

Université de Nantes
Faculté de Médecine

**LA MODULATION DE LA BIODISPONIBILITÉ DE L'OSTÉOPROTÉGÉRINE PAR
LES ISOFORMES MEMBRANAIRES DE RANKL ET PAR LA RECHERCHE DE
PROTÉASES IMPLIQUÉES DANS LEUR CLIVAGE.**

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale « Chimie-Biologie »
Discipline Science de la Vie et de la Santé
Spécialité Biologie Cellulaire et Moléculaire

Présentée et soutenue publiquement par

KWAN TAT Steeve

Le 25 Septembre 2006, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs

Mr GALERA Philippe
Mr GODEAU Gaston

Professeur, Faculté de Médecine, CAEN
Professeur, Faculté de Chirurgie Dentaire, MONTROUGE

Examineurs

Mr COLAS Bernard
Mr HEYMANN Dominique

Professeur, Faculté des Sciences, NANTES
Maître de Conférences, Faculté de Médecine, NANTES (HDR)

Directeurs de thèse

Mr FORTUN Yannick
Mr PADRINES Marc

Maître de Conférences, IUT, ANGERS (HDR)
Maître de Conférences, Faculté des Sciences, NANTES (HDR)

Ce travail a été réalisé dans le :

**LABORATOIRE DE PHYSIOPHATOLOGIE OSSEUSE ET THERAPIE DES TUMEURS
OSSEUSES PRIMITIVES - EA 3822 - INSERM ERI7**

Faculté de Médecine - 1 rue Gaston Veil 44 035 NANTES cedex 1, FRANCE

Tel: +33 (0) 240 412 845 – fax : +33 (0) 240 412 860

SOMMAIRE

ABREVIATIONS	5
INTRODUCTION	9
1. L'ostéoblaste	10
a) Origine et différenciation des ostéoblastes	10
b) Marqueurs phénotypiques des ostéoblastes	11
c) Fonction de l'ostéoblaste mature	11
2. L'ostéoclaste	12
3. Le remodelage osseux	13
4. La triade moléculaire OPG / RANK / RANKL	16
4.1 OPG (Ostéoprotégérine)	17
4.2 RANK (receptor activator of nuclear factor kappa B)	19
4.3 RANKL (RANK Ligand)	21
5. Shedding protéolytique	23
5.1 Les ADAM (A Disintegrin And Mettalloprotease)	24
5.2 Les MMP (Matrix MetalloProteinase)	25
5.3 Les métalloprotéases transmembranaires	26
6. Les protéoglycanes	28
6.1 Les glycosaminoglycanes (GAG)	28
6.2 Les protéoglycanes majeurs de l'os	29
7. Mécanismes d'internalisation et de dégradation intracellulaire des protéines	32
7.1 L'endocytose	32
7.3 Dégradation intracellulaire des protéines et des produits endocytés par la cellule	36
8. But de la thèse	37
MATERIELS ET METHODES	39
1) Clonage et transfection d'isoforme de RANKL de souris	40
a) Clonage du domaine intracytoplasmique (I')	40
b) Amplification de T-E (Transmembranaire et Extracellulaire)	41
c) Clonage de T-E dans le plasmide [pcDNA3 +/- I']	42
d) Transfection stable de cellules 293 par le plasmide pcDNA3-RANKL2.0 ou pcDNA3-RANKL2.1	42
2) Culture cellulaire	44
a) Ostéoblastes	45
b) Culture	45
c) Différenciation ostéoclastique	45
3) Analyse protéique	46
a) Elisa	46
b) Dosage protéique	46
c) Western Blot	47
d) Immunocytochimie	48
e) Cytométrie en flux	48
4) Analyse du niveau d'expression des transcrits	49
a) Extraction d'ARN	49
b) Gel de contrôle de l'intégrité des ARN	49
c) Traitement à la DNase	49
d) Reverse transcription (RT)	50
e) Polymerase chain reaction (PCR)	50
5) Etude de la fixation d'OPG radiomarquée	52
a) Technique du Scatchard	52
b) Incubation des cellules 293RL en présence d'OPG radiomarquée	55
6) Construction des vecteurs pSUPER ShTACE et pSUPER ShMT3	55
Oligonucléotides pour la synthèse de short hairpin RNA (shRNA)	55
Les lignées cellulaires	58

3. Production de particules lentivirales.....	60
4. Détermination du nombre de particules virales/ μL (Pv/ μL).....	61
5. Infection de cellules.....	61
7) AnalyseS statistiqueS des résultats.....	61
RESULTATS.....	63
Interaction OPG-RANKL.....	64
A. Expression de RANKL par les cellules 293RL.....	64
B) Etude de l'interaction OPG/cellules 293RL.....	65
C) Biodisponibilité de l'OPG dans le milieu extracellulaire.....	66
D) Détection d'OPG-Fc à l'intérieur des cellules 293RL.....	69
E) Étude de l'internalisation d'OPG par les cellules 293RL.....	71
F) Étude de l'internalisation par des cellules ostéoblastiques exprimant physiologiquement RANKL.....	73
1) Internalisation du complexe OPG-RANKL par les cellules ostéoblastiques.....	73
G) Étude de la demi-vie de RANKL.....	75
Isoformes de RANKL membranaire.....	78
A Transfection stable des isoformes de RANKL de souris.....	78
1) Cellules humaines de rein fœtal (293) transfectées stablement par les différentes isoformes de RANKL de souris.....	78
2) Localisation cellulaire de la protéine RANKL par les 293, 293RL, 293RL2.0 et 293RL2.1.....	79
3) Analyse de l'expression de RANKL à la surface des cellules.....	79
B) Modulation de la biodisponibilité d'OPG par les différentes isoformes.....	80
1) Cinétique de disparition d'OPG dans les surnageants de culture cellulaire.....	80
2) Analyse par microscopie confocale du devenir de l'OPG-Fc par les cellules 293, 293RL 293RL2.0 et 293RL2.1.....	81
Différenciation ostéoclastique.....	82
A) Différenciation ostéoclastique à partir de la lignée RAW 264.7 en présence de RANKL soluble.....	82
B) Différenciation ostéoclastique à partir de la lignée RAW en co-culture avec des cellules 293, 293RL, 293RL2.0 et 293RL2.1.....	83
Etude du clivage de RANKL membranaire.....	86
A) Influence de facteurs ostéotropiques sur la production de RANKL soluble.....	86
1) Dosage de RANKL soluble dans les surnageants de culture cellulaire des cellules 293 et 293RL.....	86
2) Effets de différents facteurs ostéotropiques sur la libération de RANKL soluble par les cellules 293RL.....	87
3) Effet du PMA sur l'expression du mRNA RANKL.....	88
4) L'influence d'un inhibiteur de la voie Erk1/2 sur la libération de RANKL.....	89
B) Recherche de protéases intervenant dans le clivage de RANKL membranaire.....	90
1) Influence d'un inhibiteur de métallosecretaise (TAPI-1) sur la libération de RANKL soluble par les cellules 293RL.....	90
2) Comparaison 293 et 293RL.....	90
3) Effets du ShRNA de Tace et de la MT3-MMP sur la production de RANKL soluble par les 293RL.....	91
DISCUSSION.....	93
CONCLUSION GENERALE.....	103
BIBLIOGRAPHIE.....	104
ANNEXE.....	121
Liste de publications.....	125

ABBREVIATIONS

ADAM : A Disintegrin And Metalloproteinase

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARN : Acide Ribonucléique

BCA : Bicinchoninic Acid

BET : Bromure d'Ethidium

BSA : Bovine Serum Albumin

BSP : Bone Sialo Protein

CCP : Clathrin Coated Pits

CD : Cluster Differentiation

CHX : cycloheximide

CS : Chondroïtine Sulfate

DEPC : Diéthylpyrocarbonate

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

dNTP : désoxyribo-Nucléotide TriPhosphate

dp4 : tétrasaccharide

dp10 : décacaccharide

DS : Dermatane Sulfate

DTT : Dithiothréitol

ECL : Electrochemiluminescence

EDTA : Ethylène Diamine Tétracétate

EGF : Epidermal Growth Factor

ERK : Extracellular signal-Regulated protein Kinase

FDCR-1 : Follicular Dendritic Cell Receptor 1

FGF : Fibroblast Growth Factor

FITC : Fluoresceine Iso Thio Cyanate

GAG : Glycosaminoglycane

GFP : Green Fluorescente Protein

GnRH : Gonadotropin-Releasing Hormone

HBS : HEPES buffered saline

HGF : Hepatocyte growth factor

HS : Héparane Sulfate

HSPG : Heparan Sulfate Proteoglycans

ICAM : InterCellular Adhesion Molecule

IL : Interleukine

JNK : c-Jun NH₂-terminal kinase

LB : Luria Bertani

LDL: low density lipoproteins

LIF : Leukemia Immunitary Factor

LTR : Long Terminal Repeat

MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase

M-CSF : Macrophage-Colony Stimulating Factor

MEM : minimum essential medium

MFI : Mean Fluorescence Intensity

MMLV-RT : Murine Moloney Leukemia Virus-Reverse Transcriptase

MMP : Matrix Metallo-Proteinase

MOPS : N-morpholino-propane-sulfonic acid

MT-MMP : Membrane Type Matrix Metalloproteinase

NF-kB : Nuclear Factor kappa B

OCIF: Osteoclastogenesis Inhibitory Factor

ODF : Osteoclast Differentiation Factor

OPG : Ostéoprotégérine

OPGL: Ostéoprotégérine Ligand

OSM : Oncostatin M

PAR-1 : Protease-Activated Receptor-1

PBS : Phosphate Buffered Saline

PCR : Polymerase Chain Reaction

PEI : Poly Ethylène Imine

PG : Protéoglycane

PKA : Protein Kinase A

PKC : Protein Kinase C

PMA: Phorbol-12-Myristate-13-Acetate

PMSF : Phenylmethylsulfonylfluoride

pSUPER : plasmid SUPpression of Endogenous RNA

PTH : hormone parathyroïdienne

PVDF : Polyfluorure De Vinylidène

RANK : Receptor Activator of Nuclear factor κ B

RANKL : RANK Ligand

RAS : Radioactivité Spécifique

RT : Reverse Transcription

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

shRNA : short hairpin RNA

SiRNA : Small interfering RNA

SVF : Sérum de Veau Foetal

TACE : TNF alpha Converting Enzyme

TAPI-1 : Tumor necrosis factor-Alpha Protease Inhibitor-1

TCA : acide trichloracétique

TCR : T-Cell Receptor

TGF : Transforming Growth Factor

TIMP : Tissue Inhibitors of Matrix Metallo-Proteinase

TMB : Tetramethylbenzidine

TNF : Tumor Necrosis Factor

TNFR : TNF Receptor

TR1 : TNF Receptor related molecule 1

TRAF : Tumor necrosis factor Receptor Associated Factor

TRAIL : TNF Related Apoptosis Inducing Ligand

TRANCE : TNF-Related Activation-Induced Cytokine

TRAP : Phosphatase Acide Résistante au Tartrate

Vit D : Vitamin D

INTRODUCTION

Le tissu osseux est un tissu conjonctif spécialisé composé 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 et de protection pour un certain nombre d'organes (cerveau, cœur, poumons...). Ce tissu possède également un rôle métabolique important puisqu'il représente la principale réserve d'ions minéraux (calcium, phosphate, magnésium...) de l'organisme (Karsenty *et al.*, 1999; Roodman *et al.*, 1996).

La fraction organique du tissu osseux est constituée de cellules spécialisées, d'une matrice extracellulaire (protéoglycanes, ostéocalcine, facteurs de croissance...) et de fibres de collagène principalement du collagène de type I. La fraction minérale est, quant à elle, composée de calcium et de phosphate sous la forme de cristaux d'hydroxyapatite (Baron, 2001).

Le tissu osseux est en perpétuel remaniement, il passe par des phases dynamiques de formation et de résorption afin de maintenir l'homéostasie phosphocalcique et de s'adapter aux contraintes mécaniques. Ce processus physiologique qui permet le renouvellement du tissu osseux correspond au remodelage osseux et fait intervenir principalement deux types de cellules : les ostéoblastes responsables de la formation de la matrice qui se minéralise (apposition osseuse) et les ostéoclastes responsables de la résorption de cette matrice minéralisée (Karsenty *et al.*, 2001; Aarden *et al.*, 1994; Iqbal *et al.* 2005).

1. L'OSTÉOBLASTE

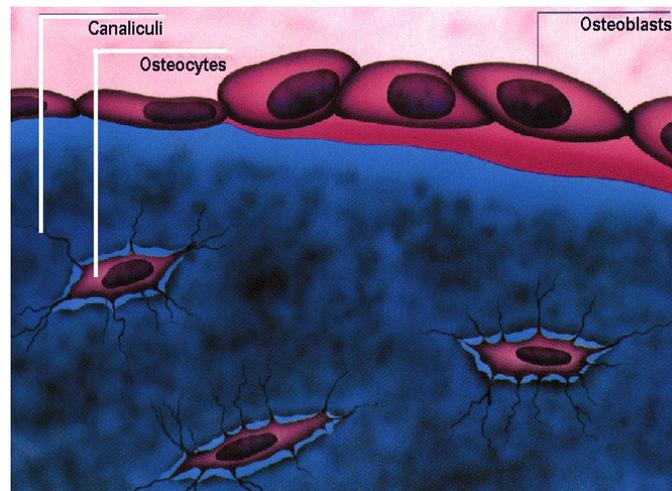


Figure 1 :
ostéocytes

Ostéoblastes et

Les ostéoblastes sont des cellules ostéoformatrices, responsables de la production des constituants de la matrice osseuse et de sa minéralisation. Les cellules de la lignée ostéoblastique jouent un rôle important dans le contrôle du remodelage osseux, de par leur capacité à synthétiser de nombreux facteurs de croissance (Marie, 1994).

a) 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 cellules 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 β , 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.

b) Marqueurs phénotypiques des ostéoblastes

Les ostéoblastes différenciés sont des cellules cuboïdales alignées le long de la matrice osseuse. Leur cytoplasme, basophile, 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, qui sont des inhibiteurs de la calcification.
- le collagène de type I et l'ostéopontine : le collagène, essentiellement de type I, constitue 90 % de la matrice osseuse organique. Il 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 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.

c) 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. La stabilité et l'organisation des fibrilles de collagène assurent la rigidité nécessaire à la résistance aux forces de compression tout en assurant une certaine élasticité. Un rôle important de la trame collagénique osseuse est de se lier aux protéines non collagéniques et aux facteurs de croissance produits par l'ostéoblaste ; cette liaison assure leur stabilité moléculaire.

L'ostéoblaste synthétise de nombreuses protéines non collagéniques qui se lient au collagène osseux. Certaines protéines contiennent des résidus acides carboxyglutamiques (Gla) dont la carboxylation est dépendante de la vitamine K : la "matrix Gla protein", présente dans le cartilage et l'os immature et l'ostéocalcine, spécifiquement produite par les ostéoblastes et incorporée dans l'os mature. Certaines de ces protéines se caractérisent par

la présence de la séquence de trois acides aminés RGD, qui se lient aux récepteurs membranaires cellulaires (intégrines) et permettent l'attachement cellulaire à la matrice : il s'agit de la fibronectine, de la thrombospondine et des sialoprotéines (ostéopontine, sialoprotéine osseuse).

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 doit être initiée par un processus de nucléation. Les cristaux sont ensuite disposés régulièrement et parallèlement aux fibres de collagène de la matrice. Le collagène de type I est un site possible de nucléation; certaines protéines telles que l'ostéocalcine et l'ostéonectine, ont une forte affinité pour le calcium et pourraient contribuer à la minéralisation du collagène auquel elles sont associées.

