est diminuée, le processus de résorption est alors incomplet et l'apposition osseuse s'effectue par empilement, et non par comblement, de la lacune de résorption. Il en résulte une hypertrophie osseuse généralement bénigne mais la formation d'un tissu osseux de qualité médiocre.

Les pathologies ostéo-condensantes représentent cependant une faible proportion des pathologies associées à un défaut du remodelage osseux. D'une manière générale, lorsque que la balance apposition/résorption est affectée, celle-ci est déséquilibrée en faveur de la résorption, conduisant à l'apparition de lésions osseuses (Eilon et Mundy, 1978 ; Guise et Mundy, 1998 ; Weber et al., 2000). Les pathologies ostéolytiques non tumorales sont d'origine variée mais présentent toutes une dérégulation directe ou induite du système OPG / RANKL / RANK, conduisant soit à une diminution de l'expression de l'OPG soit à une augmentation de l'expression de RANKL (Grimaud et al., 2003). La plus fréquente de ces affections est l'ostéoporose.

### **2. Les pathologies ostéo-lytiques**

L'incidence de l'ostéoporose est en constante augmentation depuis une cinquantaine d'années en raison du vieillissement de la population (Dupuy, 2000). Le risque de fracture, chez une femme, de 50 ans jusqu'à sa mort, est de 44 %. Les fractures se répartissent

essentiellement sur les trois sites osseux suivants : l'extrémité supérieure du fémur (19 %), les vertèbres (fracture ou tassement : 16 %), le poignet (14 %). On estime en moyenne à 50.000 le nombre de nouveaux cas de fractures de l'extrémité supérieure du fémur (FESF) tous les ans en France, chiffre qui devrait tripler d'ici 50 ans. C'est une maladie systémique du squelette caractérisée par une masse osseuse basse et une détérioration de l'architecture osseuse ayant pour conséquence une fragilité accrue pouvant conduire à ces fractures. Cette perte du capital osseux résulte de la diminution de l'expression de l'OPG, elle-même consécutive à une chute du taux d'œstrogène. Une autre perturbation du métabolisme osseux est retrouvée dans la maladie de Paget qui est une ostéopathie disséminée caractérisée par un remodelage osseux intense et anarchique à l'origine d'un tissu osseux immature et par la présence d'ostéoclastes géants.

La présence d'événements inflammatoires ou de facteurs pro-inflammatoires contribue également à la création d'un contexte favorable à la résorption osseuse. Ainsi, les maladies inflammatoires du tissu osseux telles que les spondylarthropathies, les ostéites ou encore la polyarthrite rhumatoïde entraîne la dégradation osseuse. La stimulation de l'activité ostéoclastique est majoritairement indirecte et s'effectue dans un contexte cytokinique pro-inflammatoire à l'origine de l'induction de l'expression de RANKL (Kong et al., 1999a ; Nakashima et al., 2003).

## **II. Pathologies tumorales**

### **1. Tumeurs primitives**

Les tumeurs primitives de l'os sont issues de la transformation carcinogène de cellules osseuses. Le point de départ de la tumeur est le tissu osseux lui-même. Cette transformation tumorale peut être soit bénigne soit maligne et, exception faite de l'ostéome ostéoïde et de l'ostéoblastome, aboutit essentiellement à l'apparition de plages ostéolytiques.

#### **a. Tumeur à cellules géantes**

Les tumeurs à cellules géantes (TCG) sont des lésions ostéolytiques pourvues d'une abondante vascularisation et constituées d'un double contingent cellulaire, des cellules géantes et des cellules stromales (cellules fibroblastiques et macrophagiques) (Encyclopédie

Médico-Chirurgicale, 14-772). Dans la majorité des cas (90%) les TCG sont bénignes mais il existe aussi des formes malignes qui représentent 2 à 5% des tumeurs malignes primitives de l'os. Cette tumeur, même lorsqu'elle est bénigne, récidive fréquemment ce qui pose d'importants problèmes cliniques. La majorité des TCG s'observe entre 20 et 40 ans. Elles sont surtout localisées aux extrémités des os longs des membres, au niveau épiphysométaphysaire, mais les os plats et courts peuvent également être atteints. La TCG peut donner lieu à l'apparition de métastases avec une localisation essentiellement pulmonaire. Plusieurs classifications des TCG ont été réalisées, permettant de définir la TCG de degré I, bénigne et de forme non agressive, la TCG de degré II, bénigne et de forme agressive, et la TCG de degré III, maligne et de forme active. Le traitement des TCG est avant tout chirurgical mais dans les cas de tumeurs malignes il est associé à la chimiothérapie.

### **b. Ostéosarcome**

L'ostéosarcome est une tumeur maligne caractérisée par la formation directe de tissu osseux ou ostéoïde par les cellules tumorales (Encyclopédie Médico-Chirurgicale, 14-704 ; Whelan, 1997). C'est une tumeur rare puisque le nombre de nouveaux cas par an en France est estimé entre 200 et 250. Malgré ces chiffres, l'ostéosarcome représente la tumeur osseuse maligne primitive la plus fréquente (environ 50%). Il survient plus généralement sur une population jeune, avec une médiane d'âge de 18 ans, et touche 1,5 à 2 fois plus fréquemment les garçons que les filles.

L'étiologie de l'ostéosarcome est à ce jour inconnue. Si de nombreuses théories ont été émises à partir de constatations expérimentales (origine virale, traumatique, chimique, etc.), aucune n'a reçu de confirmation chez l'homme. Cependant, il est plus fréquemment rencontré après irradiation ou suite au développement de tumeurs préexistantes ou bien de maladie osseuse sous-jacente comme la maladie de Paget pour laquelle, l'ostéosarcome apparaît suite à une modification pathologique du remodelage osseux (Hansen et al., 1999).

Cette tumeur est surtout localisée au niveau du genou et de l'épaule avec une atteinte presque toujours métaphysaire des os longs (Encyclopédie Médico-Chirurgicale, 14-704). Il existe aussi des ostéosarcomes du tronc et du crâne mais extrêmement rarement des pieds et des mains. La présence de métastases est parfois rencontrée avec un essaimage métastatique qui se fait principalement par voie hématogène, le poumon étant la cible préférentielle, mais le cerveau, le foie et d'autres os sont parfois atteints.

Le traitement actuel de l'ostéosarcome consiste en une résection chirurgicale de la tumeur associée à une chimiothérapie. L'amputation est parfois nécessaire pour les tumeurs volumineuses ayant largement envahie les parties molles, ou pour une lésion en récurrence. La chimiothérapie repose sur des cures alternées combinant différents produits dont les principaux sont le méthotrexate à hautes doses, l'ifosfamide, la doxorubicine et le cisplatine (Bacci et al., 2003). Cette prise en charge a permis d'améliorer nettement le taux de survie des patients qui atteint 70% à 5 ans (Vassal, 2002), cependant la présence de métastases lors du diagnostic réduit ce taux de survie à 30% à 5 ans.

### *c. Sarcome d'Ewing*

Le sarcome d'Ewing se définit comme une tumeur primitive maligne du tissu osseux. avec un développement, souvent important dans les parties molles, d'amas de petites cellules rondes sans différenciation cellulaire (Encyclopédie Médico-Chirurgicale, 14-756.). Il s'agit aussi d'une lésion lytique agressive avec apparition de métastases à distance, pulmonaires et osseuses. Le sarcome d'Ewing touche surtout les enfants ou les adolescents et il est rare chez l'adulte après 30 ans. Environ 80 % des cas surviennent dans la seconde décennie et les garçons sont plus souvent atteints que les filles, avec un sex-ratio d'environ 6 pour 4. Le sarcome d'Ewing peut atteindre tous les os du squelette, avec une légère préférence pour les os longs, touchés dans 50 à 60 % des cas. Dans ce cas il s'agit généralement d'une atteinte métaphysaire. Des sarcomes d'Ewing des parties molles sans aucune connexion squelettique peuvent exister, ainsi que des sarcomes d'Ewing de la peau (Ahmad et al., 1999). Le traitement actuel du sarcome d'Ewing associe la chimiothérapie et la chirurgie ainsi qu'éventuellement la radiothérapie.

### *d. Chondrosarcome*

Le chondrosarcome est une tumeur maligne primitive de l'os produisant du cartilage tumoral (Encyclopédie Médico-Chirurgicale, 14-716). Il peut être secondaire dans 10% des cas se développant sur une lésion préexistante telle un chondrome (tumeur cartilagineuse bénigne) ou une exostose ostéogène (excroissance osseuse). En fréquence il représente la deuxième grande tumeur maligne primitive du squelette. Le chondrosarcome peut survenir à tout âge mais s'observe essentiellement à partir de trente ans. Si tout le squelette peut être

atteint, les sites le plus fréquemment concernés sont le pelvis et le fémur proximal. Le chondrosarcome évolue toujours sans essaimage ganglionnaire mais, par voie hématogène, il peut donner des métastases, principalement pulmonaires. Concernant les traitements, la radiothérapie est inefficace sur les tumeurs cartilagineuses et la chimiothérapie n'a jusqu'à présent pas fait la preuve de son intérêt, tant sur la tumeur primitive que sur les métastases. La chirurgie reste donc la seule possibilité thérapeutique. Les interventions limitées sont à rejeter en raison des nombreuses récurrences locales, seules doivent être envisagées la résection et l'amputation. Dépisté tôt, et bien traité, son pronostic est de 70% de survie.

## **2. Tumeurs secondaires**

Les tumeurs osseuses secondaires sont représentées par les métastases osseuses. Elles sont issues de la dissémination métastatique d'une tumeur primaire développée à partir d'un tissu différent de l'os. Cette dissémination se fait par voie sanguine ou parfois lymphatique. L'os est un endroit privilégié pour la migration et la multiplication des cellules cancéreuses métastatiques (Guise et Mundy, 1998). En effet, l'importance de la vascularisation de la trame osseuse et l'existence en son sein de la moelle osseuse, intense centre de multiplication cellulaire, jouent un rôle important pour expliquer la fréquence d'apparition des ces métastases qui sont les tumeurs osseuses les plus fréquentes de l'adulte. L'étiologie principale des métastases osseuses est le cancer du sein, viennent ensuite les tumeurs prostatiques. Les tumeurs broncho-pulmonaires, rénales, thyroïdiennes sont également des points de départ de métastases osseuses, de même que de nombreuses autres tumeurs (digestives, gynécologiques, ORL...). Ces métastases osseuses sont généralement ostéolytiques (cas des métastases d'origine mammaire, thyroïdienne, rénale...), mais elles peuvent également être ostéocondensantes (cas des métastases d'origine prostatique). Le pronostic des métastases osseuses est très variable. Si les traitements, basés essentiellement sur la chimiothérapie et la radiothérapie, peuvent permettre d'obtenir une survie prolongée et un bon résultat immédiat, le taux de guérison des cancers métastasés à l'os est faible.

### **III. Nouvelles approches thérapeutiques**

Comme nous venons de le voir, les pathologies cancéreuses osseuses primitives et les cellules cancéreuses qui métastasent en site osseux sont responsables d'une morbidité importante. Le traitement actuel, basé sur une chimiothérapie néo-adjuvante et une exérèse totale de la tumeur, a largement contribué à l'amélioration du taux de survie des patients mais une absence de réponse aux drogues anti-tumorales est souvent observée ce qui conduit au développement de métastases puis au décès du patient. Il devient donc nécessaire de développer d'autres voies thérapeutiques.

#### **1. Potentiel thérapeutique de la triade OPG / RANKL / RANK**

L'invasion du tissu osseux par une tumeur bénigne ou maligne, primaire ou secondaire, affecte rapidement la balance entre l'apposition et la résorption osseuse. En effet, dans la plupart des cas, la manifestation de la malignité de la tumeur osseuse se caractérise par une ostéolyse associée au développement tumoral. Or, la balance apposition/résorption est essentiellement régulée par la triade moléculaire OPG / RANKL / RANK. Ce système est décrit comme dérégulé dans plusieurs pathologies ostéolytiques d'origine tumorale dont le myélome multiple (Giuliani et al., 2001 ; Grimaud et al., 2003). En effet, l'augmentation de l'expression de RANKL, directement par les cellules tumorales ou indirectement par les cellules stromales ou les lymphocytes T, joue un rôle prépondérant dans la destruction osseuse consécutive à cette affection. A l'inverse, la production endogène d'OPG est soit inhibée soit trop faible pour compenser l'augmentation de l'expression de RANKL. Le rapport RANKL / OPG est ainsi considéré comme un index pronostic potentiel pour le myélome (Terpos et al., 2003). Par conséquent, la triade OPG / RANKL / RANK pourrait devenir une cible moléculaire privilégiée pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques dans le cas d'ostéolyses d'origine tumorale mais également non tumorale. Dans certains modèles animaux de tumeurs malignes, l'utilisation thérapeutique d'OPG a permis à la fois de contrôler l'hypercalcémie maligne et l'apparition ou la progression de métastases osseuses (Capparelli et al., 2000 ; Luger et al., 2001). Actuellement, une seule étude de phase I utilisant de l'OPG recombinante a été publiée dans le cas d'ostéolyses tumorales et a confirmé l'inhibition de la résorption osseuse chez des patients atteints de myélome multiple ou de cancer mammaire présentant des lésions osseuses (Body et al.,

2003). L'utilisation de la construction recombinante RANK-Fc offre également des possibilités thérapeutiques prometteuses compte tenu des résultats obtenus dans des modèles animaux de carcinome prostatique et de myélome multiple (Sordillo et Pearse, 2003 ; Zhang et al., 2003). Enfin, des essais cliniques portant sur l'utilisation d'un anticorps anti-RANKL humain (AMG 162), dans le cadre du traitement de l'ostéoporose chez la femme post-ménopausée, sont en cours (Bekker et al, 2004). Les résultats obtenus montrent qu'une seule injection (intraveineuse ou sous-cutanée) de cet anticorps permet de diminuer durablement le taux des marqueurs du remodelage osseux. L'utilisation de ces molécules (constructions recombinantes de RANK-Fc et OPG, anticorps anti-RANKL) pourrait devenir un champ d'applications présentant des potentiels thérapeutiques nouveaux dans le suivi de patients atteints de tumeurs osseuses pour lesquels les traitements conventionnels ont échoué.

## **2. Immunothérapies**

L'utilité du système immunitaire dans la défense anti-tumorale a été mise en évidence à la fin du XIXème siècle par un chirurgien W.B. Coley (Armstrong et al., 2001). Celui-ci avait observé une régression tumorale chez certains patients atteints d'infections cutanées par *Streptococcus pyogenes*. En effet, la cellule tumorale représente une cible potentielle pour les mécanismes de défense et, bien que dérivant du soi, elle peut devenir immunogène. Lors de la tumorigenèse, la cellule est généralement exposée à une instabilité génétique et peut, dans certaines conditions, présenter à sa surface des antigènes-cibles, reconnus comme étrangers par le système immunitaire (Davis et al., 2003 ; Renkvist et al., 2001).

Le mélanome et le carcinome rénal sont deux pathologies présentant une malignité et une résistance importantes aux agents de chimiothérapie. Cependant, l'expression d'antigènes tumoraux à la surface des cellules de ces carcinomes en fait des candidats intéressants pour l'élaboration de protocoles d'immunothérapie (Elhilali et al., 2000 ; Hsueh et al., 1998). Lors de la carcinogenèse, les mélanocytes tumoraux acquièrent l'expression d'antigènes tels que Melan-A/MART-1 ou la gp100/Pmel17 et cependant le taux de survie à long terme est très faible en l'absence de prise en charge du malade (Panelli et al., 2000). Ces antigènes, absents des mélanocytes normaux, présentent alors un fort potentiel pour l'élaboration de protocoles d'immunothérapie. L'ostéosarcome présente des propriétés similaires. Les cellules transformées, dérivant de cellules osseuses normales, acquièrent l'expression d'antigènes tumoraux tels que MAGE-1 (melanoma-associated antigen 1) (Sudo et al., 1997), SART-1 (squamous cell carcinoma antigen recognized by T cells 1) et SART3

(Ishida et al., 2002 ; Tsuda et al., 2001). Ces antigènes sont normalement absents de l'environnement cellulaire osseux dans les conditions physiologiques et représentent ainsi une cible pour les effecteurs de la réponse immunitaire.

A l'heure actuelle, les protocoles d'immunothérapie sont largement étudiés et représentent un potentiel considérable dans la lutte contre le cancer. Ces protocoles sont classés selon leur mode d'action. Ainsi on distingue d'une part, des protocoles d'immunothérapie passive, consistant à amplifier les effecteurs immunitaires déjà présents au niveau de la réponse anti-tumorale (Dudley et al., 2003) [Lymphocytes T Cytotoxiques (CTLs) dirigés contre des antigènes tumoraux, Lymphocytes Infiltrant les Tumeurs (TIL) ou anticorps dirigés contre les cellules tumorales], et d'autre part, des protocoles d'immunothérapie active principalement ciblés sur l'utilisation de cytokines (Elhilali et al., 2000 ; Lens et Dawes, 2002 ; Rosenberg et al., 1999) ou de cellules présentatrices d'antigènes, telles que les cellules dendritiques, destinées à orienter et à stimuler les effecteurs de la réponse immunitaire contre les cellules tumorales (Panelli et al., 2000).