2. L'OSTÉOCLASTE

Ces cellules sont caractérisées par leur capacité à dégrader l'os *in vivo*. Cette activité est régulée par des hormones, des cytokines et des protéines de la matrice osseuse. Les ostéoclastes sont des cellules géantes de 10 à 100 μm de diamètre qui contiennent entre 4 et 20 noyaux regroupés au centre de la cellule. Ces cellules sont hautement mobiles, capables de se déplacer à la surface des travées osseuses d'un site de résorption à un autre. Elles possèdent un appareil de golgi très développé autour de chaque noyau et de nombreuses mitochondries péri nucléaires ainsi que d'importantes quantités de vésicules lysosomales (Boissy *et al.*, 2000). Contrairement aux cellules ostéoformatrices qui dérivent de cellules-souches mésenchymateuses pluripotentes, les ostéoclastes dérivent de la lignée hématopoïétique monocytaire (Hattersley *et al.*, 1989; Suda *et al.*, 1992). Leurs précurseurs, promonocytes (lignée myéloïde) ont la capacité de se différencier en ostéoclastes grâce à un processus de fusion de précurseurs mono-nucléés sous l'influence de différents facteurs, dont notamment l'hormone parathyroïdienne (PTH), l'interleukine 1 (IL1) et la 1,25,di-hydrovitamine D. Cette différenciation est responsable de la formation de cellules multinucléées (Baron, 2001).

Lorsqu'il est activé, l'ostéoclaste, cellule ostéorésorbante, se développe au niveau de son appareil lysosomal et se polarise fortement. Sa membrane plasmique se différencie ainsi en deux domaines séparés : un domaine apical qui développe une bordure en brosse au contact de la surface osseuse et un domaine basolatéral situé à l'opposé. Ces cellules sont étroitement associées à la matrice osseuse par une bordure rugueuse.

Il dispose au niveau de sa membrane rugueuse de tout l'arsenal enzymatique nécessaire pour maintenir une pompe ionique permettant la décalcification de l'os par acidification et la destruction du collagène osseux (présence de collagénase de type I). Il existe aussi, à ce niveau, de nombreuses molécules d'adhésion cellulaire (intégrines $\alpha\beta 3$, vitronectine).

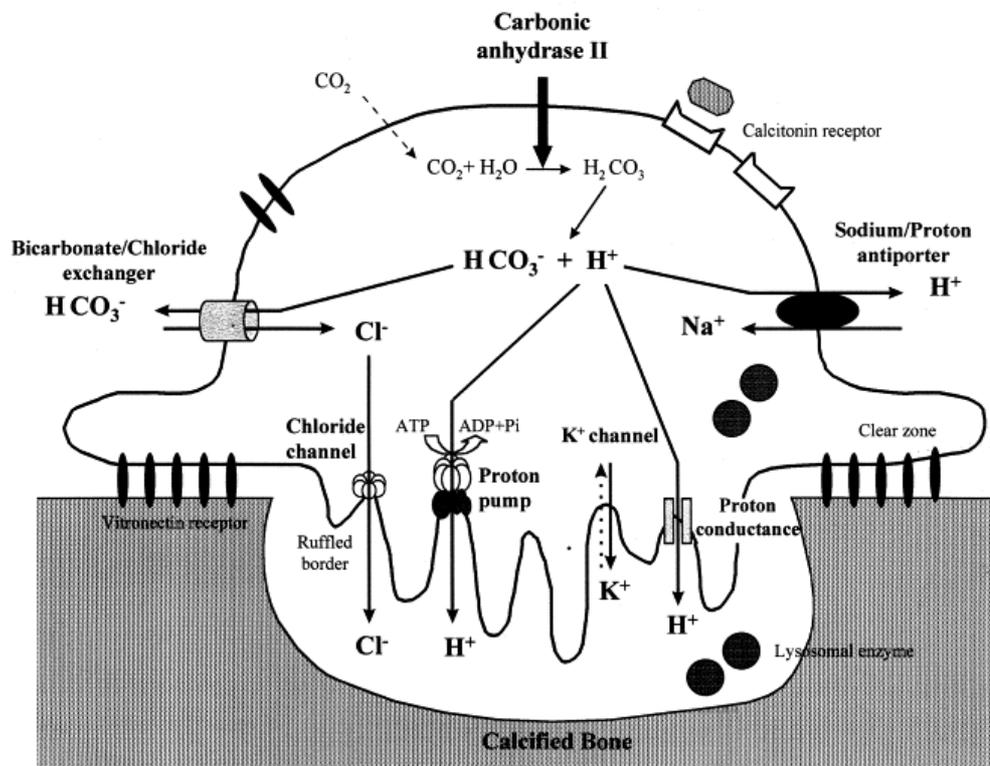


Figure 2 : Représentation schématique de la fonction d'un ostéoclaste (Rousselle et Heymann, 2002). Lorsque l'ostéoclaste devient actif pour la résorption, la membrane plasmique au contact de l'os s'organise en deux domaines spécialisés : la zone d'ancrage et la bordure plissée. La résorption de la matrice 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.

3. 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 tissu osseux peut 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 3).

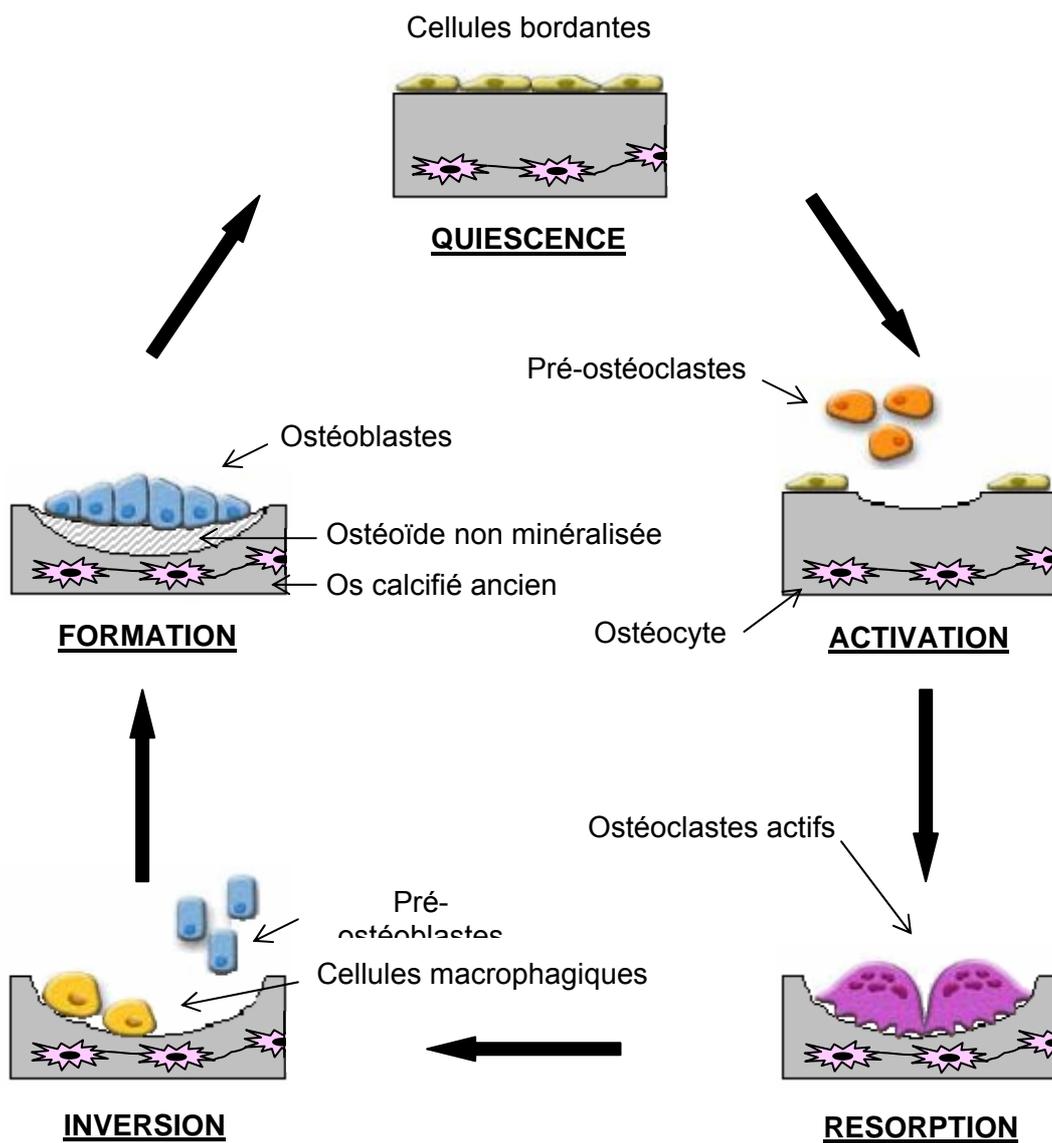


Figure 3 : Les différentes étapes du remodelage osseux.

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.

Les ostéoblastes situés à proximité des pré-ostéoclastes vont favoriser la différenciation de ceux-ci en ostéoclastes matures *via* la production de différentes cytokines qui vont interagir avec des récepteurs présents à la surface des pré-ostéoclastes. Les cellules ostéoclastiques ainsi différenciées résorbent l'os ancien et forment la lacune. C'est la phase de résorption. Elle débute par l'adhésion des préostéoclastes à la surface osseuse au niveau de la zone claire avec la constitution d'une zone de scellement conduisant à la polarisation de la cellule et à la formation de la bordure en brosse. Cette adhésion est possible par la présence de membranes spécialisées, comportant des intégrines ($\alpha_2\beta_1$ et $\alpha_v\beta_3$), de la taline et de la vinculine associé à des faisceaux d'actine.

La zone claire délimite ainsi la chambre de résorption où le pH est acide. Cette acidité du milieu au niveau du compartiment sous ostéoclastique est entretenue par des pompes à protons (anhydrase carbonique) spécifiques de l'ostéoclaste qui expulsent les ions H⁺. Cette acidité ainsi obtenue facilite la dissolution de la phase minérale de l'os à savoir les cristaux d'hydroxyapatite entraînant la libération de calcium et de phosphore, et favorise par différentes cascades d'activation les fonctions des enzymes protéolytiques (métalloprotéases et cathepsines) conduisant à la destruction de la matrice organique.

La dégradation de la matrice entraîne une augmentation du taux de calcium intracellulaire des ostéoclastes qui va provoquer une désorganisation des podosomes et par conséquent le détachement de l'ostéoclaste. La phase d'inversion peut alors commencer. Les ostéoclastes qui se détachent de la surface osseuse meurent par apoptose vraisemblablement médiée par le système Fas/Fas ligand (Wu *et al*, 2003). Ces ostéoclastes sont alors remplacés par des cellules mononucléées de type macrophagique qui vont éliminer les derniers résidus de matrice présents dans le fond de la lacune.

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 (figure 3).

4. LA TRIADE MOLÉCULAIRE OPG / RANK / RANKL

Le processus de remodelage est régulé par l'action de nombreux facteurs locaux et systémiques (cytokines, facteur de croissance...). La découverte en 1997 de l'OPG (Ostéoprotégérine) 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 (Simonet *et al.*, 1997 ; Wong *et al.*, 1997a ; Anderson *et al.*, 1997). Cette triade moléculaire OPG / RANK / RANKL semble être à l'origine de l'équilibre entre résorption et apposition osseuse.

Ainsi RANKL, exprimée par les cellules ostéoblastiques, est un facteur pro-résorptif puisqu'en se fixant sur son récepteur RANK, exprimé à la surface des cellules préostéoclastiques, stimule la différenciation et l'activation des ostéoclastes matures (Figure 4). L'OPG, membre comme RANK de la super famille des récepteurs au TNF, est synthétisée par les cellules ostéoblastiques (Simonet *et al.*, 1997 ; Yasuda *et al.*, 1998a). Elle est sécrétée dans l'environnement osseux et agit en tant que récepteur compétiteur soluble en se liant à RANKL et en empêchant la fixation de RANKL à RANK (Simonet *et al.*, 1997 ; Shalhoub *et al.*, 1999). De ce fait, l'OPG exerce un effet anti-résorptif puisqu'il inhibe la formation d'ostéoclastes matures.

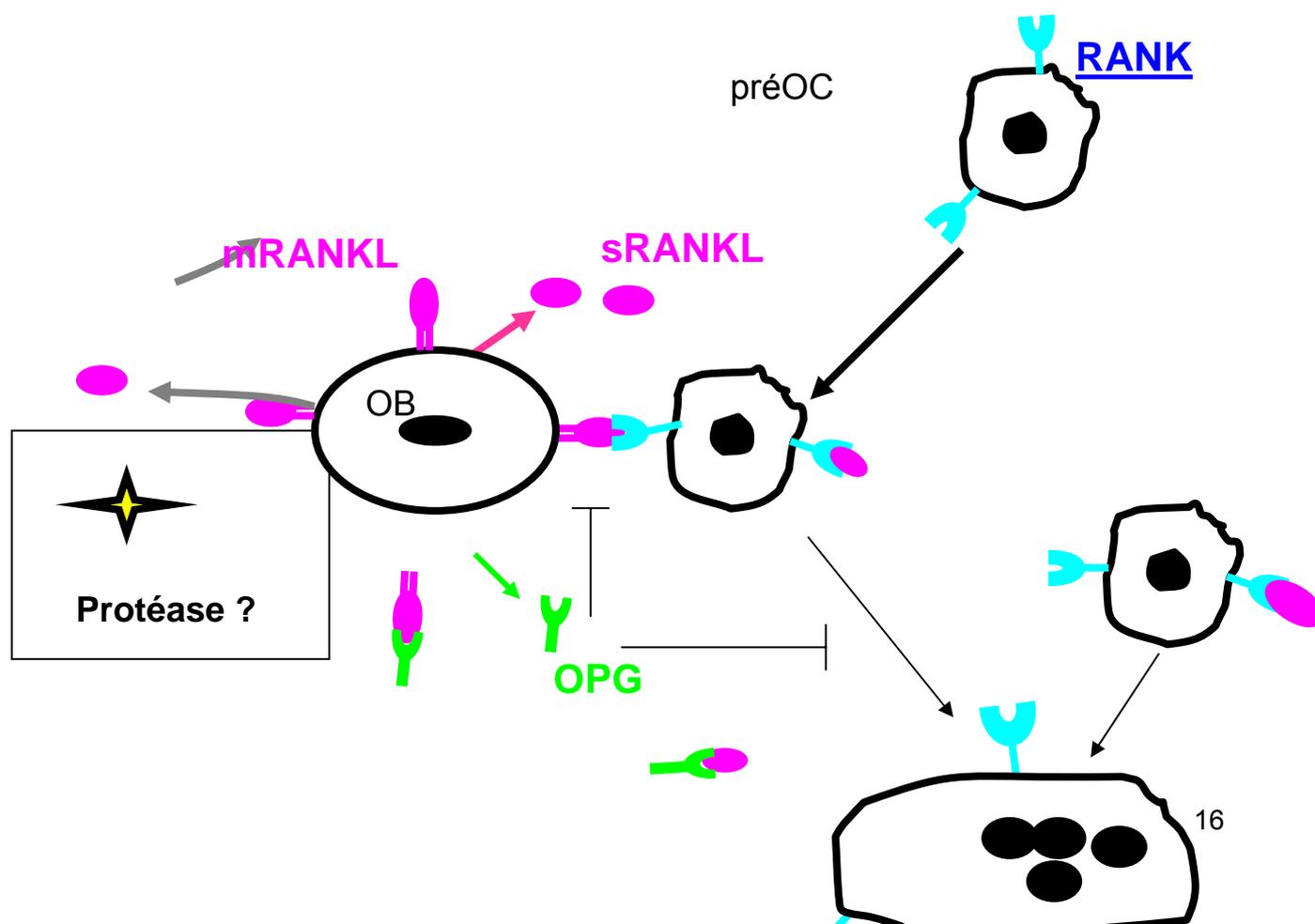


Figure 4 : Implication du système OPG/RANK/RANK-L dans la différenciation ostéoclastique.