Les mécanismes biologiques conduisant à ces maladies ne sont pas toujours identifiés, c'est pour cette raison que le travail de recherche effectué durant cette année de Master II visait à analyser l'implication de plusieurs cytokines dans la différenciation ostéoclastique.

## **4<sup>EME</sup> PARTIE**

### **TRAVAUX DE RECHERCHE**

L'objectif de ce travail est d'étudier l'implication de cytokines dans l'ostéoclastogenèse sur des cellules en cours de différenciation dans le modèle de la lignée RAW 264.7. Dans un premier temps, nous analyserons les effets directs de l'IL-6 sur la différenciation ostéoclastique. Puis dans un second temps, nous chercherons les mécanismes moléculaires impliqués. Enfin, nous étudierons les effets du facteur de croissance M-CSF et du TNF $\alpha$  sur la différenciation ostéoclastique de la lignée RAW 264.7.

## **I. Matériel et méthodes**

### **1. Cultures cellulaires**

#### **a. Milieux, solutions et matériel utilisés**

##### **$\alpha$ . Milieux :**

- Milieu  $\alpha$ -MEM (alpha Minimum Essential Medium) (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France)
- DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline sans Ca ni Mg ; Biowhittaker, Verviers, Belgique)
- Acides aminés non essentiels (Invitrogen)
- Antibiotiques : Pénicilline 100UI/mL et Streptomycine 100 $\mu$ g/mL (Invitrogen)
- Sérum de veau fœtal (SVF ; Hyclone Perbio, Logan, USA)

##### **B. Cytokines et inhibiteurs :**

- RANKL humain (hRANKL) (Amgen Inc., Thousand Oaks, USA)
- IL-6 humaine (hIL-6) (R&D System, Abington, GB)
- TNF $\alpha$  souris (mTNF $\alpha$ ) (R&D System)
- M-CSF murin (mM-CSF) (R&D System)
- UO126 (inhibiteur de Erk) (Calbiochem, La Jolla, USA)
- PiSTAT3 (inhibiteur peptidique STAT3) (Calbiochem)
- AG490 (inhibiteur STAT3) (Calbiochem)
- LY294002 (inhibiteur de PI3Kinase) (Calbiochem)
- SB202190 (inhibiteur de p38) (Calbiochem)

### **b. Culture de la lignée RAW 264.7**

La lignée RAW 264.7, obtenue auprès de l'ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, USA) est une lignée myéloïde murine dont la particularité est de pouvoir se différencier en ostéoclastes *in vitro* en présence de RANKL (Wittrant et al., 2004).

Les cellules sont cultivées dans une atmosphère humide avec 5% de CO<sub>2</sub> – 95% d'air à 37°C, en milieu  $\alpha$ -MEM sans rouge de phénol, contenant 2 mM de L-glutamine et supplémenté avec 10% de SVF et 1% d'acides aminés non essentiels. A confluence, ces cellules sont grattées à l'aide d'un "scraper", puis remises à 37°C 2-3 minutes afin d'éliminer les cellules les plus différenciées qui réadhèrent au plastique. Les cellules surnageantes (les moins différenciées) sont collectées, centrifugées, puisensemencées à raison de 3000 cellules par puits, en plaque 96 puits dans 100  $\mu$ L de milieu. En plaque 24 puits, les cellules sontensemencées à 12000 cellules par puits dans 500  $\mu$ L de milieu.

Après deux heures d'incubation, le milieu est remplacé par les milieux de différenciation. La différenciation des RAW 264.7 en cellules ostéoclastiques est obtenue en les cultivant 5 jours en présence de hRANKL à 100 ng/mL (ou de mTNF $\alpha$ ) avec changement de milieu tous les deux jours.

L'effet des cytokines hIL-6 et mM-CSF est testé sur la différenciation ostéoclastique en plaque 96 puits, chaque condition est réalisée en triple. Dans certaines expériences, les cellules RAW 264.7 sont pré-traitées avec l'hIL-6 (100 ng/mL) ou mM-CSF (100 ng/mL) pendant 3 jours avant d'être mises en culture avec les milieux de différenciation.

## **2. Détection et numération des ostéoclastes**

Deux méthodes de coloration ont été utilisées pour numérer les ostéoclastes et évaluer leur degré de nucléation en plaque 96 puits : la coloration May-Grünwald-Giemsa (MGG) et la coloration TRAP. Le comptage est effectué manuellement sous microscope optique, au grossissement x40. Sont considérées comme ostéoclastes, les cellules comportant plus de 3 noyaux.

### **a. Coloration May-Grünwald-Giemsa**

La coloration de May-Grünwald-Giemsa repose sur l'action complémentaire de deux colorants. Après 5 jours de culture dans des conditions de différenciation, les cellules sont lavées au PBS, puis recouvertes du colorant May-Grünwald (Sigma, Saint Quentin Falavier, France) [(3 minutes à température ambiante (TA)]. Après un lavage à l'eau distillée, les cellules sont recouvertes par le colorant Giemsa (Sigma) (30 minutes, TA). Puis après un dernier lavage à l'eau du robinet et séchage à l'air, les cellules sont observées et dénombrées sous microscope.

### **b. Coloration TRAP**

Les ostéoclastes peuvent être mis en évidence par leur activité phosphatase acide résistante au tartrate (TRAP) grâce à un kit (N° 387A) disponible chez Sigma. La coloration a été réalisée en respectant le protocole fourni par le fabricant.

## **3. Etude de l'expression des transcrits par RT-PCR semi-quantitative**

La technique de Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) est utilisée dans cette étude pour mettre en évidence et comparer l'expression de gènes d'intérêt. Cette technique consiste dans un premier temps en l'extraction des ARN totaux exprimés par la cellule dans des conditions données, puis ces ARN sont rétrotranscrits en ADNc afin d'amplifier par PCR les différents gènes d'intérêt et d'en évaluer le niveau d'expression.

### **a. Extraction des ARN totaux**

Après 5 jours de culture, les cellules sont lysées par 1 mL de réactif Trizol (Invitrogen). A la solution de lyse est ajouté 0,2 mL de chloroforme [incubation 2 minutes à température ambiante (TA)], puis l'ensemble est centrifugé (12000g/15min/TA). Trois phases peuvent être distinguées, la phase supérieure aqueuse qui contient l'ARN est récupérée. L'ARN est précipité par 0,5 mL d'isopropanol (incubation 10 minutes, TA), puis centrifugé (12000g/10min/4°C) pour obtenir un culot qui est rincé par 1 mL d'éthanol 75% (incubation 10 min, TA). Le culot est séché à l'air ambiant, puis repris dans une quantité suffisante d'eau

stérile. L'ARN est dilué dans du tampon TE et quantifié par mesure de l'absorbance par rapport au TE seul, le rapport DO260/DO280 devant être compris entre 1,8 et 2. La concentration en ARN total est calculée par la formule suivante :

Concentration en ARN ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) = DO260 x 0,04 (coefficient d'extinction molaire) x facteur de dilution.

Les solutions finales sont conservées à  $-20^{\circ}\text{C}$  si la RT est faite dans un second temps. Afin d'éliminer d'éventuelles contaminations par de l'ADN génomique, les ARN sont traités à la Dnase I. Cinq  $\mu\text{g}$  d'ARN totaux sont incubés 15 minutes à température ambiante avec 2,7  $\mu\text{L}$  de tampon 10X DNase I et 2,7  $\mu\text{L}$  de DNase I 1U/ $\mu\text{L}$  (Invitrogen) complété à un volume final de 27  $\mu\text{L}$  avec de l'eau stérile. L'enzyme est ensuite inactivée par l'addition de 3  $\mu\text{L}$  d'une solution d'EDTA à 25 mM (Invitrogen). Dix minutes à  $65^{\circ}\text{C}$  suivies de 5 minutes à  $95^{\circ}\text{C}$  permettent de détruire la DNase inactivée et de dénaturer les structures hybrides ARN-ARN. Les échantillons sont alors rapidement transférés sur la glace afin d'éviter une renaturation.

### **b. Reverse-Transcription (RT)**

L'objectif de la RT est de transformer l'ARN issu des cellules en ADN complémentaire (ADNc) grâce à la Moloney Murine Leukemia Virus-Retro Transcriptase (MMLV-RT ; Invitrogen), une ADN polymérase spécialisée, capable de synthétiser un brin d'ADNc à partir d'un brin d'ARN.

La transcription inverse est réalisée en ajoutant aux 5  $\mu\text{g}$  d'ARN traités à la DNase I une solution contenant du tampon 5X, 10mM de DTT (Dithiothreitol, Invitrogen), 0,5  $\mu\text{g}$  de Randoms Primers (Promega, Madison, USA), 0,5 mM de dNTP (Eurobio, Courtaboeuf, France), 20 U de RNase out (Recombinant Ribonuclease Inhibitor) (Invitrogen) et 400 U de MMLV-RT. La réaction se fait à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 1 heure. Les produits de RT sont refroidis sur la glace et conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à ce que la PCR soit réalisée.

### **c. Polymerase Chain Reaction (PCR)**

La PCR est utilisée pour réaliser une amplification génique, c'est-à-dire qu'elle permet l'amplification spécifique d'un fragment d'ADN précis, même si celui-ci est présent en faible quantité dans le mélange initial. Cette technique utilise de manière répétitive l'une des

propriétés des ADN polymérase : pouvoir synthétiser le brin complémentaire d'un ADN matrice à partir d'une amorce. L'enzyme utilisée est la Taq polymérase, une ADN polymérase thermorésistante dont la température optimale d'action est de 72°C, mais qui est capable de résister à des passages successifs à 95°C. La Taq polymérase permet l'élongation de l'ADN à partir de deux amorces sens et antisens encadrant la séquence d'ADN à amplifier. La synthèse des brins d'ADN complémentaires est réalisée avec les éléments de base que sont les dNTPs. Une PCR correspond à la succession de plusieurs cycles comportant chacun 3 étapes :

1. La dénaturation de la matrice d'ADN double brin à 95°C,
2. L'hybridation des amorces de 50°C à 65°C (selon les amorces, voir annexe 1),
3. L'élongation des brins complémentaires à 72°C par la Taq Gold Polymérase (Roche, France).

Au fil des cycles, la quantité d'ADN double brin borné par les amorces augmente de façon exponentielle, en théorie  $2^n$  copies pour  $n$  cycles de PCR.

La solution utilisée pour la PCR est constituée de :

2 µL de produits de RT obtenus précédemment,  
48 µL du milieu réactionnel pour PCR contenant : du tampon 10X, 0,2 µM de primer sens, 0,2 µM de primer antisens, 0,8 mM de dNTP (désoxy Nucléotide TriPhosphate) , 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1,25 U de Taq Gold, eau stérile qsp 48 µL.

Les produits de PCR obtenus sont déposés sur un gel d'agarose à 1,8%. Après migration à 100 V, le gel est placé 5 minutes dans un bain de BET et rincé à l'eau. Puis la bande contenant l'ARNm rétro-transcrit et amplifié est visualisée sous UV. Une quantification relative de l'expression de chaque gène peut alors être réalisée en comparant l'intensité de chaque bande avec celle d'un gène de référence, ici le 18S, dont l'expression est stable en fonction des traitements subis par les cellules.

#### **4. Analyse de la transduction du signal par Western blot**

##### **a. Culture des cellules et stimulation**

La technique de Western blot permet de détecter la présence d'une protéine et d'évaluer son niveau d'expression. Les cellules RAW 264.7 (4.106) sontensemencées dans 1,5 mL de

milieu de culture en plaque 6 puits. Après 24h, les cellules sont privées de sérum, prétraitées ou non avec de l'hIL-6 (100 ng/mL), puis stimulées (ou non) par du hRANKL (100 ng/mL). Après 15 min, à 37°C, la réaction est arrêtée par passage sur glace. Les cellules sont lavées avec du PBS froid et grattées avec du tampon de lyse (annexe 2). Après 20 min sur glace, et centrifugation (12000g/20 min/4°C), les lysats totaux sont récupérés (surnageants après centrifugation). Cette technique a également été utilisée pour détecter la présence d'une protéine après transduction des cellules RAW 264.7 par des particules lentivirales.

Le dosage protéique permet de déterminer la quantité de protéines contenue dans chaque échantillon. Il est réalisé selon la technique BCA.

Dans une plaque 96 puits, 10 µL de lysat cellulaire ou d'une gamme étalon d'albumine bovine sérique (BSA : Bovine Serum Albumin, Sigma) sont mis en présence de 200 µL de réactif BCA (sulfate de cuivre dilué au 1/50ème dans une solution d'acide bicinchoninique, Sigma). Après 30 minutes d'incubation, les densités optiques sont lues à 570 nm.

### **b. Electrophorèse et transfert**

Les lysats totaux (quantité protéique définie) sont dilués au demi dans du tampon SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) +  $\beta$ ME ( $\beta$  mercaptoéthanol), bouillis 5 min et déposés dans les puits d'un gel d'acrylamide 10% (annexe 2). La migration se fait en tampon Tris-glycine-SDS (annexe 2) à 20 mA/gel dans une cuve d'électrophorèse verticale (Hoeffer Scientific, San Francisco, CA). Le transfert est ensuite effectué sur une membrane de PVDF (Polyvinylidene fluoride) (Immobilon-P transfer Millipore Corporation, Bedford, MA) en tampon Tris Glycine + 20 % de méthanol dans une cuve spéciale (Transphor Tank Transfer Unit, Amersham Biosciences, Piscataway, USA), sur la nuit à 40 mA avec un système de refroidissement à l'eau.

### **c. Révélation par chimioluminescence**

La membrane est rincée en tampon de lavage (PBS 1X / Tween 0,1%) puis saturée pendant 1 heure, dans du PBS / BSA 3% / Tween 0,1%, sous agitation. Elle est ensuite incubée toute la nuit, à 4°C, sous agitation avec les anticorps d'intérêt, dilués au 1/1000 en PBS / BSA 3% / Tween 0,1%. Après 3 lavages (10 min par lavage), la membrane est incubée 1 heure avec l'anticorps anti-Ig adéquat couplé à la peroxydase (1/5000) dans du PBS / Lait

5% / Tween 0,1%. Après 3 nouveaux lavages, la membrane est mise en contact 1 min avec le substrat de la peroxydase (10 mL de Blotting substrate, solution A + 100 µL de Starting, solution B) (BM Chemiluminescence Western Blotting Substrate, Roche). En présence de son substrat (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) la peroxydase catalyse l'oxydation du luminol qui émet alors une intensité chimioluminescente détectée sur des films Kodak.

Anticorps utilisés :

- Anti-phospho et total p38 (Ozyme, Saint-Quentin en Yvelines, France)
- Anti-phospho et total Stat 3 (Cell Signalling, Beverly, USA)
- Anti-phospho et total Erk (Cell Signalling).

## **5. Cytométrie en flux**

Cette technique permet d'étudier l'expression membranaire ou intracellulaire de protéines.

Les cellules RAW 264.7 sont cultivées 5 jours en présence des différentes cytokines (hRANKL, hIL-6, mM-CSF) comme décrit précédemment. Au terme de cette période de culture, la présence des marqueurs macrophagiques [CD11b, F4/80, MOMA-2 (intracellulaire)] et d'un marqueur ostéoclastique (CD44) à la surface cellulaire est déterminée par cytométrie en flux.

Les cellules décollées grâce à une solution de PBS/EDTA 5 mM (Invitrogen) sont lavées deux fois dans une solution de PBS, puis réparties dans une plaque 96 puits à fond conique à raison de 2.10<sup>5</sup> cellules par puits.

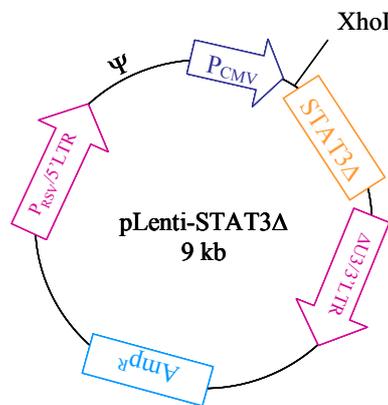
Les cellules sont incubées pendant 30 minutes à 4°C avec le réactif Seroblock (Serotec, Cergy Saint Christophe, France). Il s'agit d'un anticorps anti CD16 – CD 32 (récepteurs au fragment Fc des immunoglobulines) qui permet de saturer les sites de fixation non spécifique. Plusieurs conditions expérimentales ont été testées afin de réduire au maximum le bruit de fond. Les macrophages ayant de nombreux récepteurs au fragment Fc des immunoglobulines, il est nécessaire de faire une étape de saturation avec 50% de Seroblock dans les conditions avec hIL-6 et seulement 5% dans les conditions contrôle et hRANKL.

Après cette saturation, les cellules sont centrifugées et les culot repris dans du PBS/BSA (1%) (Sigma) contenant l'anticorps dirigé contre la protéine d'intérêt. L'anticorps est couplé à la phycoérythrine, ce qui ne nécessite pas de second anticorps. Après 30 minutes d'incubation à 4°C et 2 lavages au PBS, les cellules sont reprises dans du

PBS/Paraformaldéhyde (1%), puis analysées par cytométrie en flux (FACScalibur, BD Biosciences, San José, USA). L'analyse est réalisée grâce au logiciel Cell Quest Pro (BD Biosciences).

## **6. Transduction des cellules RAW 264.7 par des particules lentivirales**

La mise au point et la production du vecteur lentiviral STAT3 $\Delta$  ont été réalisées par B. Brounais et le Dr. V. Trichet. La séquence codant STAT3 $\Delta$  a été clonée dans le vecteur pLenti Thy1 qui dérive du plasmide pLenti 6/V5-GW/LacZ (Invitrogen) modifié par le Dr R. Breatnach (INSERM U601, Nantes) (figure 17).



**Figure 17** : Construction du vecteur pLenti contenant la séquence codant STAT3 $\Delta$  (d'après Brounais, 2006).

La lignée cellulaire 293 FT est utilisée pour la production des particules lentivirales. Les cellules sont transfectées (dans un rapport 10/1) par le pLenti STAT3 $\Delta$  et par le plasmide pFG12, exprimant la protéine EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein). 48h après la transfection, le surnageant contenant les particules lentivirales est récupéré puis filtré. Il contient les deux lentivirus STAT3 $\Delta$  et EGFP. Une estimation du titre des particules lentivirales produites est nécessaire pour standardiser les transductions. Ce titre permet de déterminer la quantité de suspension à utiliser pour transduire des cellules à une MOI (multiplicity of infection) donnée, la MOI correspondant au nombre de particules lentivirales par cellule.

La transduction des cellules RAW 264.7 consiste en la mise en contact des vecteurs lentiviraux (EGFP et STAT3 $\Delta$ ) sur un tapis (50 à 80% de confluence) de cellules. Plusieurs

concentrations de particules lentivirales ont été testées pour transduire les cellules (MOI 60 et MOI 80). Après deux jours d'incubation, le surnageant contenant les virus est retiré et les cellules remises en culture avec du milieu frais. Une partie des cellules est alors lysée pour détecter la protéine d'intérêt STAT3 $\Delta$  par Western blot, l'autre est congelée pour des expériences de différenciation.

## **7. Statistiques**

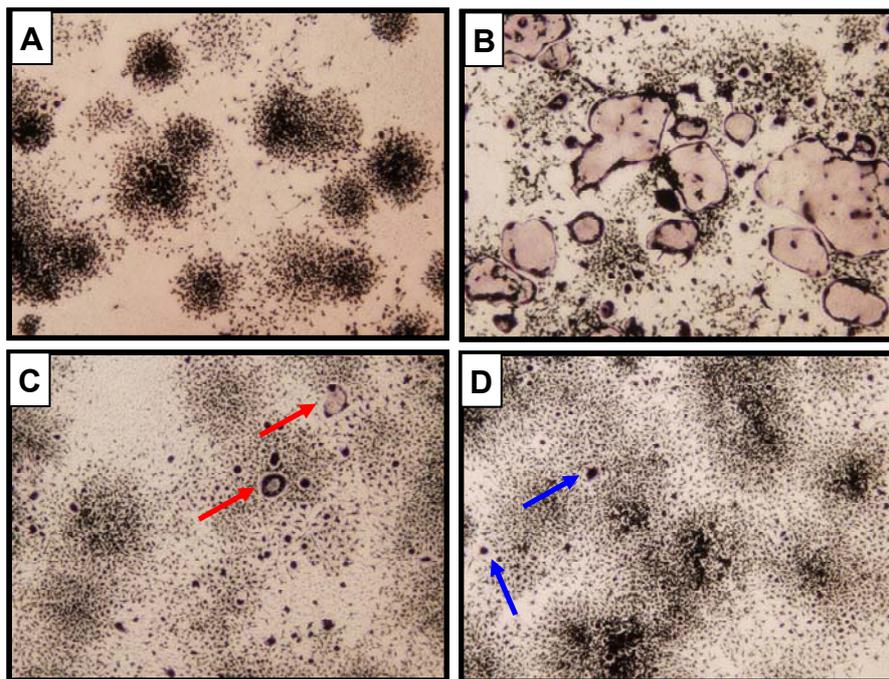
Les résultats obtenus pour les différentes expérimentations sont exprimés en moyenne +/- écart-type. Des études comparatives des moyennes ont été effectuées en utilisant un test t de Student. Les résultats sont considérés comme significatifs lorsque  $p \leq 0,05$ .

## II. Résultats

### 1. Effets de l'IL-6 sur les cultures de cellules RAW 264.7

#### a. L'hIL-6 réduit le nombre d'ostéoclastes

En présence de hRANKL (100 ng/mL) les cellules RAW 264.7 se différencient en grandes cellules multinucléées (> 3 noyaux) (figure 18B). Un co-traitement d'hIL-6 (100 ng/mL) et de hRANKL (100 ng/mL) pendant 5 jours inhibe de façon très importante l'ostéoclastogénèse induite par hRANKL. Seules quelques petites cellules multinucléées sont observables (flèches rouges) en coloration TRAP (figure 18C). En présence d'hIL-6, certaines cellules adoptent une morphologie de type macrophage (flèches bleues) (figure 18D).



**Figure 18** : Etude de la différenciation des cellules RAW 264.7 en présence des différentes cytokines (5 jours de culture). Coloration TRAP (grossissement original x40).

A : Contrôle

C : hRANKL (100 ng/mL) + hIL-6 (100 ng/mL)

B : hRANKL (100 ng/mL)

D : hIL-6 (100 ng/mL)

### *b. L'effet inhibiteur de l'hIL-6 est dose-dépendant*

Une gamme d'hIL-6 réalisée en présence d'une concentration fixe de hRANKL (100 ng/mL) démontre que l'hIL-6 agit de façon dose-dépendante (81% d'inhibition à 100 ng/mL,  $p < 0,01$  et IC50 est de 15 ng/mL) (figure 19).

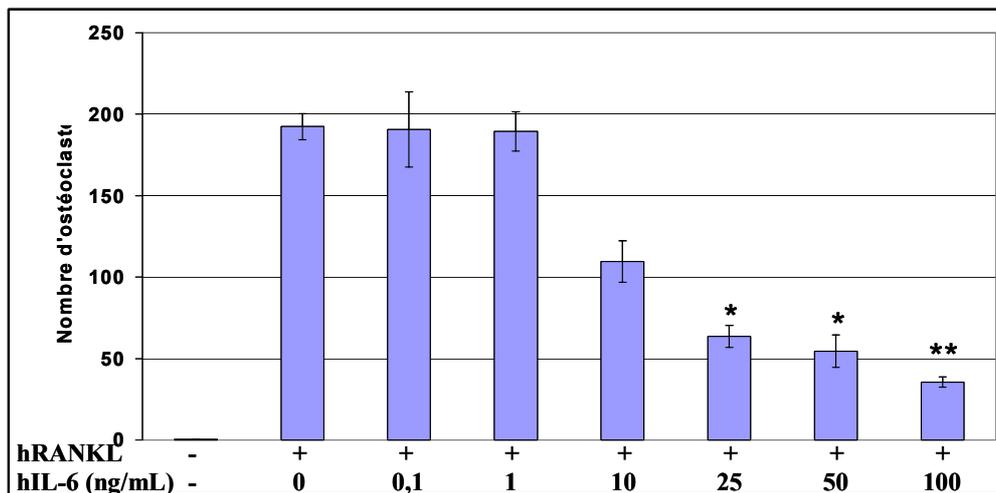


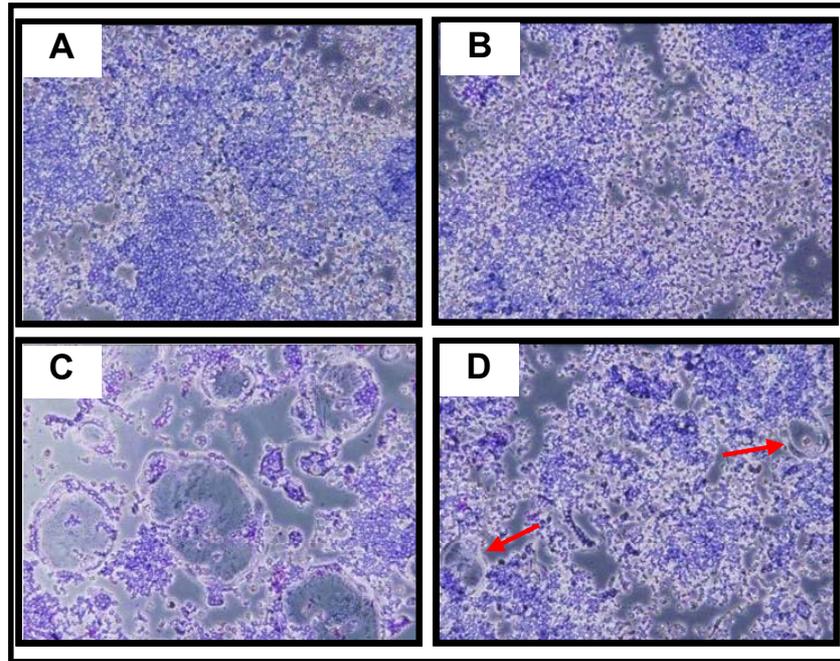
Figure 19 : Etude de l'effet dose-réponse de l'hIL-6 sur l'ostéoclastogénèse des RAW 264.7 induite par hRANKL.

\* =  $p < 0,05$

\*\* =  $p < 0,01$

### *c. L'hIL-6 inhibe l'ostéoclastogénèse de façon irréversible*

Pour tester si l'effet de l'hIL-6 sur la différenciation ostéoclastique est irréversible ou non, les cellules RAW 264.7 sont pré-incubées avec de l'hIL-6 à 100 ng/mL. Après 3 jours, les cellules sont mises en contact avec hRANKL pendant 5 jours pour les différencier en ostéoclastes. Quand les cellules RAW 264.7 n'ont pas été pré-incubées avec l'hIL-6, la différenciation est toujours aussi efficace (figure 20C). Par contre un pré-traitement de 3 jours avec hIL-6 réduit de 70% la différenciation ostéoclastique induite par hRANKL : seuls quelques ostéoclastes se sont formés (figure 20D, flèches rouges). Après 8 jours en présence d'hIL-6 (prétraitement + différenciation classique), certaines cellules présentent à nouveau une morphologie proche de celle de macrophages (données non montrées). Ces résultats indiquent que les cellules RAW 264.7 pré-traitées pendant 3 jours par l'hIL-6 sont résistantes à l'action ostéoclastogénique de RANKL.

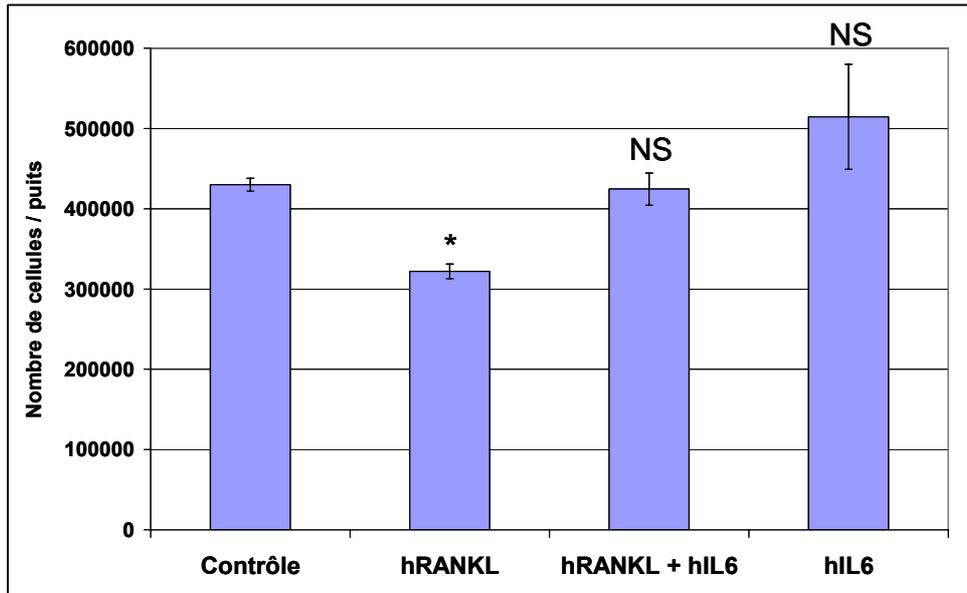


**Figure 20** : Effet de l'IL-6 en prétraitement. Les cellules ont été pré-incubées pendant 3 jours avec hIL-6 (B et D) ou sans hIL-6 (A et C).

Puis elles sont cultivées avec hRANKL (100 ng/mL) (C et D) ou sans hRANKL (A et B) pendant 5 jours. Coloration au MGG (grossissement original x40).

***d. L'inhibition de l'ostéoclastogenèse n'est pas due à une augmentation de prolifération***

Nous avons cherché à comprendre par quel(s) mécanisme(s) l'hIL-6 inhibe la différenciation ostéoclastique des RAW 264.7. Il est admis qu'une augmentation de la prolifération engendre une diminution de la capacité des cellules à se différencier. Nous avons voulu savoir si l'effet de l'hIL-6 passait par ce mécanisme pour inhiber l'ostéoclastogenèse. Après 5 jours de culture, les cellules sont comptées sur cellule de Malassez après coloration au bleu Trypan.



**Figure 21** : Effet de l'IL-6 sur la prolifération cellulaire des RAW 264.7.

Les cytokines ajoutées durant 5 jours sont toutes à une concentration de 100 ng/mL.

\* =  $p < 0,01$

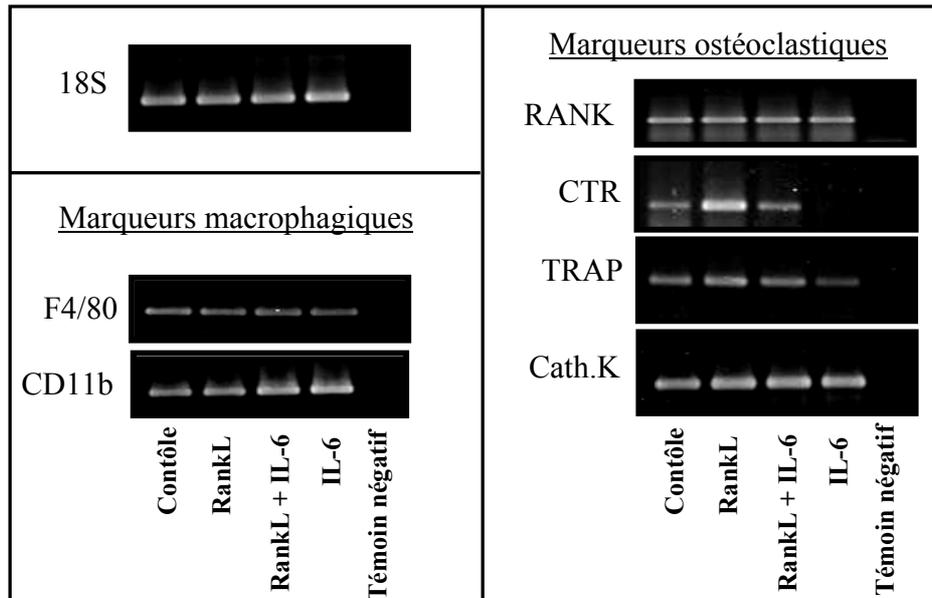
NS = non significatif

Un traitement par RANKL réduit la prolifération de 25% ( $p < 0,01$ ). Par contre, il n'y a pas de différence significative de prolifération entre la condition contrôle et les conditions dans lesquelles l'hIL-6 est présent (figure 21). La prolifération n'est donc pas la cause de l'absence de différenciation.

### *e. L'hIL-6 inhibe l'ostéoclastogenèse en différenciant les RAW 264.7 en macrophages*

#### α Etude de l'expression des marqueurs ostéoclastiques et macrophagiques par RT-PCR

Afin de confirmer l'hypothèse que l'hIL-6 induit une différenciation macrophagique, nous avons étudié l'expression de différents marqueurs par RT-PCR. Après avoir cultivé les cellules RAW 264.7 en différenciation ostéoclastique en présence des cytokines, l'étude par RT-PCR semi-quantitative est réalisée à partir de l'extraction des ARN totaux des cellules RAW 264.7 différenciées. Plusieurs marqueurs ont été étudiés : des marqueurs ostéoclastiques (CTR, RANK, Cathepsine K, TRAP) et des marqueurs macrophagiques (F4/80 et CD11b) (figure 22).