RANK : Receptor Activator of NF- κ B ; **RANKL** : RANK Ligand ; **m** : membranaire ;

s : soluble ; **OPG** : Ostéoprotégérine ; **OC** : Ostéoclaste ; **OB** : Ostéoblaste

4.1 OPG (Ostéoprotégérine)

4.1.1 Structure



L'OPG est encore appelée Osteoclastogenesis Inhibitory Factor (OIF), Functional Defective Cell Receptor 1 (FDCR-1), TNF Receptor related molecule 1 (TR1) ou, selon la nomenclature officielle, TNFRSF11B, a été identifiée comme un nouveau membre de la superfamille des récepteurs au TNF (Simonet *et al.*, 1997 ; Yasuda *et al.*, 1998b). L'OPG est synthétisée sous la forme d'un propeptide de 401 acides aminés dont le peptide signal est clivé générant une protéine mature de 380 acides aminés. L'OPG ne possédant pas de domaine cytoplasmique ni de domaine transmembranaire, est sécrétée sous forme de protéine soluble. Elle possède 4 motifs riches en cystéine impliqués dans l'inhibition de l'ostéoclastogenèse, deux « death domain homologous » dont la fonction est actuellement inconnue, et un domaine de liaison à l'héparine (figure 5). En C-terminal, elle contient un résidu cystéine (Cys⁴⁰⁰) nécessaire à son homodimérisation. L'OPG est synthétisée sous forme de monomère de 55 kDa qui se dimérise par des ponts disulfures pour être sécrétée principalement comme glycoprotéine homodimérique de 110 kDa avec 4 à 5 sites potentiels de N-glycosylation. Cette forme homodimérique semble plus active que la forme monomérique (Hofbauer *et al.*, 2000). En outre, il a été montré que l'OPG dimérique pouvait se fixer à RANKL avec un Kd de 10nM tandis que la fixation de l'OPG monomérique à RANKL possédait un Kd de 3 μ M (Schneeweis *et al.*, 2005).

4.1.2 Expression

L'OPG est une molécule ubiquitaire dont l'ARNm est détecté dans la peau, le foie, les poumons, le cœur, les reins, le placenta, les glandes mammaires et le cerveau (Simonet *et al.*, 1997 ; Yasuda *et al.*, 1998b). Elle est exprimée de façon prédominante par les cellules stromales de la moelle osseuse, mais son expression par les lymphocytes B et les cellules dendritiques est également induite par le CD40 (Cluster Differentiation 40) (Yun *et al.*, 1998). Enfin, les cellules endothéliales, les fibroblastes, les monocytes, les ostéoblastes humains en culture primaire et les lignées ostéosarcomateuses telles que MG-63 et SaOS2 expriment fortement l'OPG (Hofbauer *et al.*, 2000).

4.1.3 Régulation

La production de l'OPG est modulée par un très grand nombre de facteurs. Parmi eux, on peut citer l'effet stimulateur de la vitamine D3, des estrogènes, du TNF α , du TGF β 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 (Gao *et al.*, 1998 ; Lee *et al.*, 1999 ; Brändström *et al.*, 2001). 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).

4.1.4 Effets biologiques

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

A contrario, les souris invalidées pour l'OPG présentent une ostéoporose et une diminution de la densité minérale osseuse accompagnée de multiples fractures et d'une stimulation de 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.

In vitro, de nombreuses études ont montré que l'OPG sous sa forme dimérique inhibe les stades terminaux de la différenciation des précurseurs ostéoclastiques, supprime l'activation des ostéoclastes matures et induit leur apoptose (Simonet *et al.*, 1997 ; Yasuda *et al.*, 1998b ; Lacey *et al.*, 1998 ; Akatsu *et al.*, 1998).

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). Par son domaine de liaison spécifique à l'héparine, l'OPG peut interagir avec des molécules de la famille de l'héparine (Yamaguchi *et al.*, 1998). Ainsi, 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).

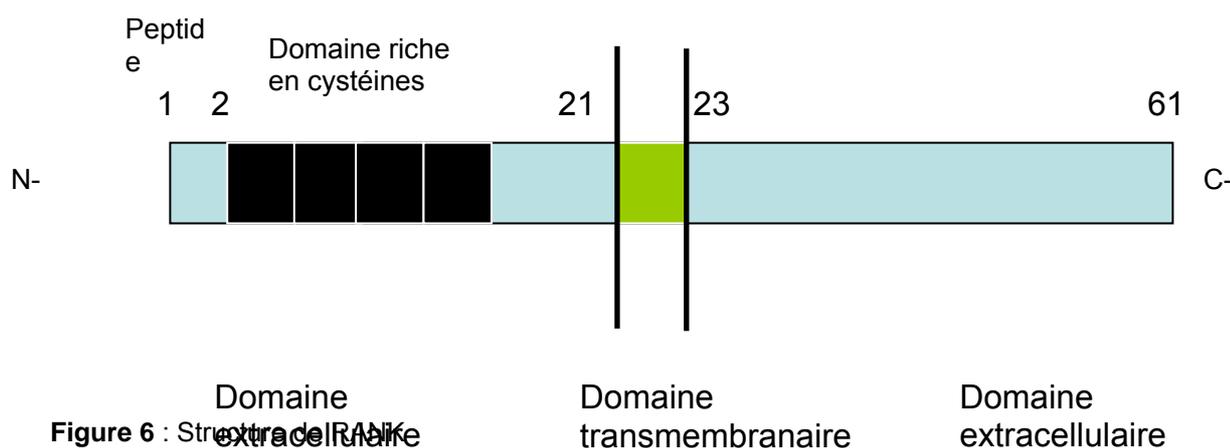
4.1.5 Signalisation induite par l'OPG sur les cellules ostéoclastiques

L'OPG, outre sa capacité à inhiber la résorption osseuse en empêchant la fixation de RANKL à RANK, est capable d'agir directement sur les cellules ostéoclastiques (Hakeda *et al.*, 1998 ; Théoleyre *et al.*, 2004b). Hakeda *et al.* (1998), ont montré par crosslinking qu'une protéine de 140 kDa serait impliquée dans l'interaction de l'OPG aux cellules ostéoclastiques. Théoleyre *et al.* démontrent que l'action de l'OPG sur les ostéoclastes entraîne la régulation de l'expression de la proMMP9. Cette activation de la proMMP9 par l'OPG passe par la voie ras/MAPK impliquant la p38 et ERK1/2. L'OPG en se fixant à

RANKL empêche la liaison RANK-RANKL et agit par conséquent en tant qu'inhibiteur de la différenciation/activation ostéoclastique. Alors que le complexe OPG-RANKL ne peut se fixer à RANK, l'OPG peut se fixer au complexe RANK-RANKL préformé à la surface des ostéoclastes. On a alors la formation d'un complexe ternaire OPG-RANKL-RANK. Ce complexe ternaire entraîne l'activation de p38 et ERK1/2 (Theoleyre *et al.*, 2004b). Par conséquent, l'OPG n'est pas uniquement définie en tant que récepteur inhibiteur de la fixation de RANKL sur RANK comme décrit dans la littérature, mais serait capable d'exercer une activité biologique directe sur les ostéoclastes.

4.2 RANK (receptor activator of nuclear factor kappa B)

4.2.1 Structure



RANK appartient à la famille des récepteurs au TNF et possède environ 40% d'homologie avec le CD40. Son nom dans la nomenclature officielle est TNFRSF11A. C'est une protéine transmembranaire de type I (partie N-terminale extracellulaire) de 616 acides aminés possédant un peptide signal (Figure 6) (Anderson *et al.*, 1997) et qui est présente à la membrane sous forme de trimère. Le domaine extracellulaire de RANK contient 4 motifs riches en cystéine indispensable pour la multimérisation de RANK (Hofbauer *et al.*, 2000).

RANK, présent à la surface des précurseurs ostéoclastiques ou des ostéoclastes matures, des lymphocytes T et des cellules dendritiques, est le récepteur de RANKL.

4.2.2 Expression

L'expression des ARNm de RANK a été détectée dans différents tissus comme le muscle squelettique, la peau, le cerveau, les poumons et le foie (Anderson *et al.*, 1997 ; Nakagawa *et al.*, 1998 ; Min *et al.*, 2003). Il a aussi été mis en évidence dans de nombreux systèmes cellulaires mais la production de la protéine est restreinte aux ostéoclastes, aux cellules lymphocytaires B et T, aux cellules dendritiques, aux cellules endothéliales et aux fibroblastes.

4.2.3 Régulation

L'expression de RANK peut-être stimulée par le CD40-Ligand sur les cellules dendritiques et par l'engagement du TCR (T-cell receptor) associée au TGF β et à l'IL-4 sur les lymphocytes T (Anderson *et al.*, 1997). Par contre, son expression sur les pré-ostéoclastes et les ostéoclastes matures ne semble pas être régulée par les principaux agents ostéotropiques mais est induite par le M-CSF (Cappellen *et al.*, 2002).

4.2.4 Effets biologiques

Pour mettre en évidence les effets biologiques de RANK, des souris ont été invalidées pour ce gène. Elles présentent une ostéopétrose sévère associée à un manque d'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 (Nakagawa *et al.*, 1998 ; Hsu *et al.*, 1999). Cette liaison RANKL-RANK est responsable au niveau de l'ostéoclaste de l'activation de NF- κ B et de c-jun kinases (Jimi *et al.*, 1999). Les souris RANK^{-/-} 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^{-/-} (Li *et al.*, 2000).

Des souris transgéniques exprimant RANK-Fc (protéine recombinante sans le domaine transmembranaire) 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, indispensable pour la résorption osseuse.

4.2.5 Signalisation dépendante de RANK dans les ostéoclastes

RANK a été identifié comme un membre de la superfamille des récepteurs au TNF ne présentant pas de « death domain » (Anderson *et al*, 1997), il est donc associé à des protéines adaptatrices lui permettant de transduire un signal. De nombreuses études ont en effet montré que RANK interagit avec les protéines TRAF (TNF Receptor Associated Factor) et que ces interactions sont responsables de l'activation du complexe NF- κ B et de JNK (Jun N-terminal Kinase) (Darnay *et al*, 1998, 1999 ; Galibert *et al*, 1998 ; Wong *et al*, 1998 ; Hsu *et al*, 1999 ; Kim *et al*, 1999). Plus précisément, il a été montré, dans des essais de liaison *in vitro* ou grâce à des cellules transfectées surexprimant ces molécules, que TRAF1, 2, 3, 5 et 6 étaient capables d'interagir avec RANK. Ceci suggère que RANK possède de multiples domaines de liaison pour les molécules TRAF capables de réguler la différenciation, l'activation et la survie des ostéoclastes (Armstrong *et al*, 2002). Des études fonctionnelles récentes ont en effet mis en évidence l'existence sur RANK de trois motifs cytoplasmiques capables de médier indépendamment la formation et les fonctions ostéoclastiques (Liu *et al*, 2004).

4.3 RANKL (RANK Ligand)

4.3.1 Structure

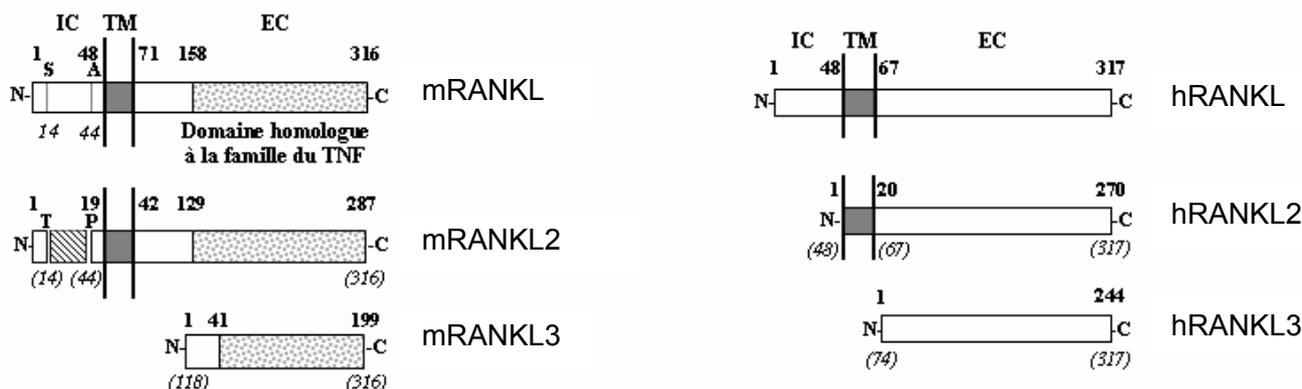


Figure 7 : Caractéristiques structurales de RANKL de souris (mRANKL) et de RANKL humain (hRANKL) (Theoleyre *et al*, 2004a ; Suzuki *et al*, 2004).

IC : domaine intracellulaire ; TM : domaine transmembranaire ; EC : domaine extracellulaire ;

N : extrémité N-terminale ; C : extrémité C-terminale.

RANKL a été identifié et cloné par deux groupes de recherches différents, l'un à partir d'une lignée de cellules stromales de moelle osseuse murine ST2 (Yasuda *et al*, 1998a), et l'autre à partir de cellules myélomonocytaires murines 32D (Lacey *et al*, 1998). RANKL est un polypeptide membre de la superfamille du TNF. Différentes appellations ont été données à ce facteur : OPGL (Osteoprotegerin Ligand), TRANCE (TNF-Related Activation-Induced Cytokine), ODF (Osteoclast Differentiation Factor), cependant la nomenclature officielle est TNFSF11 (11^{ème} membre de la super famille du TNF). C'est une protéine transmembranaire

de type II (partie N-terminale intracellulaire) sans peptide signal (Hofbauer *et al.*, 2000) montrant une homologie d'environ 30% avec TRAIL (TNF Related Apoptosis Inducing Ligand) et CD40, et d'environ 20% avec le Fas-Ligand (Wong *et al.*, 1997a).

Que ce soit chez la souris ou chez l'homme, RANKL existe sous trois isoformes (2 formes membranaires et une forme soluble) résultant de l'épissage alternatif d'un même gène (Ikeda *et al.*, 2001 ; Suzuki *et al.*, 2004).

L'isoforme RANKL (Figure 7) correspond à une protéine transmembranaire de 316 acides aminés chez la souris et de 317 acides aminés chez l'homme. Il possède un domaine intracytoplasmique complet lui permettant d'interagir avec des molécules intracellulaires. La différence de structure majeure entre les deux espèces concerne l'isoforme RANKL2. En effet, RANKL2 de souris (287 acides aminés) possède un court domaine intracytoplasmique alors que RANKL2 humain (270 acides aminés) en est dépourvu (Ikeda *et al.*, 2003 ; Suzuki *et al.*, 2004). L'isoforme RANKL3 est une protéine soluble de 199 acides aminés chez la souris et de 244 chez l'homme, déléetée en N-terminal pour les acides aminés correspondant aux domaines intracytoplasmique et transmembranaire de RANKL. Elle peut également être libérée de la membrane plasmique après clivage protéolytique de RANKL membranaire. Chez la souris, ce clivage protéolytique intervient entre l'arginine 138 et la phenylalanine 139 (Lum *et al.*, 1999). Cette forme soluble produite peut toujours se fixer à RANK mais avec une efficacité ostéoclastogénique moindre, comparée à la forme membranaire (Nakashima *et al.*, 2000).

4.2.2 Expression

RANKL est exprimé par un grand nombre de cellules et de tissus. Ainsi, il est fortement présent au niveau du squelette (os, moëlle osseuse, cartilage) (Lacey *et al.*, 1998 ; Yasuda *et al.*, 1998a), dans le tissu lymphoïde (ganglions, thymus, rate, foie foetal) et dans le système vasculaire (Collin-Osdoby *et al.*, 2001). L'ARNm de RANKL a été détecté dans différentes lignées de cellules stromales (ST2, MC3T3-E1) et d'ostéosarcome (UMR-106, SaOS2), dans des ostéoblastes murins en culture primaire et dans les chondrocytes hypertrophiques murins (Kartsogiannis *et al.*, 1999). Il est également présent en grande quantité dans les lymphocytes T et les glandes mammaires (Anderson *et al.*, 1997 ; Srivastava *et al.*, 2003). Enfin, des taux assez faibles d'ARNm de RANKL ont été mis en évidence dans le cerveau, le cœur, les poumons, les reins et le placenta (Kartsogiannis *et al.*, 1999).