**Figure 22** : Etude de l'expression de marqueurs ostéoclastiques et macrophagiques par RT-PCR.

Tous les marqueurs étudiés sont présents dans les cellules RAW 264.7 non différenciées (contrôle). Malgré l'absence de variation d'expression des marqueurs CathK et RANK, l'augmentation d'expression de l'ARNm des gènes TRAP et CTR démontre une différenciation des cellules RAW 264.7 en ostéoclastes, sous l'influence de hRANKL. Après un co-traitement hIL-6 et hRANKL, le caractère ostéoclastique des cellules RAW 264.7 est moins prononcé, étant donné les taux d'expression des marqueurs ostéoclastiques TRAP et CTR plus faibles que dans la condition hRANKL. Ces mêmes marqueurs sont très faiblement exprimés (niveau d'expression inférieur à la condition contrôle) quand les cellules RAW 264.7 sont cultivées uniquement en présence d'hIL-6 : les cellules ont perdu leur caractère de progéniteurs ostéoclastiques.

Les cellules RAW 264.7 engagées dans la voie ostéoclastique expriment toujours les marqueurs macrophagiques F4/80 et CD11b (niveau d'expression du contrôle). Après une culture de 5 jours avec l'hIL-6 (en présence ou non de hRANKL), l'expression du marqueur CD11b est augmentée. Aucune variation du marqueur F4/80 n'est mise en évidence par cette méthode. L'ensemble de ces résultats confirme que la voie de différenciation macrophagique est favorisée sous l'action de l'hIL-6 par rapport à la voie ostéoclastique induite par hRANKL.

## B Etude par cytométrie en flux des marqueurs membranaires et intracellulaire des cellules RAW 264.7 après différenciation

Une augmentation d'expression des ARNm n'étant pas forcément synonyme d'augmentation d'expression protéique à la membrane, nous avons analysé le niveau d'expression protéique par cytométrie en flux. Au cours de la première expérience de marquage, nous avons observé une moyenne de fluorescence plus importante pour le contrôle isotypique dans les conditions où l'hIL-6 est présent (figure 23A). Ce déplacement de pic est probablement dû à un défaut de saturation des sites non spécifiques. Nous avons essayé de saturer ces sites par des techniques classiques (sérum, BSA), mais ces tentatives sont restées infructueuses.

Les récepteurs aux fragments Fc des immunoglobulines (CD16 et CD32) sont largement exprimés par les cellules présentant un caractère macrophagique. Ce sont des sites potentiels de fixation non spécifique des anticorps dirigés contre les protéines d'intérêt. Après saturation de ces sites non spécifiques par le réactif Mouse Seroblock de Serotec (composé d'anticorps anti CD16 et anti CD32), la moyenne de fluorescence du contrôle isotypique est identique pour les 4 conditions (figure 23B). Cette observation est donc en faveur de notre hypothèse : l'hIL-6 induit une différenciation macrophagique.

Puis nous avons étudié les différents marqueurs macrophagiques et ostéoclastique afin de caractériser les cellules. Le récepteur à l'acide hyaluronique (CD44) impliqué dans les mécanismes de fusion cellulaire des précurseurs ostéoclastiques (de Vries et al., 2005) peut être utilisé comme marqueur ostéoclastique. En présence de hRANKL (100 ng/mL), la moyenne de fluorescence pour ce marqueur est plus importante que pour les autres conditions (235 contre 160) (figure 23C). Ceci confirme donc que les cellules RAW 264.7 sont différenciées en ostéoclastes. En présence de hRANKL et d'hIL-6, le marqueur CD44 a un niveau d'expression comparable à celui de la condition contrôle (moyennes de fluorescence 160 et 175) : l'ostéoclastogenèse n'est pas induite.

La chaîne réceptrice  $\alpha$  au fragment C3 du complément (CD11b) est utilisée comme marqueur macrophagique, ainsi que le récepteur F4/80 (impliqué dans les mécanismes d'adhésion cellulaire) et le marqueur MOMA-2 spécifique des macrophages matures. Parmi ces marqueurs, l'expression du récepteur CD11b est diminuée (moyenne de fluorescence : 63) lorsque les cellules sont cultivées en présence de hRANKL, alors qu'après 5 jours de culture en hIL-6 avec ou sans hRANKL, la moyenne de fluorescence pour le marqueur CD11b est augmentée (164 et 215) par rapport au contrôle (102) (figure 23D). C'est une

preuve supplémentaire qui confirme notre hypothèse, bien qu'aucune variation des autres marqueurs macrophagiques (F4/80 et MOMA-2) n'ait été mise en évidence (figures 23E et 23F).

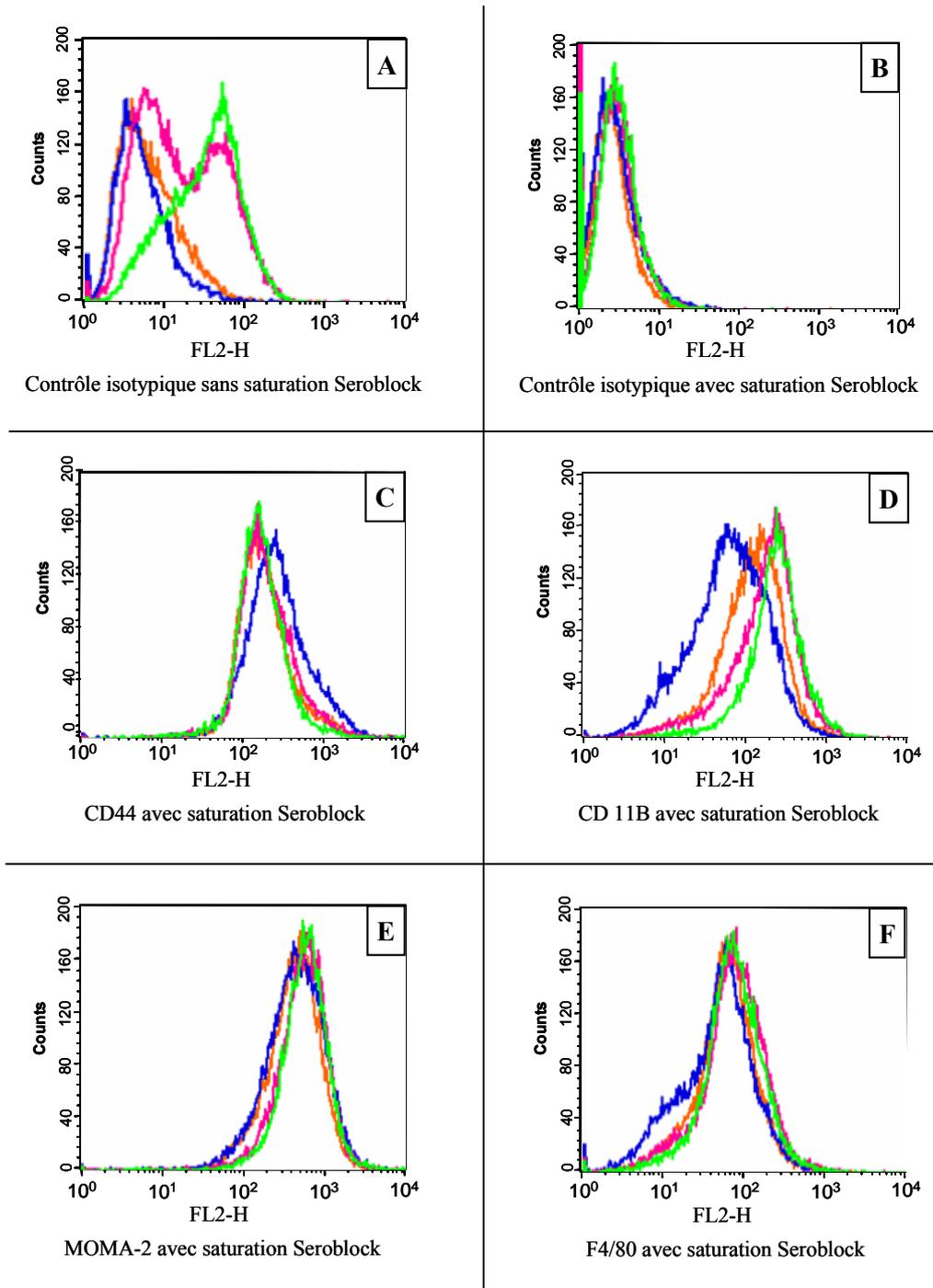
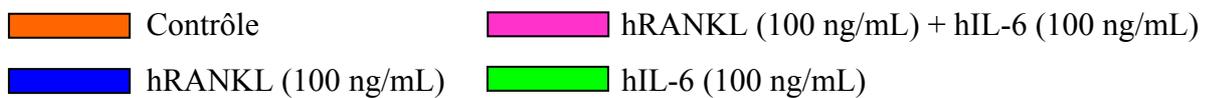


Figure 23 : Etude des marqueurs macrophagiques et ostéoclastique par cytométrie en flux.



## 2. Etude des voies de différenciation impliquées dans l'inhibition de l'ostéoclastogénèse

Après ces premières observations sur l'effet inhibiteur de l'hIL-6 sur l'ostéoclastogénèse induite par hRANKL, nous avons cherché les mécanismes moléculaires éventuellement impliqués dans cette inhibition. Nous avons étudié des voies de signalisation activées par l'IL-6 dans la cellule RAW 264.7.

### a. Effets des inhibiteurs de MAPKinases

La voie de signalisation des MAPKinases est l'une des voies critiques pour la différenciation ostéoclastique (Wada et al., 2006). Certains membres de cette famille [p38, Erk 1, Erk 2 (Extracellular signal-Regulated Kinase)] sont activés dans la cellule RAW 264.7 comme le montre l'analyse Western blot (figure 24A). Pour déterminer l'éventuelle implication de ces voies de signalisation dans l'inhibition induite par l'hIL-6, les cellules RAW 264.7 ont été traitées par des inhibiteurs spécifiques de ces voies dans les différentes conditions (contrôle, hRANKL, hRANKL + hIL-6 et hIL-6).

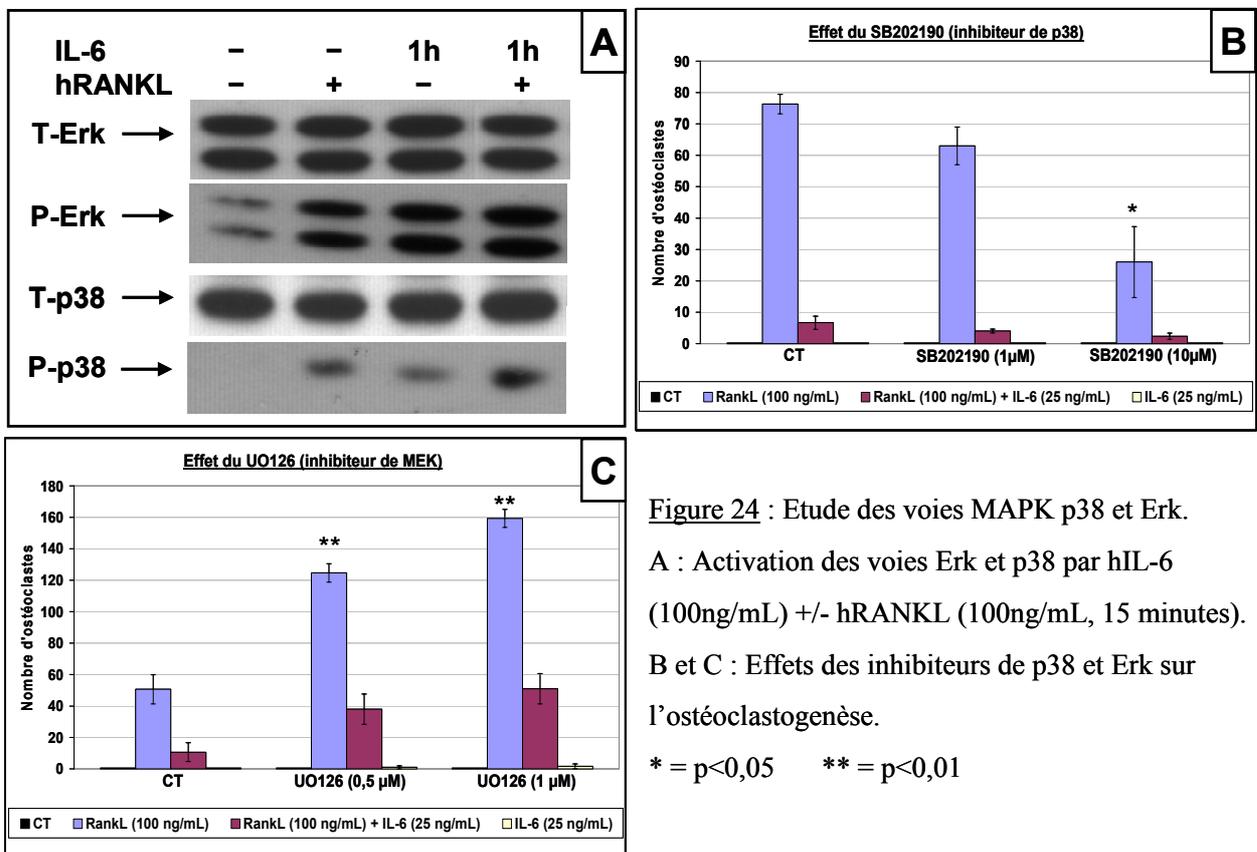


Figure 24 : Etude des voies MAPK p38 et Erk.

A : Activation des voies Erk et p38 par hIL-6

(100ng/mL) +/- hRANKL (100ng/mL, 15 minutes).

B et C : Effets des inhibiteurs de p38 et Erk sur l'ostéoclastogénèse.

\* =  $p < 0,05$     \*\* =  $p < 0,01$

Conformément à la littérature (Lee et al., 2002), le SB202190, inhibiteur de p38, induit une réduction du nombre d'ostéoclastes de manière dose-dépendante (66% d'inhibition à 10 $\mu$ M ; p<0,05) (figure 24B). Cependant, l'effet inhibiteur de l'hIL-6 sur la différenciation ostéoclastique est toujours présent, indiquant que la voie p38 n'est pas impliquée dans l'inhibition de l'ostéoclastogénèse.

Les effets de l'inhibiteur de MEK (UO126) sont de deux sortes. A forte concentration (5  $\mu$ M), il y a une inhibition complète de l'ostéoclastogénèse attribuée à une inhibition de la prolifération cellulaire (données non montrées). Aux faibles concentrations (1 et 0,5  $\mu$ M), l'effet est opposé ; le nombre d'ostéoclastes est fortement augmenté dans la condition hRANKL seul (+150% à 0,5  $\mu$ M et +210% à 1 $\mu$ M ; p<0,01) (figure 24C) comme dans la condition hRANKL + hIL-6. Cependant, la variation du nombre d'ostéoclastes entre les conditions hRANKL seul et hRANKL + hIL-6 n'est pas modifiée par l'ajout de UO126 à la culture (80% d'inhibition pour la condition contrôle et 70% pour la condition 0,5  $\mu$ M de UO126). Ces résultats confirment les données de la littérature (Hotokezaka et al., 2002). La voie Erk n'est donc pas impliquée dans l'inhibition de l'ostéoclastogénèse par l'hIL-6. Par contre, une inhibition partielle de cette voie induit une augmentation de l'ostéoclastogénèse.

### **b. Effet de l'inhibiteur de PI3Kinase**

La voie PI3Kinase (Phosphatidyl Inositol 3-Kinase) est impliquée dans plusieurs fonctions cellulaires comme la survie, la motilité et la différenciation. Dans l'ostéoclaste, PI3Kinase intervient dans la formation des filaments d'actine et régule les fonctions du cytosquelette comme la migration et l'attachement sur le support osseux (Lakkakorpi et al., 1997). L'analyse par Western blot ne nous a pas permis de mettre en évidence une activation de cette voie par l'hIL-6 (niveau d'expression trop faible).

A forte concentration (10 $\mu$ M), le LY294002, inhibiteur de PI3Kinase bloque la différenciation en ostéoclastes avec près de 100% d'inhibition (figure 25). A une concentration inférieure (1 $\mu$ M), les cellules RAW 264.7 peuvent se différencier de façon similaire à la condition contrôle (différence non significative NS). Cependant l'inhibition par l'hIL-6 de l'ostéoclastogénèse induite par hRANKL est toujours observée, démontrant que la voie PI3Kinase n'est pas impliquée dans l'action inhibitrice de l'hIL-6.