4.2.3 Régulation

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

4.2.4 Effets biologiques

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.*, 1999). Ces résultats mettent en évidence le rôle clé de RANKL dans la résorption osseuse.

Enfin, RANKL joue un rôle majeur dans les fonctions immunitaires puisqu'il semble être très fortement impliqué dans la régulation de l'organogenèse des ganglions lymphoïdes et dans le développement du thymus (Kong *et al.*, 1999). En effet, les souris RANKL^{-/-} présentent une absence totale de ganglions lymphoïdes, alors qu'elles ont une organisation normale de la rate, et un défaut de développement thymique, ceci conduisant à un défaut de maturation des lymphocytes B et T. Le rôle de RANKL dans le système immunitaire peut également être étendu aux cellules dendritiques puisqu'il est capable de stimuler leur activation et leur survie (Anderson *et al.*, 1997 ; Wong *et al.*, 1997b).

4.2.5 Signalisation impliquée dans la régulation de l'expression de RANKL dans les cellules ostéoblastiques

La voie de la protéine kinase C (PKC) a été démontrée comme étant capable de réguler l'expression de l'ARNm RANKL dans les cellules ostéoblastiques. En effet, le PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate), qui est un activateur de la voie PKC et du clivage de nombreuses protéines membranaires, stimule la différenciation ostéoclastique via une induction de RANKL dans les cellules ostéoblastiques. Cette stimulation est inhibée par l'utilisation d'inhibiteurs de la voie PKC. De plus, la PKA pourrait aussi intervenir dans la régulation de l'expression de l'ARNm RANKL étant donné que l'effet de la PTH sur l'expression de RANKL passe par la voie PKA. (Kwan Tat *et al.*, 2004).

5. SHEDDING PROTÉOLYTIQUE.

Des protéines cellulaires localisées à la surface de la cellule peuvent être clivées protéolytiquement par un processus de « Shedding cellulaire » afin de libérer leur domaine extracellulaire dans le milieu environnant. Ce clivage protéolytique est responsable de la production par la cellule de divers cytokines d'intérêts, de facteurs de croissance de même que d'autres médiateurs indispensables au bon fonctionnement de l'organisme (Mohammed *et al.*, 2003). Le TNF- α , le TGF- α , le CD40, ainsi que des molécules d'adhésion cellulaire telle que l'ICAM (InterCellular Adhesion Molecule) et la L-selectine, subissent tous un clivage membranaire afin de libérer leur partie extracellulaire. Ce mécanisme de shedding cellulaire ne permet pas seulement de libérer des facteurs dans le milieu externe mais contrôle également l'expression péricellulaire de nombreux récepteurs membranaires tels que le

TNFR-I et II, l'IL6R et l'IL-1R. En clivant ces récepteurs, on peut ainsi moduler le taux de récepteur fonctionnel à la surface de la cellule (Hooper *et al.*, 1997).

A ce jour, plusieurs études ont pu montrer, par l'utilisation d'inhibiteurs, l'implication des métalloprotéases dans la réalisation du shedding cellulaire (Kanamaru *et al.*, 2004). Les protéases, couramment citées dans la littérature comme étant capables de cliver enzymatiquement les protéines membranaires, font parties de la super famille des ADAM (A Disintegrin And Mettalloprotease) ou de la super famille des MMP (matrix metalloproteinases) (Murphy et Lee, 2005).

5.1 Les ADAM (A Disintegrin And Mettalloprotease)

Cette famille comprend plus de 29 protéines qui possèdent toutes un large domaine extracellulaire composé de cinq régions : un pro-domaine, un domaine métalloprotéase, un domaine désintégrine, une région riche en cystéines et une région EGF (epidermal growth factor) (Figure 8). Leur structure comprend aussi un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique dont la longueur est très variable. Le pro-domaine (Pro) maintient la protéine dans sa forme inactive en bloquant le site actif du domaine métalloprotéase (Méta) grâce à l'intervention d'une cystéine. Les domaines désintégrines (Dis), riches en cystéine (Cys) et les répétitions de type EGF composent la région de la protéine impliquée dans l'adhérence et dans des interactions cellule-cellule. Enfin, le domaine métalloprotéase est quant à lui, responsable de la libération de plusieurs cytokines solubles via un mécanisme de clivage protéolytique de protéines membranaires (Moss *et al.*, 2001).

Concernant la régulation de l'activité de ces ADAM, des inhibiteurs physiologiques endogènes, les TIMP (tissue inhibitors of metalloproteinases), sont impliqués dans cette modulation. TIMP-1 peut inhiber ADAM-10 et ADAM-17 alors que TIMP-2, -3 et -4 peuvent inhiber ADAM-17, ADAM-28 et ADAM-33 en se liant au domaine métalloprotéase (Huovila *et al.*, 2005). Enfin, le domaine cytoplasmique des ADAM est responsable de la régulation de l'activité catalytique du domaine métalloprotéase en interagissant avec des protéines intracellulaires (Seals et Courtneidge, 2003).



5.2 Les MMP (Matrix MetalloProteinase)

Cette famille est composée de plus de vingt endopeptidases et divisé en plusieurs classes. On trouve parmi ces endopeptidases, la collagénase, les matrilysines, les stromélysines, les gélatinases et les métalloprotéinases de type membranaire (Nagase *et al.*, 1999). Toutes les MMP sont constituées de trois domaines : le pré-domaine nécessaire à leur acheminement intracellulaire jusqu'à la surface cellulaire, le pro-domaine et le domaine catalytique (Figure 9). Le pré-domaine est rapidement éliminé et absent de la forme mûre de la protéase. Le pro-domaine maintient l'activité enzymatique sous forme latente et il est constitué d'une séquence peptidique qui comprend un résidu cystéine interagissant avec le site catalytique. La protéolyse de ce pro-domaine conduit à l'activation de l'enzyme. Enfin, le domaine catalytique essentiel à l'activité protéolytique contient un atome de zinc maintenu par trois résidus histidine (Massova *et al.*, 1998).

L'activité des métalloprotéases peut être modulée par divers facteurs solubles extracellulaires ou/et contrôlée au niveau intracellulaire par des inhibiteurs physiologiques, les TIMPs. Ces inhibiteurs endogènes, issus des mêmes cellules que les MMP, sont produits de façon constitutive afin de préserver un équilibre enzymes/inhibiteurs qui contrôle les processus physiologiques. TIMP-1 a la capacité de se lier à la MMP9 (Hosford *et al.*, 2004) et d'inhiber son action catalytique mais elle est aussi connue pour inhiber les formes actives d'autres MMP à l'exception de la MMP-2. TIMP-2 présente une forte affinité pour les formes actives et latentes de la MMP-2. Contrairement aux autres TIMPs, qui sont sécrétés par les cellules et restent solubles dans le compartiment matriciel, TIMP-3 est insoluble et est fixé à la matrice extracellulaire. Il inhibe l'activité des MMP-1, -2, -3, -9 et -13. TIMP-4, quant à lui, a été principalement détecté dans le cœur et inhibe les MMP-2, -9 et -7 (Greene *et al.*, 1996 ; Brew *et al.*, 2000 ; Murphy et Knauper, 1997).

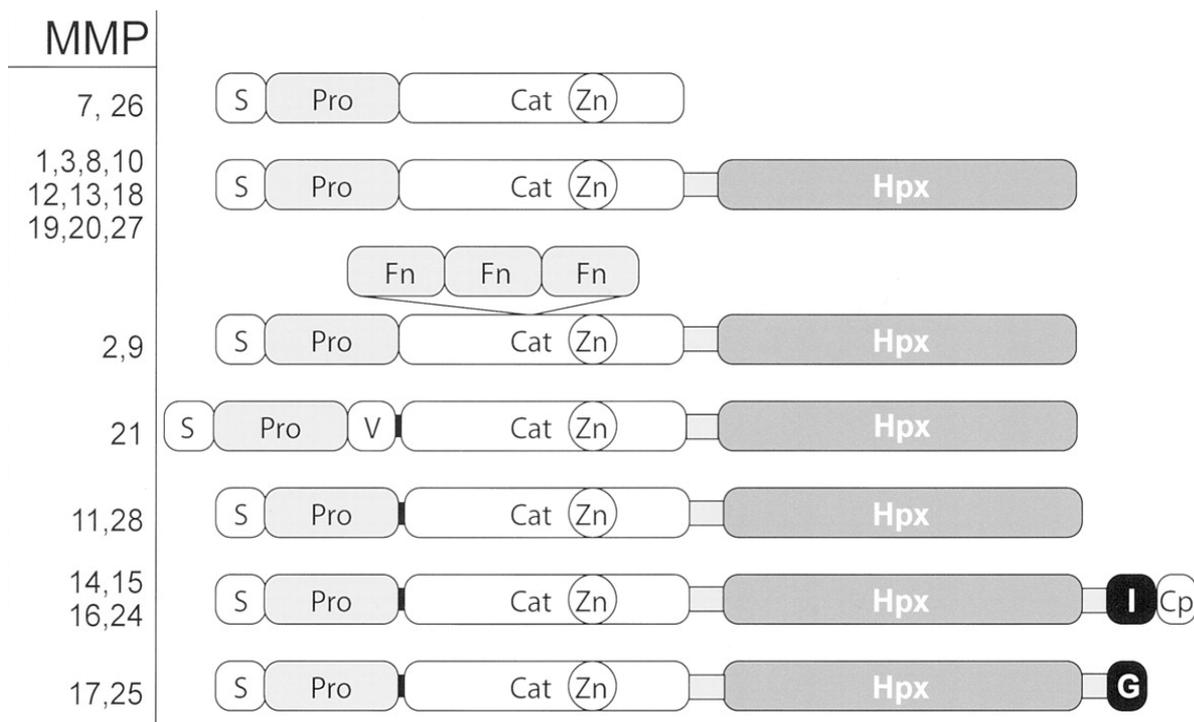


Figure 9 : Structure des MMPs. S: peptide signal, Pro: propeptide, Cat: domaine catalytique, Zn: site d'activation du zinc, Hpx: domaine d'hémopexine, Fn: domaine fibronectine, V: vitronectine, I: domaine transmembraire, G: GPI, Cp: domaine cytoplasmique. Le site de clivage par la furine est positionnée par une bande noire entre le domaine propeptide et le domaine catalytique (Visse et Nagase, 2003).

5.3 Les métalloprotéases transmembranaires

Les métalloprotéases transmembranaires (de MT1-MMP à MT6-MMP aussi appelées MMP-14, -15, -16, -17, -24, -25) sont caractérisées par un ancrage membranaire et pour quatre d'entre elles par un court domaine cytoplasmique dans leur partie C-terminal. C'est par cette localisation membranaire que les MT-MMP se différencient des MMP (Seiki, 1999). Les MT-MMP, ancrées dans la membrane plasmique, ont leur site catalytique orienté vers l'espace extracellulaire. Cet ancrage leur permet d'être présentes dans le milieu extracellulaire pour exercer leur rôle de dégradation et d'être plus résistantes aux inhibiteurs protéasiques présents dans ce milieu. Les MT-MMP sont synthétisées sous formes de proenzymes et sont activées dans la cellule par l'action de la Furine (Sato *et al.*, 1996 ; Pei et Weiss, 1996).

Après l'activation par la furine, ces MT-MMP jouent un rôle direct dans la dégradation de la matrice extracellulaire. La MT1-MMP est connue pour son action d'hydrolyse du collagène des types I et III, de la fibronectine, de la vitronectine et des protéoglycanes du cartilage (Pei et Weiss, 1996 ; Ohuchi *et al.*, 1997 ; Ortho *et al.*, 1997). La MT2-MMP, quant à elle, peut agir sur la fibronectine, la tenascine, la laminine, l'aggrecan et le perlecan (Ortho *et al.*, 1997) alors que la MT3-MMP peut dégrader le collagène du type III et la fibronectine (Matsumoto *et al.*, 1997). En outre, la MT3-MMP est aussi connue pour sa participation à l'invasion des

mélanomes en s'associant au Melanoma Chondroïtine Sulfate Proteoglycan (Iida *et al.*, 2001).

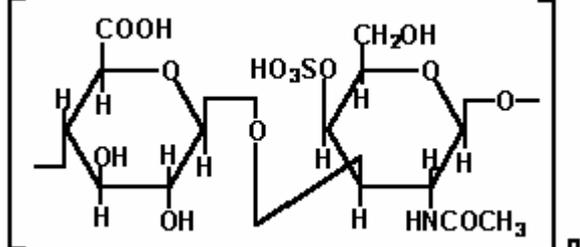
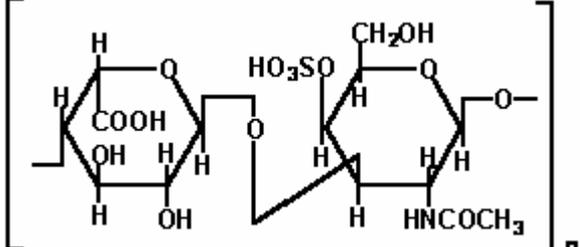
En plus de leur rôle dans la dégradation directe de la matrice extracellulaire, ces enzymes peuvent intervenir dans l'activation protéolytique des autres MMP. Ainsi, la MT1-MMP, de même que la MT2 et la MT3-MMP, sont toutes décrites pour être capable d'activer la pro-MMP-2 (pro gélatinase A) en MMP-2 avec une efficacité d'activation maximum pour la MT1-MMP suivie de la MT3-MMP et de la MT2-MMP (Seiki, 1999). Outre cette capacité activatrice de la MT1-MMP sur la pro-MMP-2, la MT1-MMP a aussi été récemment proposée pour son implication dans le clivage protéolytique de RANKL membranaire. En effet, plusieurs études ont pu démontrer qu'une surexpression de la MT1-MMP pouvait augmenter le clivage de RANKL membranaire (Schlondorff *et al.*, 2001 ; Hikita *et al.*, 2005).

6. LES PROTÉOGLYCANES

Les protéoglycanes (PG) sont présents en grand nombre dans l'organisme et particulièrement dans la peau et le cartilage. Ils sont également exprimés en plus faible quantité dans le tissu osseux, mais ils jouent un rôle majeur dans le contrôle de nombreuses activités biologiques. Ce sont des macromolécules complexes composées d'une chaîne protéique sur laquelle sont greffées, par liaison covalente, une ou plusieurs chaînes d'oses (ou glycosaminoglycanes) plus ou moins sulfatées. Les PG présentent une grande variabilité structurale. En effet, la taille de la chaîne protéique est comprise entre 10 et 500 kDa et le nombre de glycosaminoglycanes (GAG), attachés à celle-ci, varie entre 1 et 100 (Ruoslahti, 1988 ; Kjellen et Lindahl, 1991 ; Prydz et Dalen, 2000). De plus, outre les GAG, les protéoglycanes possèdent des oligosaccharides liés par des liaisons *N*- ou *O*-glycosidiques. Ces molécules sont regroupées en quatre groupes : les PG extracellulaires de grande taille, les petits PG riches en leucine, les PG membranaires et les PG des membranes basales. La diversité des protéoglycanes leur confère de nombreuses fonctions biologiques.

6.1 Les glycosaminoglycanes (GAG)

Les glycosaminoglycanes correspondent à de longues chaînes glucidiques non ramifiées constituées par la répétition d'une unité disaccharidique. Selon la nature des résidus composant cette unité disaccharidique, il est possible de distinguer 4 familles de GAG : chondroïtine sulfate et dermatane sulfate, kératane sulfate, héparane sulfate et héparine, et acide hyaluronique (Tableau 1). Ces chaînes glucidiques sont fixées sur l'axe protéique par l'intermédiaire d'un tétrasaccharide composé d'une xylose, de deux galactoses et d'un acide glucuronique.

<p style="text-align: center;">Chondroïtine sulfate</p> <p>(acide glucuronique + N-acétylgalactosamine)</p>	
<p style="text-align: center;">Dermatane sulfate</p> <p>(acide glucuronique ou acide iduronique + N-acétylgalactosamine)</p>	

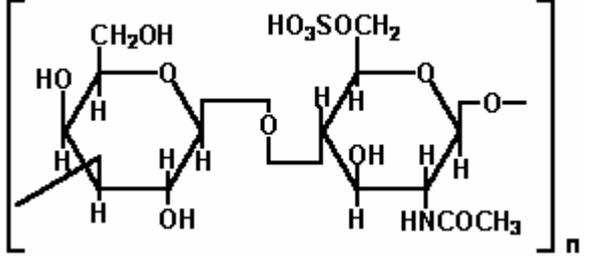
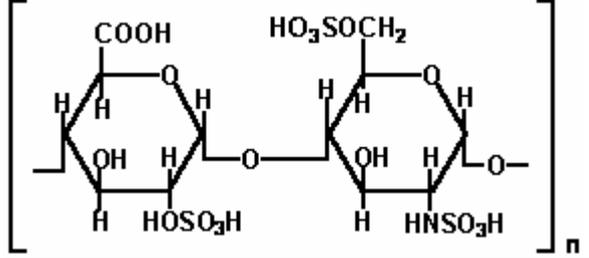
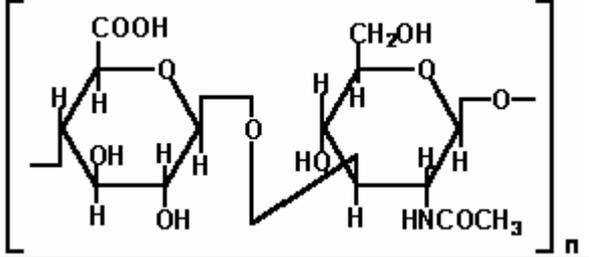
<p style="text-align: center;">Kératane sulfate</p> <p style="text-align: center;">(galactose + N-acétylglucosamine)</p>	
<p style="text-align: center;">Héparine et héparane sulfate</p> <p style="text-align: center;">(acide glucuronique ou iduronique + N-acétylglucosamine)</p>	
<p style="text-align: center;">Acide hyaluronique</p> <p style="text-align: center;">(acide glucuronique + N-acétylglucosamine)</p>	

Tableau 1 : Structure des différents glycosaminoglycanes.

6.2 Les protéoglycanes majeurs de l'os

6.2.1 La décorine et le biglycan

La décorine et le biglycan sont fortement exprimés dans l'os (Fisher *et al*, 1989 ; Bianco *et al*, 1990). Ces molécules, dont le poids moléculaire est de 45-50 kDa, sont composées d'un axe protéique comportant la répétition de 10 motifs riches en leucine associés à des régions riches en cystéines (Neame *et al*, 1989) (figure 10). A l'extrémité N-terminale, la décorine et le biglycan présentent respectivement 1 et 2 sites d'attachement pour des chaînes de dermatane sulfate ou, plus généralement dans l'os, de chondroïtine sulfate.

La délétion des gènes codant la décorine et le biglycan chez la souris, a permis de mettre en évidence le rôle important de ces molécules dans la formation osseuse *in vivo*. En effet, les souris déficientes pour le biglycan présentent une ostéoporose due à une diminution de la formation osseuse (Young *et al*, 2002). Chez ces animaux, un nombre et une activité plus faibles des ostéoblastes ont été mis en évidence.

Le rôle de ces PG dans la formation osseuse est dépendant du TGF β . En effet, la décorine et le biglycan sont capables de se lier à ce facteur de croissance et de contrôler son activité,

soit en le séquestrant dans la matrice, soit en facilitant sa fixation sur ses récepteurs spécifiques (Hildebrand *et al*, 1994 ; Takeuchi *et al*, 1994). Des études récentes ont mis en évidence, chez les souris invalidées pour la décorine et le biglycan, qu'en l'absence de ces deux molécules, le TGF β n'est plus séquestré dans la matrice et qu'il se fixe ainsi en excès sur ses récepteurs exprimés à la surface des cellules stromales de la moëlle osseuse (Bi *et al*, 2005). Ceci a pour conséquence le passage de ces cellules d'un état de croissance à un état d'apoptose, ce qui induit une diminution du nombre des cellules ostéoprogénitrices et donc, à terme, une diminution de la formation osseuse. Des études réalisées par Grant *et al*, ont par ailleurs évalué le rôle de la décorine dans la croissance tumorale (Grant *et al*, 2002). Ces auteurs ont ainsi montré que la décorine peut inhiber la croissance tumorale *in vivo* en supprimant la production, par les cellules tumorales, d'un puissant facteur angiogénique, le Vascular Endothelial Growth Factor.

DECORINE



BIGLYCAN



Figure 10 : Représentation schématique de la décorine et du biglycan.

— : axe protéique ; ■ : domaine riche en leucine ; ~ : chaîne de chondroïtine ou dermatane sulfate ; ↑ : résidu cystéine ; N : extrémité N-terminale ; C : extrémité C-terminale.

6.2.2 Les syndecans

Les syndecans correspondent à des « heparan sulfate proteoglycans » (HSPG) transmembranaires et comportent 4 membres. Ce sont des molécules membranaires de type I avec des domaines transmembranaire et cytoplasmique homologues et fortement conservés (Bernfield *et al*, 1992) (figure 11). Les GAG attachés aux syndecans sont essentiellement des molécules d'héparane sulfate mais il est également possible de trouver du chondroïtine sulfate (Bernfield et Sanderson, 1990) (figure 11). Le syndecan-1 a été à l'origine identifié dans les cellules épithéliales mammaires de souris (Saunders *et al*, 1989) mais il est présent dans de très nombreux autres types cellulaires, dont les ostéoblastes, de même que les syndecans-2 et -4 (Kim *et al*, 1994 ; Birch et Skerry, 1999). Le syndecan-3, quant à lui, est exprimé principalement dans le tissu nerveux.

Les syndecans sont capables d'établir des interactions cellules-cellules ou cellules-matrice. En effet, le syndecan-4, en association avec des intégrines, peut interagir avec des protéines de la matrice extracellulaire telles que la fibronectine ou la vitronectine (Woods et Couchman, 1998).

Les syndecans sont également des molécules capables d'interagir avec de nombreux facteurs de croissance et ainsi de moduler leur activité. C'est le cas pour les FGF (Fibroblast Growth factors) (Steinfeld *et al*, 1996). Au sein de l'os, les FGF contrôlent la formation osseuse en régulant la différenciation des ostéoblastes (Marie, 2003). Des travaux récents ont également montré que, dans la polyarthrite rhumatoïde, le FGF-2 en se liant aux HSPG exprimés par les fibroblastes synoviaux, induisait l'expression de RANKL et par conséquent la maturation des ostéoclastes (Nakano *et al*, 2004).

Un rôle prépondérant du syndecan-1 a par ailleurs été identifié dans le myélome multiple. Cette pathologie est caractérisée par une accumulation de cellules plasmocytaires malignes dans la moëlle osseuse couplée à un déséquilibre de la balance ostéoblastes/ostéoclastes conduisant à des ostéolyses (Bataille *et al*, 1989, 1997). Les cellules de myélome expriment fortement le syndecan-1 et il a été démontré récemment que l'OPG *via* son domaine de liaison à l'héparine pouvait interagir avec le syndecan-1 avant d'être internalisée et dégradée par les cellules de myelome (Standal *et al*, 2002).

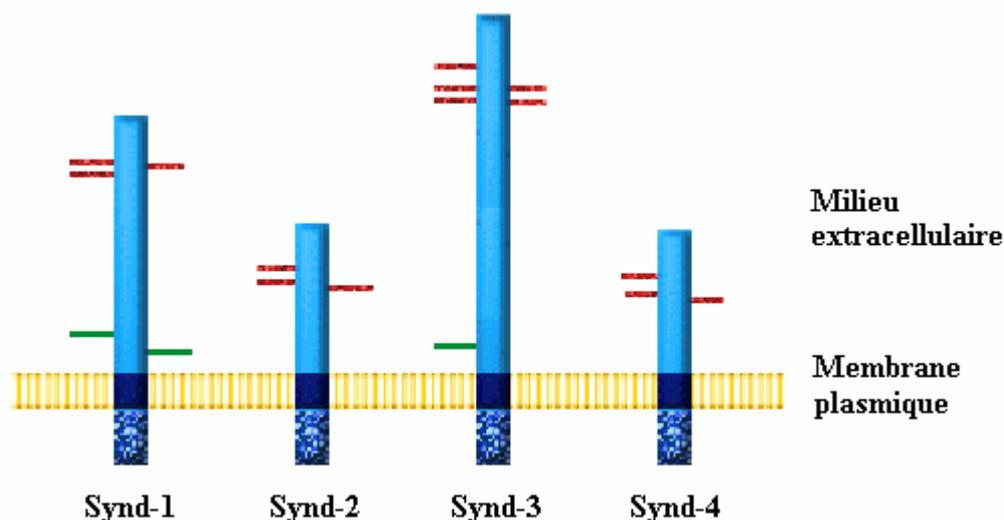


Figure 11 : Représentation schématique des syndecans.

— : chaîne d'héparane sulfate ; — : chaîne de chondroïtine sulfate.

7. MÉCANISMES D'INTERNALISATION ET DE DÉGRADATION INTRACELLULAIRE DES PROTÉINES.

7.1 L'endocytose

L'endocytose est un processus fondamental de la vie cellulaire consistant en l'internalisation vers des compartiments intracellulaires de portions de la membrane plasmique et de protéines membranaires. Les protéines membranaires sont internalisées vers des endosomes soit de façon constitutive, comme dans le cas des récepteurs impliqués dans l'approvisionnement cellulaire en nutriments (récepteur de la transferrine), soit de façon induite par la liaison de leurs ligands, comme dans le cas de récepteurs ayant un rôle de transmission du signal cellulaire.

7.1.1 L'endocytose dépendante de la clathrine

La voie majeure d'internalisation des protéines membranaires est la voie dite dépendante de la clathrine, qui passe par des structures spécialisées de la membrane plasmique appelées puits recouverts de clathrine (CCP, **clathrin coated pits**). Ces structures sont caractérisées

par la présence d'un manteau protéique constitué majoritairement du complexe AP-2 et de la clathrine. Le complexe adaptateur AP-2 contrôle la polymérisation de la clathrine à la membrane et sélectionne les molécules à internaliser (Benmerah et Lamaza, 2002). Les récepteurs internalisés par cette voie sont classés en deux groupes. Certains, comme celui de la transferrine ou des LDL (**low density lipoproteins**) le sont de façon « constitutive », c'est-à-dire indépendamment de la liaison de leur ligand, et se réinsèrent dans la membrane plasmique, alors que d'autres, principalement les récepteurs de facteurs de croissance tel que l'EGF (**epidermal growth factor**) et l'insuline, ne sont internalisés qu'après la liaison de leur ligand et sont dégradés par la suite dans les lysosomes. L'interaction de l'insuline sur son récepteur membranaire permet de transduire un signal *via* la voie Ras/Erk. Le complexe est ensuite internalisé et dirigé soit dans la voie de recyclage vers la membrane plasmique, soit dans la voie de dégradation lysosomale (Li *et al.*, 2005) .

Une fois dans les endosomes, les complexes protéiques ont un devenir variable (**Figure 12**). Le pH acide des endosomes peut favoriser la dissociation entre ligand et récepteur (Krueger *et al.*, 1997). Les récepteurs «vides» de leur ligand reprennent la conformation qu'ils avaient avant activation et sont déphosphorylés et recyclés vers la membrane plasmique. Le récepteur de la GnRH (**gonadotropin-releasing hormone**) (Vrecl *et al.*, 1998), est un exemple de récepteurs qui sont recyclés. D'autres récepteurs, comme le récepteur PAR-1 (Protease-Activated Receptor-1) de la thrombine (Trejo *et al.*, 1999), une fois arrivés dans le compartiment endosomique, sont au contraire dirigés vers les lysosomes où ils sont dégradés. Dans ce cas, le processus rapide de dégradation dans les lysosomes se justifie par le clivage protéolytique du récepteur lors de son activation, qui en fait un récepteur à usage unique. Pour les autres complexes protéiques ne recyclant pas, l'endocytose et la dégradation qui s'ensuivent favorisent vraisemblablement une transmission du signal cellulaire extrêmement transitoire.

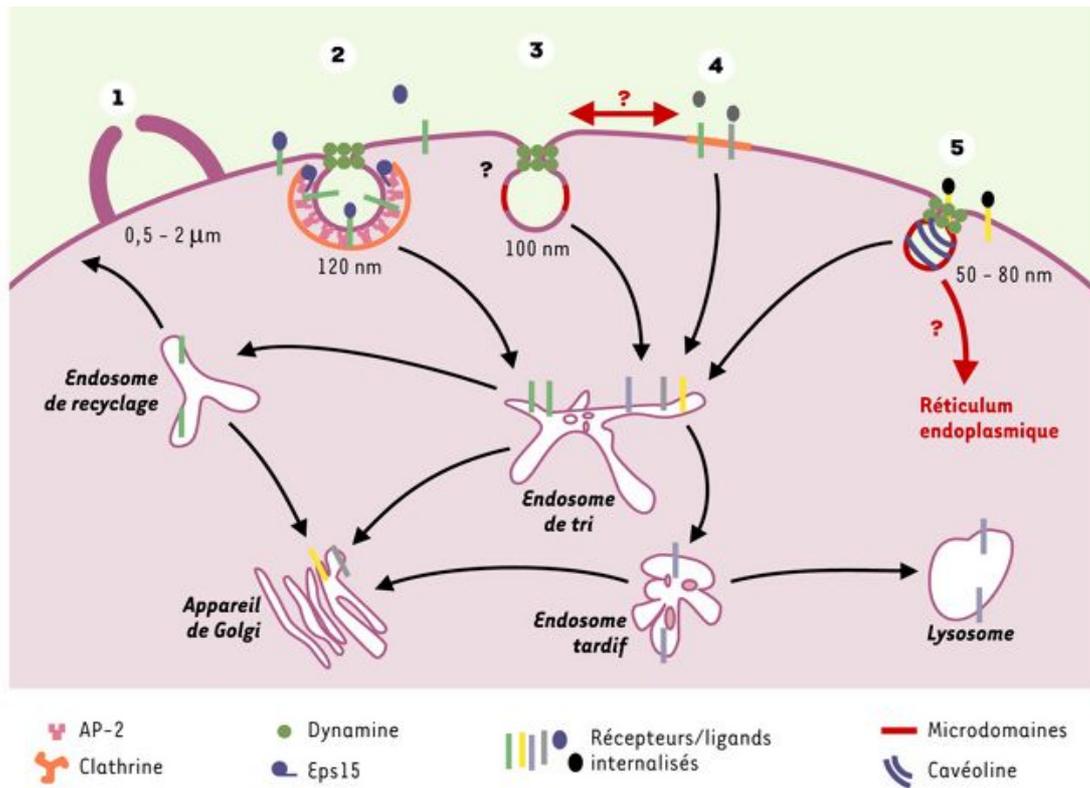


Figure 12. Les différentes voies d'endocytose (Benmerah et Lamaze, 2002).