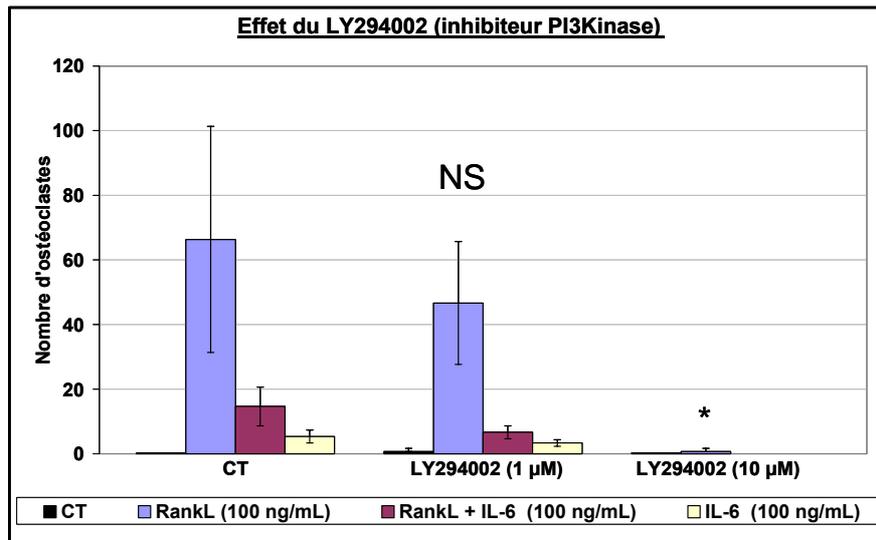


Figure 25 : Etude de l'effet de l'inhibiteur de la voie PI3Kinase.

\* =  $p < 0,01$  ; NS = non significatif

### c. Effet des inhibiteurs de STAT3

La dimérisation des gp130 sous l'action du ligand IL-6 a pour conséquence l'activation du facteur de transcription STAT3 responsable de la plupart des effets de l'IL-6 dans la cellule. Cette voie est activée dans les cellules RAW 264.7 comme le montre le Western blot (figure 26A). Pour déterminer l'implication de cette voie dans l'inhibition de l'ostéoclastogénèse par l'hIL-6, deux inhibiteurs de cette voie ont été testés. Dans un premier temps, les inhibiteurs AG490 et PiSTAT3 ont été ajoutés au milieu de culture dès le début de la différenciation (c'est-à-dire pendant 5 jours).

Quel que soit l'inhibiteur et à forte concentration (PiSTAT3 : 100  $\mu$ M, AG 490 : 10  $\mu$ M), l'inhibition de STAT3 induit une diminution du nombre d'ostéoclastes générés par hRANKL seul (figures 26B et 26C). A faible concentration (PiSTAT3 : 10  $\mu$ M et AG490 : 1  $\mu$ M), l'inhibition est moins importante (respectivement 0% d'inhibition pour le PiSTAT3 et 15% d'inhibition pour l'AG490 par rapport à la condition contrôle). Pourtant l'effet de l'hIL-6 reste présent, l'inhibition de l'ostéoclastogénèse induite par hRANKL est de l'ordre de 85% pour les trois conditions (contrôle, PiSTAT3 : 10  $\mu$ M et AG490 : 1  $\mu$ M). L'hIL-6 inhiberait donc l'ostéoclastogénèse par une voie indépendante de STAT3.

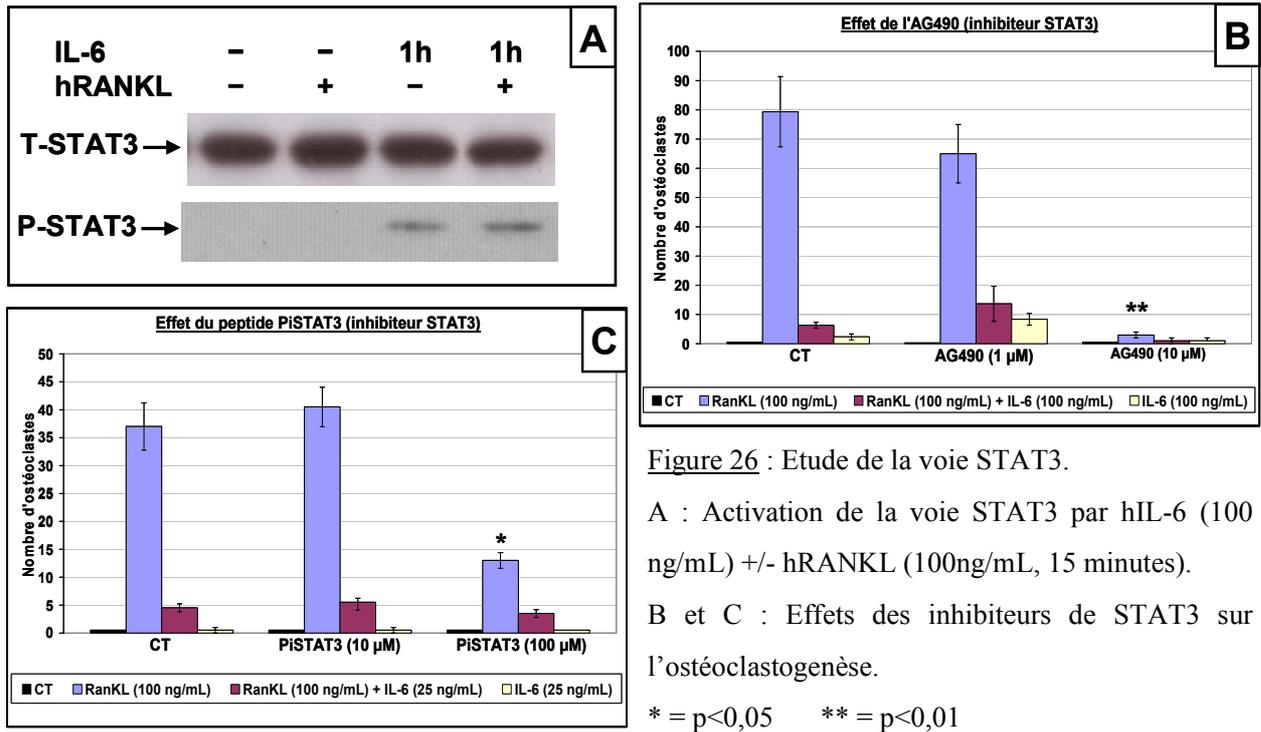


Figure 26 : Etude de la voie STAT3.

A : Activation de la voie STAT3 par hIL-6 (100 ng/mL) +/- hRANKL (100ng/mL, 15 minutes).

B et C : Effets des inhibiteurs de STAT3 sur l'ostéoclastogénèse.

\* = p<0,05    \*\* = p<0,01

Dans un second temps, le PiSTAT3 est ajouté après deux jours de différenciation, période pendant laquelle les cellules RAW 264.7 se différencient en pré-ostéoclastes prêts à fusionner. L'effet inhibiteur de PiSTAT3 n'est plus présent quand il est ajouté deux jours après le début de la différenciation (figure 27). Par contre, l'hIL-6 conserve sa capacité à bloquer le processus de différenciation ostéoclastique : 96% d'inhibition dans la condition contrôle et 94% d'inhibition dans la condition PiSTAT3 / 3 jours.

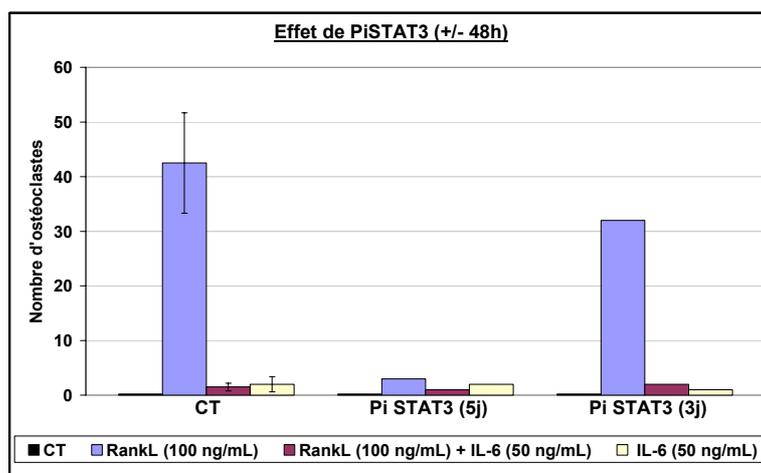
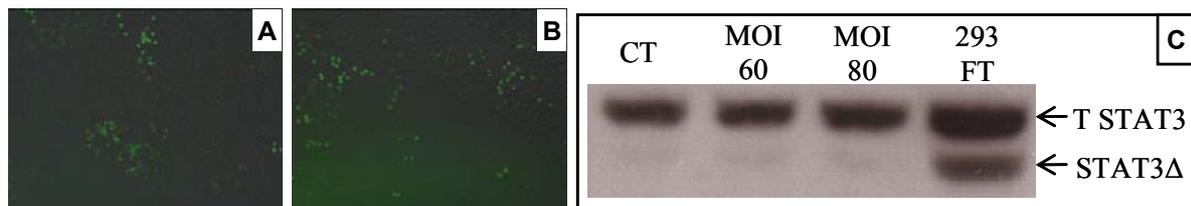


Figure 27 : Effet du PiSTAT3 (100 µM) en fonction de la durée de contact avec les cellules RAW 264.7.

### *d. Transduction des cellules RAW 264.7 par le lentivirus STAT3Δ*

Dans cette étude, nous avons utilisé une transduction par des particules lentivirales, car les moyens chimiques habituels (PEI, phosphate de calcium) ont déjà été testés au laboratoire sans succès pour transfecter transitoirement les cellules RAW 264.7. Nous disposons d'une construction lentivirale qui permet de transduire stablement des cellules avec une forme tronquée de la protéine STAT3. Cette forme tronquée peut se dimériser entre elle ou avec une forme de STAT3 endogène. Le dimère formé ne peut recruter la machinerie transcriptionnelle, l'expression des gènes activés par la voie STAT3 est ainsi réduite.

L'analyse sous microscope UV révèle un nombre important de cellules RAW 264.7 fluorescentes (figures 28A et 28B). L'efficacité de transduction pour le lentivirus EGFP est de 20 à 30% pour les deux concentrations de particules infectieuses (MOI 60 et MOI 80). Ainsi, une efficacité comparable voire supérieure pour la forme tronquée STAT3Δ peut être envisagée.



**Figure 28** : Etude de la voie STAT3 par transduction d'un dominant négatif de STAT3 par des lentivirus.

A et B : Observation sous microscope des cellules transduites par la protéine EGFP (grossissement original x40).

C : Analyse par Western blot des lysats protéiques des cellules transduites par STAT3Δ.

L'analyse des taux d'expression de la forme tronquée de STAT3 permet de quantifier l'efficacité de transduction par le lentivirus Stat3Δ. Après deux jours d'incubation, une analyse des lysats protéiques est réalisée par la technique de Western blot. La forme tronquée de STAT3 est reconnue par l'anticorps utilisé pour détecter la forme totale de STAT3. Comme c'est une forme tronquée, elle migre sur le gel à une taille inférieure à la forme totale. La figure 28C donne le profil protéique des différentes conditions de transduction.

Bien que l'efficacité de transduction par le lentivirus EGFP soit grande, les cellules RAW 264.7 n'expriment pas le dominant négatif STAT3Δ. Pourtant, les cellules contrôle

293FT ont bien intégré la forme tronquée STAT3 $\Delta$ . Comme la protéine n'est pas exprimée par les cellules RAW 264.7, cette méthode ne permet pas d'étudier l'implication de STAT3 dans l'inhibition de l'ostéoclastogenèse par l'IL-6.

### **3. Effets du facteur de croissance M-CSF sur l'ostéoclastogenèse des cellules RAW 264.7 induite par hRANKL**

Plusieurs expériences, comparables à celles effectuées pour l'hIL-6, ont été réalisées afin d'étudier les effets du mM-CSF sur la différenciation des cellules RAW 264.7 en ostéoclastes. Par souci de présentation, les résultats sont inscrits dans le tableau III et mis en parallèle avec les effets de l'hIL-6.

Tableau III : Comparaison des effets de l'hIL-6 et du mM-CSF sur l'ostéoclastogenèse induite par hRANKL.

Cytokines			hIL-6	mM-CSF
Inhibition de l'ostéoclastogenèse induite par hRANKL	A 10 ng/mL		45%	60%
	A 100 ng/mL		81%	96%
	IC 50		15 ng/mL	10 ng/mL
Effet sur la prolifération			aucun	+ 30%
Effet du pré-traitement de 3 jours sur la différenciation ostéoclastique			irréversible	réversible
Différenciation	ARN		Pro macrophagique	Perte des marqueurs ostéoclastiques
	FACS	CD11b	↗	↘
		F4/80	↔	↘
		MOMA2	↔	↔
		CD44	↔	↔
	Conclusion		Confirmation de la voie macrophagique	Dédifférenciation : perte des marqueurs

#### **4. Effets du TNF $\alpha$ sur l'ostéoclastogenèse des cellules RAW 264.7**

Plusieurs expériences ont été réalisées afin d'évaluer les effets du TNF $\alpha$  sur la différenciation ostéoclastogénique des cellules RAW 264.7. Les résultats sont reportés sous forme de tableau (tableau IV) et comparés aux effets du RANKL.

**Tableau IV** : Comparaison des effets du mTNF $\alpha$  et du RANKL sur la différenciation des cellules RAW 264.7 en ostéoclastes.

		hRANKL	mTNF $\alpha$
Différenciation ostéoclastique des cellules RAW 264.7		110 ostéoclastes à 100 ng/mL	20 ostéoclastes à 100 ng/mL
Effet dose-dépendant (de 0 à 100 ng/mL)		oui	oui
Effet synergique avec RANKL			+25% à 50 ng/mL
Effet de l'IL-6 (100 ng/mL)		Inhibition 87% à 100 ng/mL	Inhibition 78% à 50 ng/mL
Effet du M-CSF (50 ng/mL)		Inhibition 95% à 100 ng/mL	Inhibition 90% à 50 ng/mL
Expression des marqueurs ostéoclastiques par analyse RT-PCR	CTR	↗	↗
	TRAP	↗	↗
	RANK	↔	↔
	CathK	↔	↔

## **CONCLUSION**

Il ne fait aucun doute que le rôle des cytokines IL-6, M-CSF et TNF $\alpha$  s'ajoute à l'action de RANKL dans la régulation de la résorption osseuse. L'IL-6 et le TNF $\alpha$ , cytokines de l'inflammation, sont impliquées dans les pertes osseuses associées à de nombreuses maladies : la maladie de Paget (Roodman et Windle, 2005), les myélomes multiples (Klein et al., 1990) et la polyarthrite rhumatoïde (Kotake et al., 1996 ; Nanes, 2003). Le M-CSF, quant à lui, est indispensable à l'homéostasie osseuse, car il stimule la prolifération des précurseurs ostéoclastiques *in vivo*.

La plupart des modèles utilisés dans l'étude de l'ostéoclastogenèse sont des co-cultures de cellules de moelle osseuse et d'ostéoblastes (Tamura et al., 1993 ; Yao et al., 2006), de cellules issues de la calvaria de souriceaux nouveau-nés (Palmqvist et al., 2002) ou de monocytes CD14<sup>+</sup> (Kudo et al., 2003). Dans ces modèles, l'effet direct des cytokines sur l'ostéoclastogenèse n'a pas été étudié. En effet, les expériences de Kudo et de Palmqvist nécessitent la présence du récepteur soluble à l'IL-6.

L'essentiel de notre étude a concerné un autre modèle d'ostéoclastogenèse, la lignée RAW 264.7. Il s'agit d'une lignée monocyttaire murine capable de se différencier en ostéoclastes sous l'action de RANKL. Nous avons également étudié les effets de l'IL-6 sur des cellules de moelle osseuse murine en culture avec des ostéoblastes de souris.

Les objectifs de notre travail étaient :

- d'étudier les effets de l'IL-6 sur la lignée RAW 264.7,
- de comprendre les mécanismes impliqués dans les effets de l'IL-6,
- d'étudier les effets du M-CSF et du TNF $\alpha$  sur l'ostéoclastogenèse.

Les cytokines TNF $\alpha$  et RANKL sont toutes deux capables d'induire la différenciation des cellules RAW 264.7 en ostéoclastes. Toutefois, l'ostéoclastogenèse est plus importante avec RANKL que le TNF $\alpha$  (100 ostéoclastes contre 20 pour le TNF $\alpha$ ). Le TNF $\alpha$  et RANKL agissent en synergie lors de la différenciation des cellules RAW 264.7 en ostéoclastes. Ceci s'explique par des voies de signalisation communes empruntées par ces deux cytokines. Le TNF $\alpha$ , *via* son récepteur TNFR1, active une cascade de signalisations (NF-KB, MAPKinase, PI3Kinase et caspase) (Feng, 2005) et RANKL, *via* son récepteur RANK, active NF-KB, MAPKinase, PI3Kinase (Wada et al., 2006). La stimulation de ces voies conduit à la différenciation des précurseurs en ostéoclastes matures dans notre modèle (cellules RAW 264.7). Par la suite, nous avons étudié les effets de l'IL-6 sur l'ostéoclastogenèse induite par ces deux cytokines.