7.1.2 L'endocytose indépendante de la clathrine (EIC)

7.1.2.1 Les cavéoles

Les cavéoles sont nombreuses dans les cellules endothéliales et absentes des lymphocytes et des neuroblastes. Leur caractérisation moléculaire a été facilitée par l'identification en 1992 de la cavéoline (Rothberg *et al.*, 1992), une protéine intégrale impliquée dans leur formation et qui se lie au cholestérol. L'enrichissement spécifique des cavéoles en cholestérol et en glycosphingolipides leur confère les propriétés caractéristiques des microdomaines lipidiques. L'enrichissement des cavéoles en intermédiaires des voies de signalisation laisse penser qu'elles jouent un rôle important dans la signalisation. En revanche, leur rôle dans l'endocytose est resté longtemps controversé. Elles sont sûrement impliquées dans la transcytose de molécules, dans les cellules endothéliales et dans l'endocytose de certaines toxines bactériennes. Des travaux permettent de dégager un certain consensus. Dans la plupart des cellules, à l'état basal, les cavéoles seraient des organites très peu dynamiques qui ne sont pas endocytés de manière constitutive (Thomsen *et al.*, 2002). Elles possèdent l'équipement protéique nécessaire pour se détacher de la membrane et fusionner avec les compartiments intracellulaires. De fait, l'internalisation par les cavéoles peut être induite par certains virus, par des bactéries ou encore en réponse à l'agrégation des protéines « glypiées » (ancres GPI, glycosyl phosphate inositol) (Kurzchalia et Parton, 1999). Il est intéressant de noter que la surexpression de la cavéoline augmente l'endocytose de l'hormone de croissance (Lobie *et al.*, 1999) tandis qu'elle bloque l'endocytose du facteur autocrine de mobilité AMF (Le PU *et al.*, 2002). Il apparaît donc que le rôle des cavéoles dans l'EIC est étroitement lié au type de molécule étudiée.

7.1.2.2 Lipides rafts

La répartition asymétrique de certains lipides dans le plan latéral des membranes crée des microdomaines particuliers sous forme de phase liquide ordonnée dans un environnement membranaire plus fluide, ce qui permet de concentrer sélectivement certaines protéines. La composition lipidique particulière de ces microdomaines les rend résistants à l'action de détergents anioniques à 4°C, une propriété utilisée pour les isoler. Ces microdomaines sont enrichis en cholestérol, glycosphingolipides, sphingomyéline et en glycérophospholipides insaturés, tout comme les cavéoles qui constituent une variété de microdomaines. À l'image des cavéoles, les microdomaines sont enrichis en protéines « glypiées » (Simons, et Toomre, 2000). L'étude de l'endocytose des protéines « glypiées » a suggéré que les microdomaines seraient impliqués dans leur internalisation. Récemment, les microdomaines ont été impliqués dans des phénomènes d'endocytose plus conventionnels. Ainsi, le récepteur de l'interleukine-2 est associé de façon constitutive aux microdomaines de la membrane plasmique et est présent dans les endosomes précoces, suggérant que les récepteurs restent associés aux microdomaines au cours de leur endocytose. Il a été montré que des lipides récepteurs de toxines bactériennes, comme la toxine cholérique (Orlandi, 1998), sont concentrés dans les microdomaines et subissent une endocytose dynamique (Falguières, 2001). Les microdomaines de la membrane plasmique présentent donc des caractéristiques qui leur permettent d'assurer l'endocytose efficace de lipides et de récepteurs, de façon indépendante des CCP et des cavéoles.

La composition lipidique particulière des lipides rafts ou microdomaines et les cavéoles sont enrichies en cholestérol, glycosphingolipides, sphingomyéline et en glycérophospholipides (Martinez-Vicente *et al.*, 2005). La répartition asymétrique de certains lipides dans le plan latéral des membranes crée des microdomaines particuliers, ce qui permet de concentrer sélectivement certaines protéines. A l'inverse, les cavéoles sont caractérisées par leur forme en oméga inversé, ce qui a facilité leur identification en microscopie électronique. Les cavéoles nombreuses dans les cellules endothéliales sont constituées par de la cavéoline, une protéine intégrale impliquée dans la forme inversée et qui se lie au cholestérol. L'enrichissement spécifique des cavéoles en cholestérol et en glycosphingolipides leur confère les propriétés caractéristiques des microdomaines lipidiques. Ces cavéoles sont impliquées dans l'endocytose de diverses molécules. Il est aussi intéressant de noter que la surexpression de la cavéoline augmente l'endocytose de l'hormone de croissance (Lobie *et al.*, 1999). Il a été montré récemment que le récepteur TNFRI est plus particulièrement localisé au niveau des cavéoles et qu'en présence de TNF, l'endocytose de TNFRI était constatée (Alessio *et al.*, 2005). D'autres récepteurs membranaires tel que le TGF- β R et la gp60 peuvent aussi internaliser leur ligands TGF- β et l'albumine respectivement via la voie des cavéoles (Puri *et al.*, 2005; Shajahan *et al.*, 2004).

Enfin, les microdomaines ont été impliqués dans des phénomènes d'endocytose très conventionnels. Le Syndecan-1 est endocyté via la voie des lipides-rafts (microdomaine) pour être ensuite dégradé par les lysosomes (Lamaze *et al.*, 2001 ; Standal *et al.*, 2002). D'autres récepteurs transmembranaires tels que le récepteur de l'antigène des lymphocytes T et le récepteur à haute affinité des IgE ont été retrouvés dans les microdomaines (Benmerah et Lamaza, 2002). Les microdomaines de la membrane plasmique présentent donc des caractéristiques qui leur permettent d'assurer l'endocytose efficace de lipides et de récepteurs, de façon indépendante des CCP et des cavéoles.

7.3 Dégradation intracellulaire des protéines et des produits endocytés par la cellule.

Il existe un équilibre entre la synthèse protéique et la dégradation intracellulaire des protéines. En effet, la cellule est capable de contrôler la survie des protéines synthétisées par deux mécanismes de dégradation intracellulaire : le protéasome et les lysosomes.

7.3.1 Le protéasome

Le protéasome est un complexe protéolytique de haut poids moléculaire, présent aussi bien dans le cytosol que dans le noyau. A l'intérieur de ce complexe d'environ 700 kDa, se trouvent les sites actifs assurant la protéolyse. Les protéines destinées à être dégradées sont reconnues spécifiquement sous une forme dépliée au cœur protéolytique du complexe protéasome. Pour qu'une molécule puisse être dégradée par le protéasome, un signal constitué par une ou plusieurs chaînes de molécules d'ubiquitine est nécessaire (Haas et Siepmann, 1997). Les rôles physiologiques du protéasome sont impliqués dans la dégradation d'un grand nombre de protéines cytosoliques et nucléaires (Goldberg *et al.*, 2002), ainsi que dans la dégradation de protéines anormales ou oxydées (Doherty *et al.*, 2002). Le protéasome intervient également dans la présentation des antigènes au système immunitaire (Inaba et Inaba, 2005) et grâce à des séquences NLS (nuclear localization signal) situées sur certaines de ces sous-unités, le protéasome peut être dirigé vers le noyau, où il va réguler la division cellulaire par l'intermédiaire de la protéolyse des cyclines (Seufert *et al.*, 1995).

7.3.2 Le lysosome

A l'inverse, le lysosome, qui est un organite intracellulaire contenant une panoplie de plus de 40 hydrolases essentielles pour la dégradation de molécules biologiques, ne requiert pas de signal spécifique (Bechet *et al.*, 2005). Une fois que les molécules exogènes ou endogènes se retrouvent à l'intérieur d'une vésicule, celle-ci fusionne avec le compartiment lysosomal et les protéines sont ensuite dégradées. Des cellules de myélome exprimant le Syndecan-1 sont capables d'internaliser l'OPG via la voie des lipides-rafts avant de le dégrader dans les lysosomes. En effet, une localisation de l'OPG a été retrouvée au niveau du cytoplasme à l'intérieur des compartiments lysosomiaux (Standal *et al.*, 2002). Cette dégradation protéolytique du lysosome est assurée par des endopeptidases et des exopeptidases à un pH acide (pH 5). La plupart des protéines sont complètement dégradées en peptides et en acides aminés à l'intérieur du lysosome pour être ensuite réutilisés pour la fabrication de nouvelles protéines (Bechet *et al.*, 2005).

8. BUT DE LA THÈSE

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 et tout déséquilibre est à l'origine de nombreuses pathologies ostéo-condensantes, ostéolytiques, bénignes ou malignes.

La balance apposition/résorption osseuse est essentiellement régulée par la triade moléculaire OPG/RANK/RANKL. Ce système a été décrit pour être dérégulé dans plusieurs pathologies ostéolytiques d'origine tumorale telles que le myélome multiple (Grimaud *et al.*, 2003 ; Giuliani *et al.*, 2001 ; Roux *et al.*, 2002). 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. Comme on l'a vu précédemment, RANKL peut être exprimé au niveau membranaire de la cellule ou produit sous forme soluble, soit directement par la cellule, soit par un mécanisme protéolytique de clivage membranaire. Dans de nombreuses pathologies, le taux de RANKL soluble circulant dans le sang est augmenté, d'où l'intérêt thérapeutique de limiter sa production, soit par inhibition du clivage de RANKL membranaire, soit par inhibition de l'expression de RANKL membranaire. A l'inverse, la production endogène d'OPG est soit inhibée soit trop faible pour compenser l'augmentation de l'expression de RANKL. Par conséquent, la triade OPG/RANK/RANKL 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.

Plusieurs études ont pu montrer que l'administration de l'OPG en tant qu'agent thérapeutique pouvait contrôler l'hypercalcémie maligne et l'apparition ou la progression de métastase osseuse, diminuer la résorption osseuse et augmenter la masse osseuse (Capparelli *et al.*, 2000 ; Luger *et al.*, 2001). Si son efficacité a été démontrée contre la résorption osseuse, cependant, son devenir après son administration reste très flou. Par conséquent, nous avons entrepris une étude de la biodisponibilité de l'OPG dans le milieu extracellulaire.

Plusieurs isoformes de RANKL sont connues. La forme soluble peut être obtenue suite à un clivage protéolytique de RANKL membranaire. Un tel mécanisme de clivage protéolytique peut éventuellement moduler la biodisponibilité d'OPG extracellulaire. Afin de mener à bien ces projets, nous avons utilisé des cellules humaines de rein fœtal (293) n'exprimant initialement ni RANKL ni OPG et qui ont été transfectées par du cDNA de RANKL transmembranaire totale de souris (293RL). Les études menées sur l'influence de RANKL sur la biodisponibilité de l'OPG et sur le clivage protéolytique ont également été effectuées sur les cellules 293 transfectées par du cDNA de RANKL transmembranaire ayant le domaine intracytoplasmique incomplet (293RL2.0) ou absent (293RL2.1). Enfin, nous avons mené une étude sur la participation de ces différentes isoformes de RANKL dans la différenciation ostéoclastique. Pour cela, la lignée RAW 264.7, qui est une lignée monocytaire murine capable de se différencier en ostéoclastes sous l'action de RANKL soluble *in vitro*, a été choisie comme modèle d'ostéoclastogenèse (Wittrant *et al.*, 2004). Les différentes cellules exprimant les différentes isoformes de RANKL ont ainsi été cultivées en co-cultures avec les cellules RAW 264.7.

MATERIELS ET METHODES

1) CLONAGE ET TRANSFECTION D'ISOFORME DE RANKL DE SOURIS

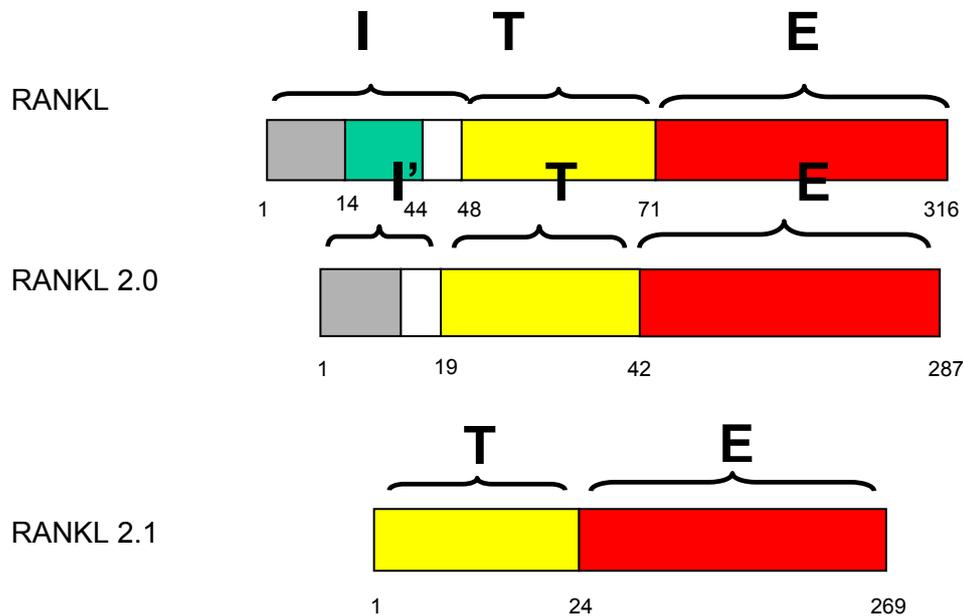


Figure 13. Représentation des isoformes de RANKL de souris

Le protocole de clonage des isoformes de RANKL (Fig. 13) a été mené en deux étapes (fig. 14). Après avoir inséré le domaine intracellulaire tronqué (I') dans le plasmide pcDNA3 (Fig. 15), le domaine transmembranaire et extracellulaire (T-E) a été rajouté au plasmide pcDNA3 ayant intégré ou non le domaine intracellulaire.

a) Clonage du domaine intracytoplasmique (I')

La séquence intracytoplasmique (I') est choisie à partir de la séquence du cDNA de RANKL2.0 de souris (gi : 8843822) et correspond aux séquences en position 1 à 54. Les oligonucléotides sens et antisens ont été synthétisés par Sigma Genosys.

Séquence Intracytoplasmique (I')

Sens

GATCC¹ATGCGCCGGGCCAGCCGAGACTACGGCAAGTACCTGCGCACTCCGGCGTCCCGCGATATCGC⁵⁴

Anti-Sens

GGCCGCGATATC**GCGGGACGCCGGAGTGCGCAGGTA**CTTGCCGTAGTCTCGGCTGGCCCCGGCGCATG

Les oligonucléotides (l') sens et antisens sont repris dans de l'eau stérile à 1 µg/µL puis hybridés pour former des duplex appariés. Le plasmide pcDNA3 (2 µg) est digéré par les enzymes de restriction *BamHI* et *NotI* (BioLabs) dans 50 µL final afin de créer des extrémités sortantes compatibles avec celles des oligonucléotides appariés. 4 µg de notre séquence l' est alors cloné dans environ 80 ng de pcDNA3 digéré entre les sites de restriction *BamHI* et *NotI* en présence de la T4 DNA ligase (*Invitrogen*). Le mélange réactionnel ainsi constitué est laissé pendant 48 heures à 4°C. Ensuite la ligase est inactivée en incubant pendant 20 minutes à 65°C. Afin d'éliminer les pcDNA3 qui n'auraient pas incorporé la séquence l', une digestion à *BamHI* est effectuée sur le produit de ligation car ce site est éliminé lors de l'étape de ligation. Le produit de ligation est précipité par l'éthanol 100 % et le culot est ensuite repris dans 10 µL de tampon TE (Tris-HCL 10mM et EDTA 1mM) puis introduit par choc thermique dans des bactéries compétentes XL1 blue (STRATAGENE). Ces bactéries sont ensuite cultivées sur des boîtes de gélose LB (Luria Bertani) additionné de 10 µg/ml d'ampicilline pour ne sélectionner que les bactéries ayant incorporé le plasmide [pcDNA3-l'].

Mini-préparations de plasmides

Cette technique a pour but d'extraire et de purifier un plasmide introduit dans une souche bactérienne. La méthode utilisée est la méthode classique de lyse alcaline.

15 colonies récoltées sur la gélose sont mises chacune en culture dans 2 mL de milieu LB [20g/L de Luria Bertani (Invitrogen)] pendant la nuit à 37°C, sous agitation. Le lendemain, le culot bactérien récupéré est resuspendu avec 100 µL de solution 1 (glucose 50mM, Tris-HCl 25mM pH 8, EDTA 10mM) et lysé par addition de 200 µL de solution 2 (NaOH 0,2M, SDS 1%). Ensuite, l'ADN bactérien dénaturé par la soude est précipité en ajoutant 150 µL de solution 3 (KAc 3M, Acide acétique 2M) durant 10 minutes à 4°C.

Afin d'extraire les protéines contenues dans le mélange, 250 µL de phénol/chloroforme sont ajoutés. Ce mélange est ensuite centrifugé, après 5 minutes d'incubation à température ambiante, pendant 5 minutes à 14000 tours par minute. La phase aqueuse supérieure contenant l'ADN plasmidique est ensuite récupérée. L'ajout de 100 µL d'éthanol 100% le précipite. Le tube est à nouveau centrifugé dans les mêmes conditions, le culot est récupéré et repris dans 250 µL d'Acétate de Sodium 0,3M. 500 µL d'éthanol 100% sont rajoutés puis centrifugés. Le culot d'ADN asséché est resuspendu dans 50 µL de tampon TE et stocké à -20°C. La séquence du domaine intracytoplasmique incomplet (l') est ensuite vérifiée par un séquençage complet par la société GENOME express, France (GEXbyweb).

b) Amplification de T-E (Transmembranaire et Extracellulaire)

En utilisant le couple de primers ci-dessous, la partie transmembranaire et extracellulaire de RANKL a été obtenue par une amplification par RT-PCR à partir du cDNA de cellules 293RL exprimant RANKL total de souris.

Couple de primers pour l'amplification de la séquence transmembranaire et extracellulaire (T-E)

Sens (gi : 31982426 ; position 311- 343)

TCCATGTTCCCTGGCCCTCCTGGGGCTGGGACTG

Anti-sens (gi : 31982426 ; position 1120- 1079)

TCAGTCTATGTCCTGAACTTTGAAAGCCCCAAAGTACGTCGC

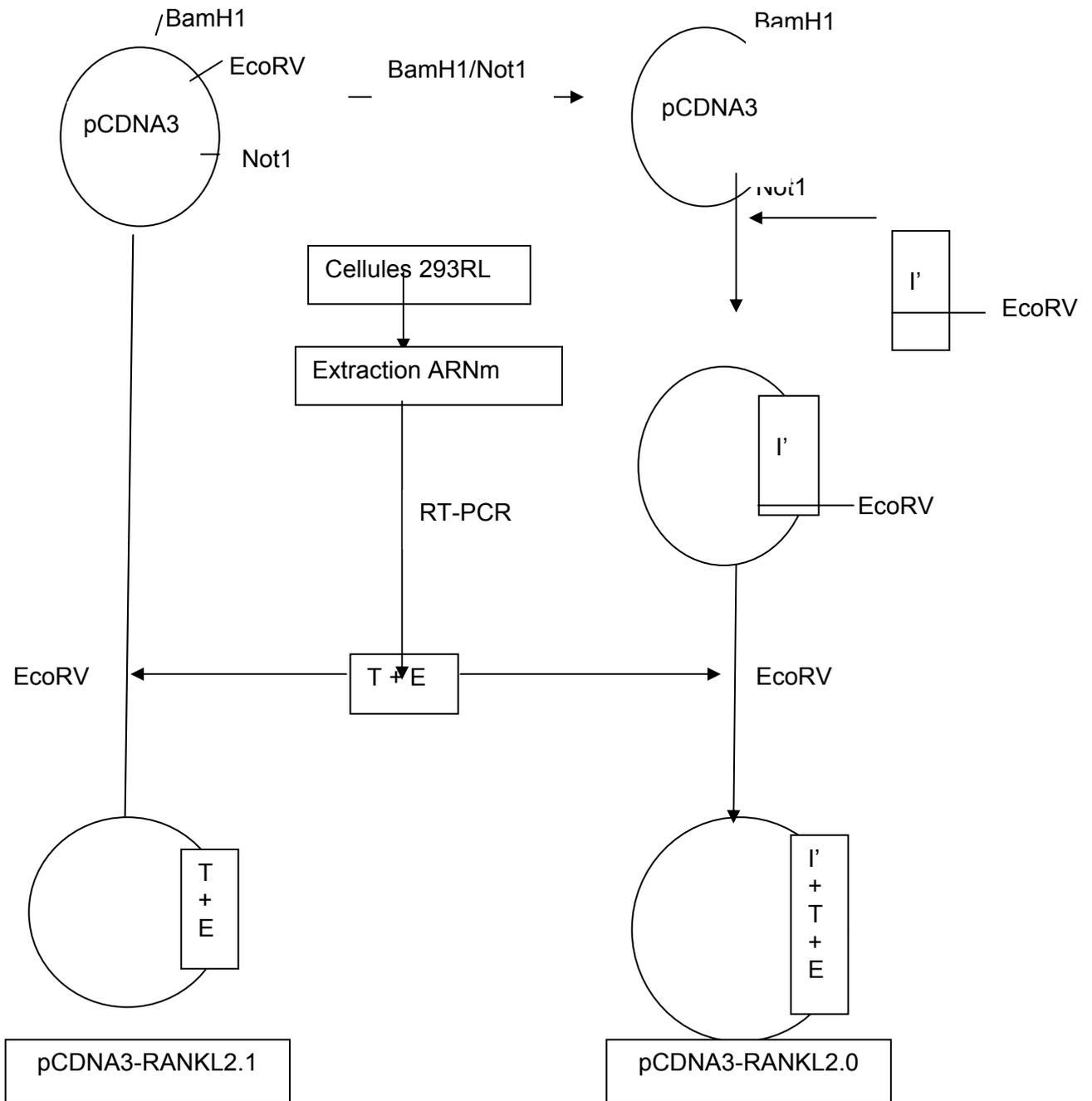
c) Clonage de T-E dans le plasmide [pcDNA3 +/- l']

Le plasmide pcDNA3 ayant déjà intégré ou non le domaine intracellulaire tronqué (l') est digéré par l'enzyme *EcoR V*. Le domaine T-E a ensuite été inséré dans ce plasmide. La transformation des bactéries compétentes XL1 blue (STRATAGENE) de même que l'extraction du plasmide pcDNA3 ayant intégré notre domaine T-E sont réalisées selon le même protocole que précédemment. Les séquences des clones d'intérêt (**RANKL 2.0 et RANKL 2.1**) sont ensuite vérifiées par un séquençage complet par la société GENOME express, France (GEXbyweb). Le plasmide final est alors amplifié et purifié selon le protocole du kit de maxi-préparation de QIAGEN, donnant un produit suffisamment concentré et purifié pour transférer des cellules eucaryotes. La concentration de l'ADN est ramenée à 1µg/µl.

d) Transfection stable de cellules 293 par le plasmide pcDNA3-RANKL2.0 ou pcDNA3-RANKL2.1

Des cellules humaines de rein fœtal non transfectées (293) et transfectées par du RANKL complet de souris (293RL) nous ont été gracieusement offertes par R. Josien de l'INSERM U643 (Nantes). Les cellules 293 sont transfectées stablement à l'aide du poly éthylène imine (PEI) par le plasmide pcDNA3 codant pour RANKL 2.0 ou RANKL 2.1. Le mélange réactionnel utilisé pour la transfection est constitué de 1,2 µL de PEI à 8,91 g/L dans 98,8 µL de NaCl à 150 nM et de 8 µg d'ADN plasmidique dans 100 µL de NaCl à 150 nM. Les 2 solutions sont mélangées, incubées 5 minutes à température ambiante puis ajoutées aux cellules adhérentes. Après 6 heures d'incubation à 37°C, le surnageant est éliminé et remplacé par du milieu de culture frais. Les cellules sont ensuite sélectionnées par un milieu de DMEM/10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF) additionné de généticine 1200 µg/ml (Invitrogen). L'expression de RANKL est vérifiée par RT-PCR à partir des ARN extraits des cellules et l'expression de la protéine a quant à elle, été analysée par un dosage ELISA dans les lysats cellulaires et dans les surnageants de culture cellulaire.

Figure 14 : Schéma représentant les différentes phases du sous clonage du cDNA de RANKL2.0 ou de RANKL2.1.



I: Intracellulaire **I'** : Intracellulaire tronqué
T: Transmembranaire
E: Extracellulaire

Sous clonage du cDNA de
RANKL2.0 ou RANKL2.1

Figure 15 : Carte de plasmide pcDNA₃-neomycine

L'ADNc codant pour le RANKL 2.0 ou RANKL2.1 est inséré dans le pcDNA₃-neomycine entre les sites de restriction BamH I et Not I.

2) CULTURE CELLULAIRE

a) Ostéoblastes

Les cultures primaires de cellules ostéoblastiques sont obtenues à partir de tissu osseux de tibia de souris. Après prélèvement stérile du tibia, les échantillons sont rincés 2 fois avec du PBS stérile, puis rincés 3 fois avec du milieu de culture seul sans SVF. Les échantillons sont ensuite découpés en petits fragments de 1,5 à 2 mm de diamètre et mis en culture dans un milieu complet DMEM/SVF. Une fois les cellules à confluence, les ARNm sont extraits des cellules et une vérification par RT-PCR des marqueurs ostéoblastiques à savoir l'ostéocalcine, la phosphatase alcaline et la BSP (Bone Sialo Protein) est réalisée.

b) Culture

Les cellules précédemment décrites de même que les cellules MG63 (lignées cellulaires d'ostéosarcome humain) et 293FT (tumeur de rein embryonnaire humain exprimant l'antigène T du SV40) ont été cultivées dans un milieu de culture DMEM additionné de 10 % de Sérum de Veau Fœtal (SVF) et incubées dans une atmosphère humide avec 5% de CO₂ et 95% d'air à 37°C. La viabilité des cellules a été évaluée par la méthode d'exclusion au bleu Trypan et elles ont été ensuite comptées à l'aide de la cellule de Mallassez et mises en culture dans des plaques 6 puits à raison de 100 000 cellules par puits.

A confluence, les cellules sont remises en culture dans du DMEM seul en présence ou non de certains inhibiteurs pendant un temps donné. Après la période de préincubation, le milieu est remplacé par du DMEM additionné ou non de facteurs solubles en présence ou non des inhibiteurs spécifiques et incubé à 37°C à différents temps. A la suite de ce traitement :

- 1) **Les surnageants cellulaires** sont prélevés, afin de mesurer le taux de RANKL soluble ou le taux d'OPG extracellulaire par la technique d'Elisa.
- 2) **Les cellules** sont soit analysées par un marquage immunohistochimique
- 3) soit lysées pour extraire leur ARN dans le but d'étudier le niveau d'expression de certains ARNm par RT-PCR semi quantitative ou
- 4) lysées afin d'extraire le contenu protéique pour analyser certaines protéines spécifiques par western blot.

c) Différenciation ostéoclastique

La Lignée cellulaire RAW 264.7, obtenue grâce au Pr. Matsumoto (Japon), 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 en milieu α MEM (minimum essential medium) sans rouge de phénol (Invitrogen) contenant 2 mM de L-glutamine et supplémenté avec 10% de SVF (Dominique Dutscher) et 1% d'acides aminés non essentiels (Invitrogen). A confluence, ces cellules sont grattées à l'aide d'un "scrapper", 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 μ L de milieu. Une incubation de deux heures est ensuite réalisée à 37°C.

Après adhérence des cellules au plastique, la différenciation des RAW 264.7 en cellules ostéoclastiques est obtenue en les cultivant pendant 4 jours en présence de RANKL à 100 ng/ml (Amgen Inc.). En parallèle, une co-culture des RAW 264.7 en absence de RANKL soluble est réalisée en présence des 4 types cellulaires (293 ou 293RL ou 293RL2.0 ou 293RL2.1) à raison de 3000 cellules par puits avec changement de milieu tous les deux jours. Les ostéoclastes ainsi différenciés sont 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) ANALYSE PROTÉIQUE

a) Elisa

Les dosages de RANKL soluble et d'OPG ont été effectués à l'aide du kit ELISA DuoSet R&D (Abingdon, Grande-Bretagne). Une plaque Elisa de 96 puits est coatée en anticorps anti RANKL de souris à 0,4 µg/ml ou en anticorps anti OPG humaine à une concentration de 2 µg/ml. La première étape consiste à déposer 100µl d'anticorps dans chaque puits et d'incuber toute une nuit à température ambiante. Après 3 rinçages avec une solution détergente de PBS 0,05% Tween 20, 100 µl d'une solution de PBS/BSA 1%/sucrose 5% ont été déposés dans chaque puits afin de saturer les sites non fixés par les anticorps. La plaque a été incubée une heure à température ambiante sous agitation, puis trois rinçages ont été effectués avec la solution détergente.

Après dilution adéquate, chaque échantillon à doser a été déposé en duplicate à raison de 100µl par puits. En parallèle, une gamme étalon de RANKL recombinante de souris ou d'OPG recombinante humaine a été réalisée.

Une incubation de 2 heures est effectuée à température ambiante. Après 3 rinçages au PBS/TWEEN 20, 100 µl d'anticorps anti-RANKL biotinylés à 200 ng/ml ou anti-OPG biotinylés à 50 ng/ml (dilués dans du PBS/BSA 1%) ont été déposés par puits. Une nouvelle incubation de 2 heures à température ambiante est réalisée. Après 3 rinçages au PBS+TWEEN 20, 100µl de Streptavidine Conjugase diluée au 200^{ème} ont été déposés par puits, puis incubés 20 minutes à température ambiante sous agitation à l'obscurité. Après rinçages, 100µl de TMB (Tetramethylbenzidine) ont été déposés dans chaque puits. La plaque a ensuite été réincubée 20 minutes à température ambiante à l'obscurité. La réaction enzymatique est ensuite stoppée par 100 µl d'une solution d'acide sulfurique 2M. La densité optique de chaque puits a été mesurée à 450 nm à l'aide d'un lecteur de plaque ELISA (Victor, Hewlett Packard).

b) Dosage protéique

Les cellules sont recouvertes de tampon de lyse (annexe 1.1) à raison de 200 µl par puits (plaque 6 puits) puis placées à 4°C sous agitation lente pendant 30 minutes de façon à répartir continuellement et uniformément la solution de lyse. Les lysats cellulaires sont ensuite centrifugés à 10 000 g pendant 15 minutes à 4°C. Ces lysats peuvent être conservés à -20°C jusqu'à l'analyse.

Les protéines contenues dans les lysats cellulaires sont dosées par la méthode au BCA (acide bicinchoninique). Dans une plaque 96 puits à fond rond, 10 µl de lysats cellulaires ou 10 µl d'une gamme d'albumine bovine sérique sont mis en présence de 200µl de réactif BCA [Copper (II) sulfate (Sigma) dilué au 1/50 dans une solution d'acide bicinchoninique (Sigma)]. La plaque est ensuite incubée pendant 30 minutes à 37°C et les densités optiques lues à 570 nm.

c) Western Blot

Les protéines sont séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide en fonction de leur poids moléculaire. Les molécules séparées sont ensuite transférées sur une membrane de PDVF (polyfluorure de vinylidène, Immobilon™, Millipore, Grande-Bretagne) puis un marquage à l'aide d'un anticorps spécifique de la protéine recherchée est réalisé.

1. Préparation et lyse des cellules

Les cellules sont ensemencées en plaque 6 puits à raison de 100 000 cellules par puits. Lorsque les cellules ont adhéré au support ou après transfection, les différents traitements sont réalisés : 200 µL de tampon de lyse (annexe 1.1) sont ensuite ajoutés et les plaques sont placées à 4°C pendant 30 minutes avec agitation régulière. Les lysats cellulaires sont ensuite récupérés en tubes eppendorf. Une centrifugation à 10000g pendant 15 minutes à 4°C est réalisée. Les lysats obtenus sont alors conservés à -20°C jusqu'à l'analyse.