Un co-traitement hRANKL (ou TNF $\alpha$ ) + hIL-6 bloque la différenciation ostéoclastique de la lignée RAW 264.7, sans que le récepteur soluble à l'IL-6 ne soit ajouté. De plus, nous avons montré que cet effet est irréversible sur l'ostéoclastogénèse. L'IL-6 a donc une action directe sur les cellules RAW 264.7, qu'elles soient en différenciation ou non.

Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce phénomène : sous l'effet de l'IL-6, les cellules RAW 264.7 ont perdu leurs récepteurs RANK ou se sont différenciées en un autre type cellulaire. Un premier élément de réponse est apporté par les observations microscopiques. En effet, après un traitement par l'hIL-6, les cellules RAW 264.7 prennent un aspect étoilé, avec de nombreuses expansions cytoplasmiques, caractéristiques proches de celles de macrophages. L'analyse par RT-PCR des transcrits fournit un deuxième élément de réponse. Parmi les marqueurs ostéoclastiques étudiés, seuls les marqueurs CTR et TRAP voient leur expression diminuer sous l'action de l'IL-6. Les niveaux d'expression de RANK et de Cathepsine K ne sont pas modifiés par l'IL-6. Il semble donc que le récepteur RANK soit toujours exprimé par la cellule RAW 264.7, élément qui rejette la première hypothèse avancée. L'utilisation de RANKL marqué par un fluorochrome (FITC) permettrait d'évaluer, par cytométrie en flux, le taux d'expression du récepteur RANK à la membrane et ainsi de confirmer les résultats apportés par la RT-PCR.

De plus, le marqueur macrophagique CD11b est surexprimé par les cellules cultivées en présence d'IL-6. Ce résultat est confirmé par l'analyse en cytométrie en flux de l'expression de la protéine CD11b. Une première conclusion peut être tirée de l'ensemble de ces résultats. En ajoutant l'interleukine-6 au milieu de culture contenant RANKL ou TNF $\alpha$  (cytokines pro-ostéoclastiques), les cellules RAW 264.7 empruntent une autre voie de différenciation que la voie ostéoclastique : la voie macrophagique (figure 15).

Par la suite, nous avons cherché les mécanismes moléculaires impliqués dans l'inhibition de l'ostéoclastogénèse. Les voies de signalisation de l'IL-6 sont désormais bien connues (Heinrich et al., 2003). Dans les cellules RAW 264.7, l'IL-6 active un certain nombre de voies de signalisation : STAT3, p38 MAPK, Erk MAPKinase, PI3Kinase. Ces voies pourraient être impliquées dans les effets de l'IL-6. Aucun des inhibiteurs des voies MAPKinase (SB202190 et UO126) et PI3Kinase (LY294002) n'a permis de bloquer l'action anti-ostéoclastique de l'IL-6. Cependant, nous avons confirmé que ces voies sont indispensables à la différenciation ostéoclastique des cellules RAW 264.7, comme le montraient les travaux de Lee (Lee et al., 2002) : le UO126 (inhibiteur de la voie Erk) à forte concentration bloque l'ostéoclastogénèse, tandis qu'à faible concentration il active la différenciation. La voie Erk se révèle donc être à la fois un frein à l'ostéoclastogénèse et

pourtant indispensable à son bon déroulement. Une des hypothèses avancées est que la voie Erk est impliquée non seulement dans la prolifération, mais également dans la différenciation et que l'inhibition partielle de la voie Erk (faible concentration d'UO126) favorise la différenciation en diminuant la prolifération.

Nous avons ensuite étudié une autre voie de signalisation de l'IL-6, la voie STAT3 qui aboutit aux principaux effets de l'IL-6 dans la cellule. Cette voie mène à la production de RANKL par l'ostéoblaste après stimulation par l'IL-6. RANKL va agir sur les précurseurs ostéoclastiques et favoriser leur fusion en ostéoclastes matures (O'Brien et al., 1999). Mais le rôle de STAT3 dans l'ostéoclastogenèse est encore mal défini. L'utilisation de deux inhibiteurs (AG 490 et PiSTAT3) a permis d'évaluer l'implication de cette voie dans les effets de l'IL-6. Le pourcentage d'inhibition de l'ostéoclastogenèse par l'IL-6 n'est pas modifié par l'ajout des inhibiteurs. Les effets de l'IL-6 ne semblent pas passer par la voie STAT3.

Néanmoins, nous avons mis en évidence que la voie STAT3 est nécessaire pour la différenciation des cellules RAW 264.7 en ostéoclastes, comme le montre le blocage de l'ostéoclastogenèse par de fortes concentrations d'inhibiteurs. L'ajout de PiSTAT3, deux jours après le début de l'ostéoclastogenèse démontre que le facteur de transcription STAT3 n'est nécessaire que durant les premiers jours de la différenciation, en initiant le processus. Or, les analyses Western blot n'ont pas permis de mettre en évidence une forme active de STAT3 (P-STAT3). Il semble donc qu'un taux relativement faible de STAT3 activé soit indispensable à la différenciation (figure 29). Cette activation basale pourrait être due à une production d'IL-6 par les cellules RAW 264.7 (lignée macrophagique) et exercerait un effet autocrine. De plus, la voie STAT3 est impliquée dans la différenciation des précurseurs myéloïdes en macrophages (Minami et al., 1996). L'ajout d'IL-6 à la culture de cellules RAW 264.7 activerait alors fortement la voie STAT3 en favorisant la différenciation des cellules RAW 264.7 en macrophages (figure 24). La voie STAT3, trop fortement activée, jouerait donc un rôle d'inhibiteur de l'ostéoclastogenèse. Cette conclusion a déjà été rapportée par l'équipe de Zhang très récemment (Zhang et al., 2005). Chez des souris possédant une délétion du gène STAT3 ne touchant que les cellules hématopoïétiques, dont dérivent les ostéoclastes, les auteurs constatent une perte osseuse importante associée à un nombre d'ostéoclastes TRAP+ élevé.

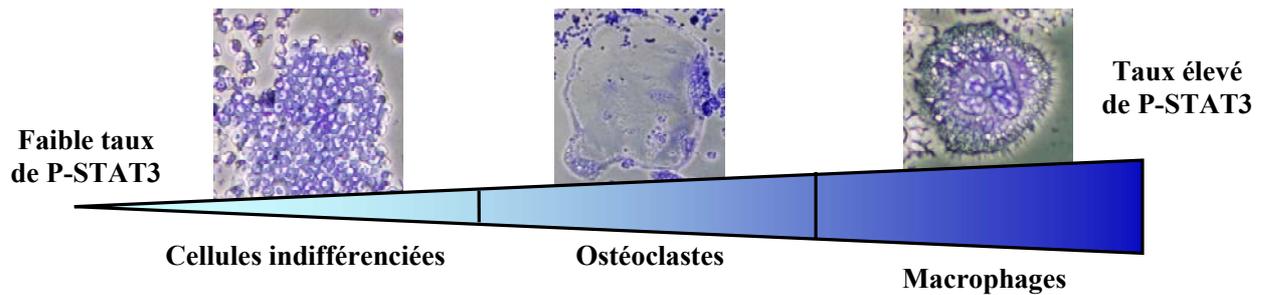


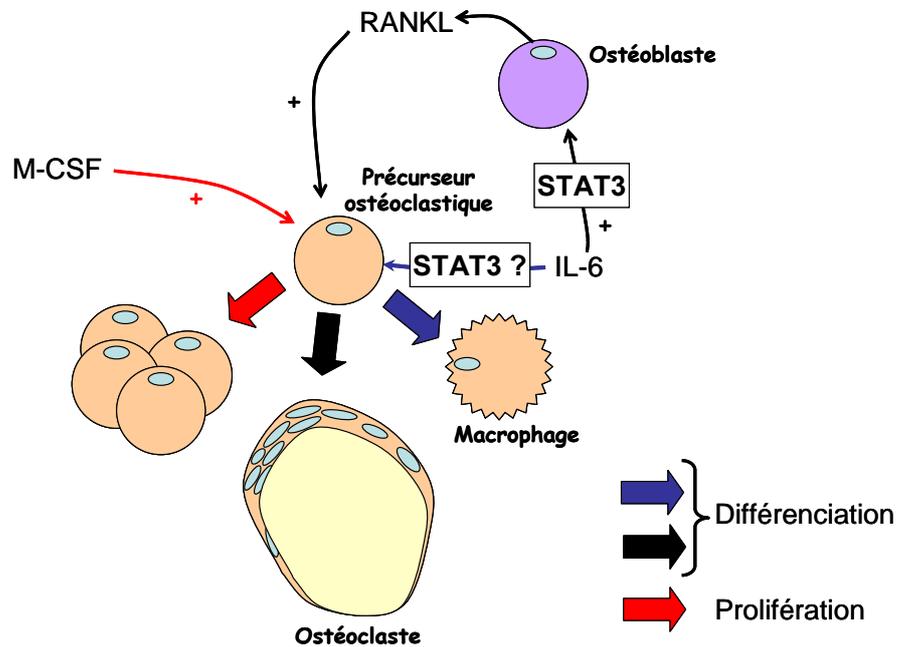
Figure 29 : Implication du taux de P-STAT3 dans les voies de différenciation empruntées par les cellules RAW 264.7 (les proportions ne sont pas respectées).

Une des perspectives de recherche, pour confirmer ce rôle négatif de STAT3 dans l'ostéoclastogénèse est une approche lentivirale de siRNA (small interference RNA) pour STAT3. Ces courtes séquences d'ARN sont capables de s'hybrider sur l'ARNm codant STAT3 et ainsi provoquer sa dégradation. Il en résulte une diminution de l'expression de la protéine STAT3. Le vecteur actuellement en développement au laboratoire contient en plus de la séquence codant pour le siRNA STAT3, une séquence codant pour l'EGFP. Après transduction des cellules RAW 264.7, un tri cellulaire peut être effectué selon le degré de fluorescence (et donc selon le degré d'expression des siRNA). Ainsi en présence d'IL-6 et de RANKL, et selon le degré d'inhibition de STAT3 par les siRNA, les cellules RAW 264.7 entreraient en différenciation ostéoclastique (taux faible de STAT3) ou en différenciation macrophagique (taux élevé de STAT3).

L'IL-6 n'a pas le même effet sur une co-culture d'ostéoblastes et de moelle osseuse de souris. Des expériences réalisées au laboratoire ont permis de mettre en évidence que l'IL-6 n'agirait plus comme un inhibiteur, mais qu'il serait un activateur de la différenciation ostéoclastique (données non montrées), confirmant les données de la littérature (Tamura et al., 1993). Nous pouvons donc penser que l'IL-6 serait à la fois pro et anti-ostéoclastique, l'effet dépendant du type cellulaire sur lequel agit la cytokine. Ce double rôle de l'IL-6 a été mis en évidence récemment par Sims (Sims et al., 2004) dans un modèle *in vivo* de souris présentant des récepteurs gp130 modifiés. Ses travaux ont montré que l'IL-6 *via* STAT3 et l'ostéoblaste, active la résorption osseuse en libérant RANKL (figure 15), tandis que l'IL-6 bloque la différenciation des ostéoclastes en agissant sur les précurseurs ostéoclastiques *via* le récepteur SHP2/ras/MAPKinase.

Nous avons montré que le M-CSF inhibe également la différenciation ostéoclastique des cellules RAW 264.7 initiée par RANKL (ou par le TNF $\alpha$ ). Le mécanisme d'inhibition est

différent de celui de l'IL-6 : Le M-CSF réduit l'ostéoclastogenèse par augmentation de la prolifération des cellules RAW 264.7, tout en les maintenant dans un état indifférencié (figure 30).



**Figure 30** : Schéma récapitulatif des effets de l'IL-6 et du M-CSF sur l'ostéoclastogenèse.

La lignée RAW 264.7 est l'un des modèles utilisés dans l'étude des mécanismes fondamentaux impliqués dans la différenciation ostéoclastique. Non seulement ce modèle est de mise en place facile (pas de purification cellulaire, technique facile), mais il se différencie rapidement en ostéoclastes (5 jours de culture en présence de RANKL 100 ng/mL). Cependant les conditions d'ensemencement, les milieux de culture, la nature des sérums de veau fœtal sont des paramètres critiques pour la bonne différenciation des RAW 264.7. Une mise au point des conditions de culture a été nécessaire afin d'optimiser l'ostéoclastogenèse.

Les résultats obtenus ont mis en évidence un nouveau rôle de l'IL-6 dans la biologie du tissu osseux. Jusqu'ici, connue comme inducteur de l'ostéoclastogenèse, l'IL-6 se révèle être un inhibiteur quand elle agit directement sur les précurseurs ostéoclastiques. Il reste encore à montrer les voies de signalisation impliquées dans cette inhibition, mais le facteur de transcription STAT3 semble être un candidat privilégié d'après les premières constatations. Le M-CSF est également un inhibiteur de l'ostéoclastogenèse par augmentation de prolifération des précurseurs empêchant leur différenciation. Il est nécessaire de confirmer

ces résultats dans d'autres systèmes d'ostéoclastogenèse (cellules de moelle osseuse, monocytes).

## **BIBLIOGRAPHIE**

## 127 références bibliographiques

- Ahmad, R., Mayol, B.R., Davis, M., and Rougraff, B.T. 1999. Extraskelatal Ewing's sarcoma. *Cancer* 85(3): 725-731.
- Anderson, D.M., Maraskovsky, E., Billingsley, W.L., Dougall, W.C., Tometsko, M.E., Roux, E.R., Teepe, M.C., DuBose, R.F., Cosman, D., and Galibert, L. 1997. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 390(6656): 175-179.
- Armstrong, A.C., Eaton, D., and Ewing, J.C. 2001. Science, medicine, and the future: Cellular immunotherapy for cancer. *Bmj* 323(7324): 1289-1293.
- Azuma, Y., Kaji, K., Katogi, R., Takeshita, S., and Kudo, A. 2000. Tumor necrosis factor-alpha induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts. *J Biol Chem* 275(7): 4858-4864.
- Bacci, G., Briccoli, A., Rocca, M., Ferrari, S., Donati, D., Longhi, A., Bertoni, F., Bacchini, P., Giacomini, S., Forni, C., Manfrini, M., and Galletti, S. 2003. Neoadjuvant chemotherapy for osteosarcoma of the extremities with metastases at presentation: recent experience at the Rizzoli Institute in 57 patients treated with cisplatin, doxorubicin, and a high dose of methotrexate and ifosfamide. *Ann Oncol* 14(7): 1126-1134.
- Body, J.J., Greipp, P., Coleman, R.E., Facon, T., Geurs, F., Femand, J.P., Harousseau, J.L., Lipton, A., Mariette, X., Williams, C.D., Nakanishi, A., Holloway, D., Martin, S.W., Dunstan, C.R., and Bekker, P.J. 2003. A phase I study of AMG-0007, a recombinant osteoprotegerin construct, in patients with multiple myeloma or breast carcinoma related bone metastases. *Cancer* 97(3 Suppl): 887-892.
- Borset, M., Hjertner, O., Yaccoby, S., Epstein, J., and Sanderson, R.D. 2000. Syndecan-1 is targeted to the uropods of polarized myeloma cells where it promotes adhesion and sequesters heparin-binding proteins. *Blood* 96(7): 2528-2536.
- Brandstrom, H., Bjorkman, T., and Ljunggren, O. 2001. Regulation of osteoprotegerin secretion from primary cultures of human bone marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 280(3): 831-835.
- Brounais, B. 2006. Implication des facteurs de transcription STATs dans les effets de l'oncostatine M sur l'apoptose des ostéosarcomes. Page 7.
- Bucay, N., Sarosi, I., Dunstan, C.R., Morony, S., Tarpley, J., Capparelli, C., Scully, S., Tan, H.L., Xu, W., Lacey, D.L., Boyle, W.J., and Simonet, W.S. 1998. osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 12(9): 1260-1268.
- Capparelli, C., Kostenuik, P.J., Morony, S., Starnes, C., Weimann, B., Van, G., Scully, S., Qi, M., Lacey, D.L., and Dunstan, C.R. 2000. Osteoprotegerin prevents and reverses hypercalcemia in a murine model of humoral hypercalcemia of malignancy. *Cancer Res* 60(4): 783-787.

Chambers, T.J. 1988. The regulation of osteoclastic development and function. *Ciba Found Symp* 136: 92-107.

Collin-Osdoby, P., Rothe, L., Anderson, F., Nelson, M., Maloney, W., and Osdoby, P. 2001. Receptor activator of NF-kappa B and osteoprotegerin expression by human microvascular endothelial cells, regulation by inflammatory cytokines, and role in human osteoclastogenesis. *J Biol Chem* 276(23): 20659-20672.

Collin, P., Guenther, H.L., and Fleisch, H. 1992. Constitutive expression of osteoclast-stimulating activity by normal clonal osteoblast-like cells: effects of parathyroid hormone and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Endocrinology* 131(3): 1181-1187.

Davis, I.D., Jefford, M., Parente, P., and Cebon, J. 2003. Rational approaches to human cancer immunotherapy. *J Leukoc Biol* 73(1): 3-29.

de Vries, T.J., Schoenmaker, T., Beertsen, W., van der Neut, R., and Everts, V. 2005. Effect of CD44 deficiency on in vitro and in vivo osteoclast formation. *J Cell Biochem* 94(5): 954-966.

Dempster, D.W., Hughes-Begos, C.E., Plavetic-Chee, K., Brandao-Burch, A., Cosman, F., Nieves, J., Neubort, S., Lu, S.S., Iida-Klein, A., Arnett, T., and Lindsay, R. 2005. Normal human osteoclasts formed from peripheral blood monocytes express PTH type 1 receptors and are stimulated by PTH in the absence of osteoblasts. *J Cell Biochem* 95(1): 139-148.

Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Shelton, T.E., Even, J., and Rosenberg, S.A. 2003. Generation of tumor-infiltrating lymphocyte cultures for use in adoptive transfer therapy for melanoma patients. *J Immunother* 26(4): 332-342.

Dupuy, C. 2000. Ostéoporose. Page consultée le: 31 juillet 2006. Adresse: [http://www.frm.org/informez/info\\_ressources\\_dossiers\\_article\\_sommaire.php?id=8&type=10&numeroChapitre=](http://www.frm.org/informez/info_ressources_dossiers_article_sommaire.php?id=8&type=10&numeroChapitre=)

Eilon, G., and Mundy, G.R. 1978. Direct resorption of bone by human breast cancer cells in vitro. *Nature* 276(5689): 726-728.

Elhilali, M.M., Gleave, M., Fradet, Y., Davis, I., Venner, P., Saad, F., Klotz, L., Moore, R., Ernst, S., and Paton, V. 2000. Placebo-associated remissions in a multicentre, randomized, double-blind trial of interferon gamma-1b for the treatment of metastatic renal cell carcinoma. The Canadian Urologic Oncology Group. *BJU Int* 86(6): 613-618.

Emery, J.G., McDonnell, P., Burke, M.B., Deen, K.C., Lyn, S., Silverman, C., Dul, E., Appelbaum, E.R., Eichman, C., DiPrinzio, R., Dodds, R.A., James, I.E., Rosenberg, M., Lee, J.C., and Young, P.R. 1998. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 273(23): 14363-14367.

Encyclopédie Médico-Chirurgicale 14-704 Ostéosarcome de forme commune

Encyclopédie Médico-Chirurgicale 14-716 Chondrosarcomes intraosseux

Encyclopédie Médico-Chirurgicale 14-756. Sarcome d'Ewing

Encyclopédie Médico-Chirurgicale 14-772 Tumeurs à cellules géantes

Fawcett, D.W. 1994. Bone. A textbook of histology. Chapman & Hall : New York: 194-233.

Feng, X. 2005. Regulatory roles and molecular signaling of TNF family members in osteoclasts. *Gene* 350(1): 1-13.

Franz-Odenaal, T.A., Hall, B.K., and Witten, P.E. 2006. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn* 235(1): 176-190.

Fuller, K., Wong, B., Fox, S., Choi, Y., and Chambers, T.J. 1998. TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts. *J Exp Med* 188(5): 997-1001.

Gao, Y.H., Shinki, T., Yuasa, T., Kataoka-Enomoto, H., Komori, T., Suda, T., and Yamaguchi, A. 1998. Potential role of cbfa1, an essential transcriptional factor for osteoblast differentiation, in osteoclastogenesis: regulation of mRNA expression of osteoclast differentiation factor (ODF). *Biochem Biophys Res Commun* 252(3): 697-702.

Girasole, G., Jilka, R.L., Passeri, G., Boswell, S., Boder, G., Williams, D.C., and Manolagas, S.C. 1992. 17 beta-estradiol inhibits interleukin-6 production by bone marrow-derived stromal cells and osteoblasts in vitro: a potential mechanism for the antiosteoporotic effect of estrogens. *J Clin Invest* 89(3): 883-891.

Giuliani, N., Bataille, R., Mancini, C., Lazzaretti, M., and Barille, S. 2001. Myeloma cells induce imbalance in the osteoprotegerin/osteoprotegerin ligand system in the human bone marrow environment. *Blood* 98(13): 3527-3533.

Grey, A., Mitnick, M.A., Shapses, S., Ellison, A., Gundberg, C., and Insogna, K. 1996. Circulating levels of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha are elevated in primary hyperparathyroidism and correlate with markers of bone resorption--a clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab* 81(10): 3450-3454.

Grimaud, E., Soubigou, L., Couillaud, S., Coipeau, P., Moreau, A., Passuti, N., Gouin, F., Redini, F., and Heymann, D. 2003. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL)/osteoprotegerin (OPG) ratio is increased in severe osteolysis. *Am J Pathol* 163(5): 2021-2031.

Guise, T.A., and Mundy, G.R. 1998. Cancer and bone. *Endocr Rev* 19(1): 18-54.

Hansen, M.F., Nellisery, M.J., and Bhatia, P. 1999. Common mechanisms of osteosarcoma and Paget's disease. *J Bone Miner Res* 14 Suppl 2: 39-44.

Hattersley, G., and Chambers, T.J. 1989. Generation of osteoclasts from hemopoietic cells and a multipotential cell line in vitro. *J Cell Physiol* 140(3): 478-482.

- Heinrich, P.C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H.M., Muller-Newen, G., and Schaper, F. 2003. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 374(Pt 1): 1-20.
- Heymann, D., and Rousselle, A.V. 2000. gp130 Cytokine family and bone cells. *Cytokine* 12(10): 1455-1468.
- Hill, P.A. 1998. Bone remodelling. *Br J Orthod* 25(2): 101-107.
- Hofbauer, L.C., Dunstan, C.R., Spelsberg, T.C., Riggs, B.L., and Khosla, S. 1998. Osteoprotegerin production by human osteoblast lineage cells is stimulated by vitamin D, bone morphogenetic protein-2, and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* 250(3): 776-781.
- Hofbauer, L.C., Gori, F., Riggs, B.L., Lacey, D.L., Dunstan, C.R., Spelsberg, T.C., and Khosla, S. 1999. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrinology* 140(10): 4382-4389.
- Hofbauer, L.C., Khosla, S., Dunstan, C.R., Lacey, D.L., Boyle, W.J., and Riggs, B.L. 2000. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res* 15(1): 2-12.
- Holtrop, M.E., and King, G.J. 1977. The ultrastructure of the osteoclast and its functional implications. *Clin Orthop Relat Res* 123(123): 177-196.
- Horwood, N.J., Elliott, J., Martin, T.J., and Gillespie, M.T. 1998. Osteotropic agents regulate the expression of osteoclast differentiation factor and osteoprotegerin in osteoblastic stromal cells. *Endocrinology* 139(11): 4743-4746.
- Hotokezaka, H., Sakai, E., Kanaoka, K., Saito, K., Matsuo, K., Kitaura, H., Yoshida, N., and Nakayama, K. 2002. U0126 and PD98059, specific inhibitors of MEK, accelerate differentiation of RAW264.7 cells into osteoclast-like cells. *J Biol Chem* 277(49): 47366-47372.
- Hsu, H., Lacey, D.L., Dunstan, C.R., Solovyev, I., Colombero, A., Timms, E., Tan, H.L., Elliott, G., Kelley, M.J., Sarosi, I., Wang, L., Xia, X.Z., Elliott, R., Chiu, L., Black, T., Scully, S., Capparelli, C., Morony, S., Shimamoto, G., Bass, M.B., and Boyle, W.J. 1999. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(7): 3540-3545.
- Hsueh, E.C., Gupta, R.K., Qi, K., and Morton, D.L. 1998. Correlation of specific immune responses with survival in melanoma patients with distant metastases receiving polyvalent melanoma cell vaccine. *J Clin Oncol* 16(9): 2913-2920.
- Huang, J.C., Sakata, T., Pflieger, L.L., Bencsik, M., Halloran, B.P., Bikle, D.D., and Nissenson, R.A. 2004. PTH differentially regulates expression of RANKL and OPG. *J Bone Miner Res* 19(2): 235-244.

- Ikeda, T., Kasai, M., Utsuyama, M., and Hirokawa, K. 2001. Determination of three isoforms of the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and their differential expression in bone and thymus. *Endocrinology* 142(4): 1419-1426.
- Ishida, N., Hayashi, K., Hoshijima, M., Ogawa, T., Koga, S., Miyatake, Y., Kumegawa, M., Kimura, T., and Takeya, T. 2002. Large scale gene expression analysis of osteoclastogenesis in vitro and elucidation of NFAT2 as a key regulator. *J Biol Chem* 277(43): 41147-41156.
- Jimi, E., Nakamura, I., Amano, H., Taguchi, Y., Tsurukai, T., Tamura, M., Takahashi, N., and Suda, T. 1996. Osteoclast function is activated by osteoblastic cells through a mechanism involving cell-to-cell contact. *Endocrinology* 137(8): 2187-2190.
- Jimi, E., Nakamura, I., Duong, L.T., Ikebe, T., Takahashi, N., Rodan, G.A., and Suda, T. 1999. Interleukin 1 induces multinucleation and bone-resorbing activity of osteoclasts in the absence of osteoblasts/stromal cells. *Exp Cell Res* 247(1): 84-93.
- Kitamura, H., Kawata, H., Takahashi, F., Higuchi, Y., Furuichi, T., and Ohkawa, H. 1995. Bone marrow neutrophilia and suppressed bone turnover in human interleukin-6 transgenic mice. A cellular relationship among hematopoietic cells, osteoblasts, and osteoclasts mediated by stromal cells in bone marrow. *Am J Pathol* 147(6): 1682-1692.
- Klein, B., Zhang, X.G., Jourdan, M., Boiron, J.M., Portier, M., Lu, Z.Y., Wijdenes, J., Brochier, J., and Bataille, R. 1990. Interleukin-6 is the central tumor growth factor in vitro and in vivo in multiple myeloma. *Eur Cytokine Netw* 1(4): 193-201.
- Kobayashi, K., Takahashi, N., Jimi, E., Udagawa, N., Takami, M., Kotake, S., Nakagawa, N., Kinoshita, M., Yamaguchi, K., Shima, N., Yasuda, H., Morinaga, T., Higashio, K., Martin, T.J., and Suda, T. 2000. Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *J Exp Med* 191(2): 275-286.
- Kodama, H., Nose, M., Niida, S., and Yamasaki, A. 1991. Essential role of macrophage colony-stimulating factor in the osteoclast differentiation supported by stromal cells. *J Exp Med* 173(5): 1291-1294.
- Kong, Y.Y., Feige, U., Sarosi, I., Bolon, B., Tafuri, A., Morony, S., Capparelli, C., Li, J., Elliott, R., McCabe, S., Wong, T., Campagnuolo, G., Moran, E., Bogoch, E.R., Van, G., Nguyen, L.T., Ohashi, P.S., Lacey, D.L., Fish, E., Boyle, W.J., and Penninger, J.M. 1999a. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* 402(6759): 304-309.
- Kong, Y.Y., Yoshida, H., Sarosi, I., Tan, H.L., Timms, E., Capparelli, C., Morony, S., Oliveira-dos-Santos, A.J., Van, G., Itie, A., Khoo, W., Wakeham, A., Dunstan, C.R., Lacey, D.L., Mak, T.W., Boyle, W.J., and Penninger, J.M. 1999b. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 397(6717): 315-323.
- Kotake, S., Sato, K., Kim, K.J., Takahashi, N., Udagawa, N., Nakamura, I., Yamaguchi, A., Kishimoto, T., Suda, T., and Kashiwazaki, S. 1996. Interleukin-6 and soluble interleukin-6

receptors in the synovial fluids from rheumatoid arthritis patients are responsible for osteoclast-like cell formation. *J Bone Miner Res* 11(1): 88-95.

Kudo, O., Sabokbar, A., Pocock, A., Itonaga, I., Fujikawa, Y., and Athanasou, N.A. 2003. Interleukin-6 and interleukin-11 support human osteoclast formation by a RANKL-independent mechanism. *Bone* 32(1): 1-7.

Kwan Tat, S., Padrines, M., Theoleyre, S., Heymann, D., and Fortun, Y. 2004. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev* 15(1): 49-60.

Lacey, D.L., Timms, E., Tan, H.L., Kelley, M.J., Dunstan, C.R., Burgess, T., Elliott, R., Colombero, A., Elliott, G., Scully, S., Hsu, H., Sullivan, J., Hawkins, N., Davy, E., Capparelli, C., Eli, A., Qian, Y.X., Kaufman, S., Sarosi, I., Shalhoub, V., Senaldi, G., Guo, J., Delaney, J., and Boyle, W.J. 1998. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93(2): 165-176.

Lakkakorpi, P.T., Helfrich, M.H., Horton, M.A., and Vaananen, H.K. 1993. Spatial organization of microfilaments and vitronectin receptor, alpha v beta 3, in osteoclasts. A study using confocal laser scanning microscopy. *J Cell Sci* 104 ( Pt 3)(Pt 3): 663-670.

Lakkakorpi, P.T., and Vaananen, H.K. 1996. Cytoskeletal changes in osteoclasts during the resorption cycle. *Microsc Res Tech* 33(2): 171-181.

Lakkakorpi, P.T., Wesolowski, G., Zimolo, Z., Rodan, G.A., and Rodan, S.B. 1997. Phosphatidylinositol 3-kinase association with the osteoclast cytoskeleton, and its involvement in osteoclast attachment and spreading. *Exp Cell Res* 237(2): 296-306.

Lee, S.E., Woo, K.M., Kim, S.Y., Kim, H.M., Kwack, K., Lee, Z.H., and Kim, H.H. 2002. The phosphatidylinositol 3-kinase, p38, and extracellular signal-regulated kinase pathways are involved in osteoclast differentiation. *Bone* 30(1): 71-77.

Lens, M.B., and Dawes, M. 2002. Interferon alfa therapy for malignant melanoma: a systematic review of randomized controlled trials. *J Clin Oncol* 20(7): 1818-1825.

Li, J., Sarosi, I., Yan, X.Q., Morony, S., Capparelli, C., Tan, H.L., McCabe, S., Elliott, R., Scully, S., Van, G., Kaufman, S., Juan, S.C., Sun, Y., Tarpley, J., Martin, L., Christensen, K., McCabe, J., Kostenuik, P., Hsu, H., Fletcher, F., Dunstan, C.R., Lacey, D.L., and Boyle, W.J. 2000. RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(4): 1566-1571.

Luger, N.M., Honore, P., Sabino, M.A., Schwei, M.J., Rogers, S.D., Mach, D.B., Clohisy, D.R., and Mantyh, P.W. 2001. Osteoprotegerin diminishes advanced bone cancer pain. *Cancer Res* 61(10): 4038-4047.

Machwate, M., Zerath, E., Holy, X., Hott, M., Godet, D., Lomri, A., and Marie, P.J. 1995. Systemic administration of transforming growth factor-beta 2 prevents the impaired bone formation and osteopenia induced by unloading in rats. *J Clin Invest* 96(3): 1245-1253.

- Malaval, L., Chenu, C., and Delmas, P.D. 1996. Protéine de l'os : maladies systémiques osseuses de l'adulte. D. Kuntz, édition Flammarion: 17-35.
- Manolagas, S.C., and Jilka, R.L. 1995. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N Engl J Med* 332(5): 305-311.
- Min, H., Morony, S., Sarosi, I., Dunstan, C.R., Capparelli, C., Scully, S., Van, G., Kaufman, S., Kostenuik, P.J., Lacey, D.L., Boyle, W.J., and Simonet, W.S. 2000. Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis. *J Exp Med* 192(4): 463-474.
- Min, J.K., Kim, Y.M., Kim, Y.M., Kim, E.C., Gho, Y.S., Kang, I.J., Lee, S.Y., Kong, Y.Y., and Kwon, Y.G. 2003. Vascular endothelial growth factor up-regulates expression of receptor activator of NF-kappa B (RANK) in endothelial cells. Concomitant increase of angiogenic responses to RANK ligand. *J Biol Chem* 278(41): 39548-39557.
- Minami, M., Inoue, M., Wei, S., Takeda, K., Matsumoto, M., Kishimoto, T., and Akira, S. 1996. STAT3 activation is a critical step in gp130-mediated terminal differentiation and growth arrest of a myeloid cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(9): 3963-3966.
- Motyckova, G., Weilbaecher, K.N., Horstmann, M., Rieman, D.J., Fisher, D.Z., and Fisher, D.E. 2001. Linking osteopetrosis and pycnodysostosis: regulation of cathepsin K expression by the microphthalmia transcription factor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(10): 5798-5803.
- Nakagawa, N., Kinosaki, M., Yamaguchi, K., Shima, N., Yasuda, H., Yano, K., Morinaga, T., and Higashio, K. 1998. RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 253(2): 395-400.
- Nakashima, T., Kobayashi, Y., Yamasaki, S., Kawakami, A., Eguchi, K., Sasaki, H., and Sakai, H. 2000. Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* 275(3): 768-775.
- Nakashima, T., Wada, T., and Penninger, J.M. 2003. RANKL and RANK as novel therapeutic targets for arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 15(3): 280-287.
- Nanes, M.S. 2003. Tumor necrosis factor-alpha: molecular and cellular mechanisms in skeletal pathology. *Gene* 321: 1-15.
- O'Brien, C.A., Gubrij, I., Lin, S.C., Saylor, R.L., and Manolagas, S.C. 1999. STAT3 activation in stromal/osteoblastic cells is required for induction of the receptor activator of NF-kappaB ligand and stimulation of osteoclastogenesis by gp130-utilizing cytokines or interleukin-1 but not 1,25-dihydroxyvitamin D3 or parathyroid hormone. *J Biol Chem* 274(27): 19301-19308.
- Owen, M. 1988. Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci Suppl* 10: 63-76.
- Owen, T.A., Bortell, R., Yocum, S.A., Smock, S.L., Zhang, M., Abate, C., Shalhoub, V., Aronin, N., Wright, K.L., van Wijnen, A.J., and et al. 1990. Coordinate occupancy of AP-1

sites in the vitamin D-responsive and CCAAT box elements by Fos-Jun in the osteocalcin gene: model for phenotype suppression of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(24): 9990-9994.

Pacifici, R. 1996. Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 11(8): 1043-1051.

Pacifici, R. 1998. Cytokines, estrogen, and postmenopausal osteoporosis--the second decade. *Endocrinology* 139(6): 2659-2661.

Palmqvist, P., Persson, E., Conaway, H.H., and Lerner, U.H. 2002. IL-6, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M stimulate bone resorption and regulate the expression of receptor activator of NF-kappa B ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF-kappa B in mouse calvariae. *J Immunol* 169(6): 3353-3362.

Panelli, M.C., Wunderlich, J., Jeffries, J., Wang, E., Mixon, A., Rosenberg, S.A., and Marincola, F.M. 2000. Phase 1 study in patients with metastatic melanoma of immunization with dendritic cells presenting epitopes derived from the melanoma-associated antigens MART-1 and gp100. *J Immunother* 23(4): 487-498.

Renkvist, N., Castelli, C., Robbins, P.F., and Parmiani, G. 2001. A listing of human tumor antigens recognized by T cells. *Cancer Immunol Immunother* 50(1): 3-15.

Rodan, G.A., and Martin, T.J. 1981. Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption--a hypothesis. *Calcif Tissue Int* 33(4): 349-351.

Roodman, G.D. 2001. Studies in Paget's disease and their relevance to oncology. *Semin Oncol* 28(4 Suppl 11): 15-21.

Roodman, G.D., and Windle, J.J. 2005. Paget disease of bone. *J Clin Invest* 115(2): 200-208.

Rosenberg, S.A., Yang, J.C., Schwartzenuber, D.J., Hwu, P., Marincola, F.M., Topalian, S.L., Restifo, N.P., Sznol, M., Schwarz, S.L., Spiess, P.J., Wunderlich, J.R., Seipp, C.A., Einhorn, J.H., Rogers-Freezer, L., and White, D.E. 1999. Impact of cytokine administration on the generation of antitumor reactivity in patients with metastatic melanoma receiving a peptide vaccine. *J Immunol* 163(3): 1690-1695.

Saftig, P., Hunziker, E., Wehmeyer, O., Jones, S., Boyde, A., Rommerskirch, W., Moritz, J.D., Schu, P., and von Figura, K. 1998. Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(23): 13453-13458.

Saika, M., Inoue, D., Kido, S., and Matsumoto, T. 2001. 17beta-estradiol stimulates expression of osteoprotegerin by a mouse stromal cell line, ST-2, via estrogen receptor-alpha. *Endocrinology* 142(6): 2205-2212.

Saltel, F., Bonnelye, E., Chabadel, A., Lafage-Proust, M., and Jurdic, P. 2005. La transmigration, une nouvelle propriété des ostéoclastes matures, est dépendante des c-src, des MMP et est contrôlée par le risendronate. [Résumé] 8ème congrès des JFBTM.

- Simonet, W.S., Lacey, D.L., Dunstan, C.R., Kelley, M., Chang, M.S., Luthy, R., Nguyen, H.Q., Wooden, S., Bennett, L., Boone, T., Shimamoto, G., DeRose, M., Elliott, R., Colombero, A., Tan, H.L., Trail, G., Sullivan, J., Davy, E., Bucay, N., Renshaw-Gegg, L., Hughes, T.M., Hill, D., Pattison, W., Campbell, P., Sander, S., Van, G., Tarpley, J., Derby, P., Lee, R., and Boyle, W.J. 1997. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89(2): 309-319.
- Sims, N.A., Jenkins, B.J., Quinn, J.M., Nakamura, A., Glatt, M., Gillespie, M.T., Ernst, M., and Martin, T.J. 2004. Glycoprotein 130 regulates bone turnover and bone size by distinct downstream signaling pathways. *J Clin Invest* 113(3): 379-389.
- Sordillo, E.M., and Pearse, R.N. 2003. RANK-Fc: a therapeutic antagonist for RANK-L in myeloma. *Cancer* 97(3 Suppl): 802-812.
- Suda, T., Takahashi, N., and Martin, T.J. 1992. Modulation of osteoclast differentiation. *Endocr Rev* 13(1): 66-80.
- Suda, T., Udagawa, N., Nakamura, I., Miyaura, C., and Takahashi, N. 1995. Modulation of osteoclast differentiation by local factors. *Bone* 17(2 Suppl): 87S-91S.
- Suda, T., Takahashi, N., Udagawa, N., Jimi, E., Gillespie, M.T., and Martin, T.J. 1999. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 20(3): 345-357.
- Sudo, T., Kuramoto, T., Komiya, S., Inoue, A., and Itoh, K. 1997. Expression of MAGE genes in osteosarcoma. *J Orthop Res* 15(1): 128-132.
- Suzuki, J., Ikeda, T., Kuroyama, H., Seki, S., Kasai, M., Utsuyama, M., Tatsumi, M., Uematsu, H., and Hirokawa, K. 2004. Regulation of osteoclastogenesis by three human RANKL isoforms expressed in NIH3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 314(4): 1021-1027.
- Takahashi, N., Akatsu, T., Udagawa, N., Sasaki, T., Yamaguchi, A., Moseley, J.M., Martin, T.J., and Suda, T. 1988. Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. *Endocrinology* 123(5): 2600-2602.
- Tamura, T., Udagawa, N., Takahashi, N., Miyaura, C., Tanaka, S., Yamada, Y., Koishihara, Y., Ohsugi, Y., Kumaki, K., Taga, T., and et al. 1993. Soluble interleukin-6 receptor triggers osteoclast formation by interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(24): 11924-11928.
- Terpos, E., Szydlo, R., Apperley, J.F., Hatjiharissi, E., Politou, M., Meletis, J., Viniou, N., Yataganas, X., Goldman, J.M., and Rahemtulla, A. 2003. Soluble receptor activator of nuclear factor kappaB ligand-osteoprotegerin ratio predicts survival in multiple myeloma: proposal for a novel prognostic index. *Blood* 102(3): 1064-1069.
- Theoleyre, S., Wittrant, Y., Tat, S.K., Fortun, Y., Redini, F., and Heymann, D. 2004. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev* 15(6): 457-475.

- Thirunavukkarasu, K., Miles, R.R., Halladay, D.L., Yang, X., Galvin, R.J., Chandrasekhar, S., Martin, T.J., and Onyia, J.E. 2001. Stimulation of osteoprotegerin (OPG) gene expression by transforming growth factor-beta (TGF-beta). Mapping of the OPG promoter region that mediates TGF-beta effects. *J Biol Chem* 276(39): 36241-36250.
- Tsuda, N., Murayama, K., Ishida, H., Matsunaga, K., Komiya, S., Itoh, K., and Yamada, A. 2001. Expression of a newly defined tumor-rejection antigen SART3 in musculoskeletal tumors and induction of HLA class I-restricted cytotoxic T lymphocytes by SART3-derived peptides. *J Orthop Res* 19(3): 346-351.
- Turner, C.H., and Pavalko, F.M. 1998. Mechanotransduction and functional response of the skeleton to physical stress: the mechanisms and mechanics of bone adaptation. *J Orthop Sci* 3(6): 346-355.
- Udagawa, N., Takahashi, N., Katagiri, T., Tamura, T., Wada, S., Findlay, D.M., Martin, T.J., Hirota, H., Taga, T., Kishimoto, T., and Suda, T. 1995. Interleukin (IL)-6 induction of osteoclast differentiation depends on IL-6 receptors expressed on osteoblastic cells but not on osteoclast progenitors. *J Exp Med* 182(5): 1461-1468.
- Vassal, G. 2002. Ostéosarcome. Page consultée le: 31 juillet 2006. Adresse: <http://www.orpha.net/static/FR/osteosarcome.html>
- Wada, T., Nakashima, T., Hiroshi, N., and Penninger, J.M. 2006. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med* 12(1): 17-25.
- Weber, M.H., Goltzman, D., Kostenuik, P., Rabbani, S., Singh, G., Duivenvoorden, W.C., and Orr, F.W. 2000. Mechanisms of tumor metastasis to bone. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 10(3-4): 281-302.
- Whelan, J.S. 1997. Osteosarcoma. *Eur J Cancer* 33(10): 1611-1618; discussion 1618-1619.
- Wittrant, Y., Theoleyre, S., Couillaud, S., Dunstan, C., Heymann, D., and Redini, F. 2004. Relevance of an in vitro osteoclastogenesis system to study receptor activator of NF-kB ligand and osteoprotegerin biological activities. *Exp Cell Res* 293(2): 292-301.
- Wong, B.R., Besser, D., Kim, N., Arron, J.R., Vologodskaja, M., Hanafusa, H., and Choi, Y. 1999. TRANCE, a TNF family member, activates Akt/PKB through a signaling complex involving TRAF6 and c-Src. *Mol Cell* 4(6): 1041-1049.
- Wu, X., McKenna, M.A., Feng, X., Nagy, T.R., and McDonald, J.M. 2003. Osteoclast apoptosis: the role of Fas in vivo and in vitro. *Endocrinology* 144(12): 5545-5555.
- Yamaguchi, K., Kinosaki, M., Goto, M., Kobayashi, F., Tsuda, E., Morinaga, T., and Higashio, K. 1998. Characterization of structural domains of human osteoclastogenesis inhibitory factor. *J Biol Chem* 273(9): 5117-5123.
- Yao, Z., Li, P., Zhang, Q., Schwarz, E.M., Keng, P., Arbini, A., Boyce, B.F., and Xing, L. 2006. Tumor necrosis factor-alpha increases circulating osteoclast precursor numbers by promoting their proliferation and differentiation in the bone marrow through up-regulation of c-Fms expression. *J Biol Chem* 281(17): 11846-11855.

Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Mochizuki, S.I., Yano, K., Fujise, N., Sato, Y., Goto, M., Yamaguchi, K., Kuriyama, M., Kanno, T., Murakami, A., Tsuda, E., Morinaga, T., and Higashio, K. 1998a. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* 139(3): 1329-1337.

Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K., Kinoshita, M., Mochizuki, S., Tomoyasu, A., Yano, K., Goto, M., Murakami, A., Tsuda, E., Morinaga, T., Higashio, K., Udagawa, N., Takahashi, N., and Suda, T. 1998b. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(7): 3597-3602.

Young, D.R., and Kobluk, C.N. 1995. Disease of Bone. *The horse: disease and clinical management*: 737-790.

Zhang, J., Dai, J., Yao, Z., Lu, Y., Dougall, W., and Keller, E.T. 2003. Soluble receptor activator of nuclear factor kappaB Fc diminishes prostate cancer progression in bone. *Cancer Res* 63(22): 7883-7890.

Zhang, Z., Welte, T., Troiano, N., Maher, S.E., Fu, X.Y., and Bothwell, A.L. 2005. Osteoporosis with increased osteoclastogenesis in hematopoietic cell-specific STAT3-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* 328(3): 800-807.

# **ANNEXES**

**Annexe 1**

Caractéristiques des différents couples d'amorces utilisés pour les réactions de RT-PCR

ARNm amplifié	Origine	Taille (pb)	Primer sens	Primer antisens	Température d'hybridation	Nombre de cycles
18S	souris	462	TCAAGAACGAAAGTCGGAGGTTTCG	TTATTGCTCAAATCTCGGGTGGCTG	62°C	25
CTR	souris	444	CTGCTCCTAGTGAGCCCAA	CAGCAAATCGACAAGGAGTGA	62°C	35
TRAP	souris	316	AAATCACTCTTTAAGACCA	TTATTGAAATAGCAGTGACAG	62°C	35
RANK	souris	350	AAGATGGTTCAGAAAGACGGT	CATAGAGTCAGTTCTGCTCGGA	62°C	35
Emr1	souris	391	GAATTCTCCTTGTATATCATCAGC	GCAGAGATTATGACCACCAGG	62°C	35
CD11b	souris	343	CTTAAAAGCTCTTCTGGTCCACAGCC	GTATTCTCCTTGCAGTTTGGTGC	62°C	35
Cath K	souris	324	GGGCCAGGATGAAAGTTGTA	CCGAGCCAAGAGAGCATATC	62°C	35

## Annexe 2

### Tampon de lyse (RIPA buffer)

Tris HCl pH 7,5 (Merck, Damstadt, Allemagne)	50 mM
NaCl (Merck)	150 mM
NaF (Sigma)	50 mM
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> (Sigma)	1 mM
Sodium déoxycholate (Sigma)	0.25%
Nonidet P-40 (Sigma)	1%

A ajouter extemporanément :

Aprotinine (Sigma)	10 µg/ml
Leupeptine (Sigma)	10 µg/ml
Phénylméthylsulfonylfluoride PMSF (Sigma)	0.5 mM

### Tampon de migration

Tris (Sigma)	25mM
Glycine (Merck)	192mM
Sodium Dodecyl Sulfate : SDS (Sigma)	0,1%

### Gel de migration

Acrylamide (Sigma)	10%
Tris pH = 8,8	375mM
SDS (Sigma)	0,1%
APS (Sigma)	0,1%
TEMED (Sigma)	0,04%

---

UNIVERSITE DE NANTES  
FACULTE DE PHARMACIE

---

Nom – Prénoms : BAUD'HUIN Marc

Titre de la Thèse : Implication de l'IL-6, du M-CSF et du TNF $\alpha$  dans la différenciation ostéoclastique

---

Résumé de la thèse :

L'IL-6, cytokine libérée dans les processus inflammatoires, est responsable de la perte osseuse associée à de nombreuses maladies : ostéoporose post-ménopausique, myélomes multiples, maladie de Paget,... Certaines études ont montré ce rôle pro-ostéoclastogénique dans différents modèles nécessitant l'ajout de récepteur soluble à l'IL-6. Pourtant, des auteurs ont rapporté un effet anti-ostéoclastogénique de l'IL-6.

Les études *in vitro* menées sur la lignée RAW 264.7 démontrent que l'IL-6 est un inhibiteur de l'ostéoclastogenèse induite par RANKL (ou TNF $\alpha$ ) en favorisant la voie macrophagique par rapport à la voie ostéoclastique. L'étude, par des inhibiteurs spécifiques (chimique ou peptidique), des voies de signalisation activées par l'IL-6, n'a pas mis en évidence l'implication des voies MAPKinase et PI3Kinase dans les effets de l'IL-6. Cependant nous avons démontré un rôle important du facteur de transcription STAT3 dans les voies de différenciation (macrophages ou ostéoclastes) que les cellules RAW 264.7 peuvent emprunter.

Le M-CSF est également un inhibiteur de l'ostéoclastogenèse en induisant une prolifération des précurseurs ostéoclastiques.

---

Mots clés :

RAW 264.7, ostéoclastogenèse, IL-6, RANKL.

---

JURY

Président : M. Jean-Yves PETIT, Professeur de Pharmacologie  
Faculté de Pharmacie de Nantes

Assesseurs : M. Dominique HEYMANN, Maître de Conférences d'Histologie  
Faculté de Médecine de Nantes  
Mme Christine BOBIN-DUBIGEON, Maître de Conférences de Pharmacologie  
Faculté de Pharmacie de Nantes

---

Adresse de l'auteur : 6 rue du général Buat 44000 NANTES