2. Réalisation du gel et migration électrophorétique

Le gel est composé de deux parties : le gel de séparation (annexe 1.2) surmonté du gel de concentration (annexe 1.3). Les lysats cellulaires sont dilués au demi dans le bleu de chargement (annexe 1.4) et portés à ébullition pendant 5 minutes. Ils sont ensuite déposés à raison de 15µg dans les puits du gel dénaturant à 10% d'acrylamide ainsi que 5 µL de marqueur de poids moléculaire (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France). La migration est réalisée dans un tampon dénaturant (annexe 1.5) avec un courant de 10 mA par gel pour le gel de concentration puis de 20 mA par gel pour le gel de séparation. La migration est stoppée dès la sortie du gel du bleu de chargement.

3. Transfert sur membrane

Les protéines qui ont préalablement été séparées par électrophorèse sont transférées sur une membrane de PDVF. Le montage est réalisé dans du tampon de transfert (annexe 1.6) puis placé dans une cuve de transfert contenant le même tampon. Le transfert se fait sur une période de 16 heures avec un courant de 40 mA.

4. Marquage et révélation

Une coloration des protéines transférées au Rouge Ponceau (Ponceau S (2%), acide trichloroacétique (30%), acide sulfosalicylique (30%), Sigma) est réalisée afin de visualiser les protéines et de vérifier que le transfert se soit correctement réalisé. Après trois rinçages à l'eau courante, la membrane est décolorée grâce à deux lavages de 10 minutes sous agitation rapide dans le tampon de lavage. Puis, une étape de saturation est réalisée en incubant la membrane une heure, sous agitation lente et dans un récipient couvert, dans la solution contenant du PBS/Tween 0,05 % additionné de 3 % de BSA. La membrane est ensuite incubée en présence de l'anticorps primaire spécifique de la protéine (anti RANKL de souris ou anti OPG ou anti TACE de chez R&D systems). Cette étape se fait sous agitation lente et dans un récipient couvert durant une nuit.

Trois lavages de 10 minutes dans le tampon de lavage (annexe 1.7) sont effectués sous agitation rapide suivis d'une nouvelle étape de saturation de 15 minutes dans une solution contenant du PBS/Tween 0,05 % additionné de 5 % de lait en poudre sans lipides. La membrane est alors incubée 45 minutes sous agitation lente et en récipient couvert avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase dilué au 1/5000^{ème} dans la solution de PBS/Tween 0,05 % additionné de 5 % de lait. Trois lavages de 10 minutes sous agitation rapide sont ensuite réalisés dans le tampon de lavage.

La révélation se fait en incubant la membrane une minute dans une solution ECL (BM chemiluminescence blotting substrate, Roche) contenant le substrat de l'enzyme peroxydase, le luminol. Le résultat du blot est visualisé par chimioluminescence. Pour chaque protéine, une exposition de quelques secondes à une heure est choisie de façon à obtenir un signal visible non saturé.

d) Immunocytochimie

Après traitement des cellules aux différents facteurs, les surnageants sont récupérés et les cellules cytopspinées à température ambiante. Une fixation à l'acétone pendant 10 minutes est réalisée avant toute congélation possible. Les lames peuvent être stockées à -20°C après cette étape. Pour le marquage des lames, 3 réhydratations dans du PBS sont réalisées. Ensuite une perméabilisation dans du PBS-Triton 0,1% de la membrane plasmique est nécessaire pendant 5 minutes à température ambiante. Les lames sont rincées 3 fois dans du PBS pendant 5 minutes avant de saturer avec du PBS-BSA 4% pendant 15 minutes. On enlève la solution saturante sans rincer et les lames sont incubées pendant 1 heure à température ambiante en présence d'un anticorps anti-OPG de souris biotinylé (R&D Systems) à une concentration de 150 ng/ μl diluée dans du PBS-BSA 4%. Un contrôle sans anticorps est réalisé en parallèle.

Au bout d'une heure, les lames sont rincées 3 fois dans du PBS-BSA 1%. Une incubation de 30 minutes avec de la Streptavidine FITC diluée au 1/200^{ème} dans du PBS-BSA 1% est réalisée sur les coupes. Après 2 rinçages dans du PBS-BSA 1% puis dans de l'eau distillée, les lames sont ensuite montées en utilisant l'Imuno-mount (Shandon). Ces lames peuvent être conservées à 4°C . Les marquages ont ensuite été observés au microscope confocal (LEICA TCS-SP1). Les images correspondant à des coupes des cellules d'environ $0,3\mu\text{m}$ sont analysées grâce au logiciel Zeiss LSM.

e) Cytométrie en flux

Un couplage du FITC (Fluoresceine Iso Thio Cyanate) sur l'OPG-Fc a été réalisé par l'utilisation d'un kit FluoroTag (Sigma). 1 mg d'OPG-Fc est incubé en présence de 0,3 mg de FITC à l'abri de la lumière pendant 2 heures à température ambiante. La séparation de l'OPG-Fc du FITC en excès est effectuée en utilisant une colonne de gel filtration Sephadex G-25M. L'OPG-Fc-FITC ainsi récolté est dosé par la technique d'ELISA.

Les cellules 293 transfectées ou non sont réparties dans une plaque 96 puits à fond conique à raison de 1.10^6 cellules par puits. Elles sont ensuite incubées pendant 1 heure en présence de 1pmole d'OPG-Fc-FITC à 4°C dans une solution de PBS/BSA 1%. Après l'incubation à 4°C , trois lavages dans du PBS sont alors réalisés puis les cellules sont analysées par cytométrie en flux (FACs calibur, BD Biosciences, San José, USA) afin d'analyser la présence de RANKL membranaire.

4) ANALYSE DU NIVEAU D'EXPRESSION DES TRANSCRITS

a) Extraction d'ARN

Suivant la technique de Chomczynski et Mackey (1995), l'ARN est extrait des cellules en ajoutant 1mL de Trizol dans chaque puits (plaque 6 puits) afin d'induire la lyse cellulaire. Le fond des puits est gratté au Cell Scraper et la solution homogénéisée est mise dans un tube eppendorf. On laisse incuber pendant 5 à 10 minutes à température ambiante. Le Trizol permet non seulement la lyse cellulaire mais également la séparation entre l'ADN et l'ARN. Après la période d'incubation, on rajoute au lysat cellulaire 0,2 mL de chloroforme. On agite vigoureusement à la main pendant 15 secondes et on laisse reposer 2 à 3 minutes.

Après centrifugation à 11 500 g pendant 15 minutes entre 2 et 8°C, on récupère la phase aqueuse supérieure, qui correspond à environ 60% du volume de Trizol utilisé au départ. On ajoute 0,5 mL d'isopropanol afin de précipiter l'ARN. On laisse reposer pendant dix minutes et on centrifuge à 11 500 g pendant dix minutes entre 2 et 8°C. On élimine le surnageant, et le culot est lavé et remis en suspension dans au moins 1 mL d'éthanol 75%.

On centrifuge à 7 500 g pendant dix minutes entre 2 et 8 °C, et on élimine le surnageant. Le culot est alors séché brièvement sous cloche à vide puis dissout dans 20 µl d'eau DiEthylPyroCarbonate (DEPC). La concentration des ARN est calculée par lecture au spectrophotomètre à 260 nm. La qualité de l'extraction est évaluée par le rapport de l'absorbance à 260nm sur l'absorbance à 280nm. Ce dernier doit être compris entre 1,8 et 2. Toute contamination protéique diminue la valeur de ce rapport.

b) Gel de contrôle de l'intégrité des ARN

Afin de vérifier l'intégrité des ARN, on réalise une migration sur un gel d'agarose. Le matériel de migration (cuve, peignes, supports) est immergé toute une nuit dans une solution de soude 0,1 M puis rincé à l'eau DEPC. Les récipients servant à préparer le gel d'agarose sont autoclavés préalablement. Pour préparer un gel de 50 ml, on met 0,55 g d'agarose dans 37 ml d'eau DEPC. On chauffe et quand la température atteint 60°C on rajoute 5ml de MOPS 10X (N-morpholino-propane-sulfonic acid : Annexe 2.1) et 8ml de formaldéhyde à 37%.

Les échantillons sont préparés en mélangeant 1µg d'ARN avec 5 µl de tampon d'échantillon (annexe 2.2). Le mélange est incubé pendant 5 minutes à 80°C suivi d'une migration sur le gel d'agarose pendant 1 heure environ à 100V dans du MOPS 1X. Après la migration, dans le cas d'une bonne extraction, on observe deux bandes correspondant aux ARN 18S et 28S sous une lampe U.V.

c) Traitement à la DNase

Ce traitement à la DNase nous permet d'éliminer les éventuelles contaminations par de l'ADN après l'extraction d'ARN. On prélève 5 µg d'ARN totaux extraits et on rajoute 2,7 µl de 10X DNase I buffer et 2,7 µl de DNase I (1U/µl). Puis, on complète avec de l'eau DEPC pour un volume final de 27 µl. On laisse incuber 15 minutes à température ambiante et l'action de la DNase est arrêtée par l'addition de 3 µl d'une solution d'EDTA à 25mM. L'EDTA, grâce à son pouvoir de chélater les ions bivalents, va permettre l'inactivation de la DNase. On chauffe successivement pendant 10 minutes à 65°C pour détruire la DNase inactivée, puis 5 min à 95°C, ce qui permet de dénaturer les structures hybrides ARN-ARN.

d) Reverse transcription (RT)

La reverse transcription va permettre la transformation de l'ARNm en ADN complémentaire. On poursuit l'étape précédente par addition de 1 µl d'une solution d'oligo-dT à 500 µg/ml dans les tubes ayant subi le traitement à la DNase. Une hybridation de l'oligo-dT aux queues poly-adénylées des ARNm est effectuée à 65°C pendant 10 minutes. La rétro-transcription se poursuit en rajoutant 20 µl de mélange réactionnel (annexe 2.3) contenant l'enzyme Murine Moloney Leukemia Virus-Reverse transcriptase (MMLV-RT). La reverse transcription se termine par une incubation de 30 minutes à 42°C.

e) Polymerase chain reaction (PCR)

La solution utilisée pour la PCR est constituée par :

- 2 µl de produit de RT obtenu précédemment
- 3 µl d'oligo-nucléotides sens à 10 pmoles/µl
- 3 µl d'oligo-nucléotides anti-sens à 10 pmoles/µl
- 42 µl du milieu réactionnel pour PCR (annexe 2.4)

A partir de cette solution de PCR, plusieurs conditions d'amplification sont testées (T_m , durée des différentes étapes...) et les produits de PCR obtenus sont déposés sur un gel d'agarose à 1% contenant 0,002% de BET. On laisse migrer environ une heure à 100V puis on révèle sous U.V. la bande contenant l'ARNm rétro-transcrit et amplifié. Le couple d'amorces, Sens et Anti-Sens, utilisé s'hybride de façon spécifique à l'intérieur de l'ADNc, délimitant une séquence cible qui sera amplifiée.

Afin de déterminer les conditions d'utilisation des amorces, une courbe d'amplification de la quantité d'ADNc des différents transcrits en fonction du nombre de cycles a été réalisée. La modulation de l'expression des différents transcrits est étudiée en début de phase exponentielle d'amplification afin de visualiser une diminution ou une augmentation éventuelle de ces transcrits.

Tableau 2 : Les séquences d'amorces (sens et anti-sens), conditions d'utilisation et nombre de cycles employés pour amplifier les différents transcrits.

Nom/nombre de cycle	Séquences	Conditions	Taille
(30 cycles)	AS : 5' CGCTCAGTTTCTGGTTGTCA 3'	1 min 74°C	
18S (25 cycles)	S : 5' TCAAGAACGAAAGTCGGAGGTTTCG 3' AS : 5' TTATTGCTCAATCTCGGGTGGCTG 3'	1 min 94°C 1 min 62°C 1 min 74°C	462 pb
OPG (35 cycles)	S : 5' GCTAACCTCACCTTCGAG 3' AS : 5' TGATTGGACCTGGTTACC 3'	1 min 94°C 1 min 58°C 1 min 74°C	324 pb
RANKL (23 cycles)	S : 5' TCCCACACGAGGGTCCGCTG 3' AS : 5' TCAGTCTATGTCCTGAACTTTGAAAGCCCC 3'	20 secs 94°C 20 secs 60°C 1 min 74°C	881 pb
Syndecan-1 (40 cycles)	S : 5' AGCCAAGCTGACCTTCACAC 3' AS : 5' GTTTGGTGGGCTTCTGGTAG 3'	1 min 94°C 1 min 58°C 1 min 74°C	403 pb
TACE (27 cycles)	S : 5' TGTC AACACGATTTCGACGC 3' AS : 5' ACTGCATGTCCCAACCAGA 3'	1 min 94°C 1 min 60°C 1 min 74°C	308 pb
ADAM9 (28 cycles)	S : 5' GGCTATGTGGAGGGAGTTCA 3' AS : 5' GGTCCAAATCTCCAGTCCAA 3'	1 min 94°C 1 min 55°C 1 min 74°C	447 pb
ADAM10 (28 cycles)	S : 5' TGTGATTGCCAGATATCCA 3' AS : 5' TTCTCCTGGTGTGCACTCTG 3'	1 min 94°C 1 min 55°C 1 min 74°C	487 pb
ADAM19 (30 cycles)	S : 5' CTGATTACGGTGAGCAGCAA 3' AS : 5' TGATTAATTGGGCGTTGTCA 3'	1 min 96°C 1 min 55°C 1 min 74°C	493 pb
MT1-MMP (30 cycles)	S : 5' ATCTGTGACGGGA ACTTTGAC 3' AS : 5' ACCTTCAGCTTCTGGTTGTTG 3'	1 min 94°C 1 min 55°C 1 min 74°C	570 pb
MT2-MMP (38 cycles)	S : 5' GGCCGACATCATGGTACTCT 3' AS : 5' GCCCTTGAACACGAACATCT 3'	1 min 94°C 1 min 55°C 1 min 74°C	587 pb
MT3-MMP (28 cycles)	S : 5' GACCC CAGAATGTCAGTGCT 3' AS : 5' CTCCATCAAAGGGAGAGCTG 3'	1 min 94°C 1 min 55°C 1 min 74°C	437 pb
MT4-MMP (30 cycles)	S : 5' GGAGTGGAGTGGCTAAGCAG 3' AS : 5' CCTTGGAGAAGTCGATCTGG 3'	1 min 94°C 1 min 55°C 1 min 74°C	421 pb
MT5-MMP	S : 5' TTAAGGATCGCTGGTTCTGG 3'	1 min 94°C 1 min 55°C	471 pb

5) ETUDE DE LA FIXATION D'OPG RADIOMARQUÉE.

a) Technique du Scatchard

L'étude de la liaison ligand-récepteur repose sur une analyse de cette liaison à l'équilibre. Pour cela, une gamme de concentrations croissantes du ligand marqué est réalisée puis incubée avec des cellules porteuses potentielles du récepteur. Pendant les 90 minutes d'incubation à 4°C (conditions requises pour atteindre l'équilibre), le ligand se fixe de façon non covalente à son récepteur. La liaison totale est ainsi obtenue. La liaison non spécifique, qui peut être due soit à la fixation non spécifique du ligand marqué sur les cellules, soit à une mauvaise séparation du ligand libre du culot cellulaire, est obtenue dans les mêmes conditions mais en présence d'un excès de 100 fois de ligand froid. La liaison spécifique se calcule alors comme la différence entre la liaison totale et la liaison non spécifique.

Technique

- *Préparation des cellules*

Après avoir été lavées deux fois dans leur milieu de culture et numérées, les cellules 293 et 293RL sont centrifugées pendant 5 minutes à 550 g puis remises en suspension dans du PBS-BSA 0.5% à une concentration de 40×10^6 cellules par ml.

- *Marquage de l'OPG radiomarquée*

L'OPG-Fc a été radiomarquée à l'iode 125 en suivant la méthode décrite par Tejedor et Ballesta (1986). Une activité spécifique de 15,900 cpm/fmol de l'OPG-Fc radiomarquée a ainsi été obtenue.

- *Dilutions de l'OPG radiomarquée*

Dans une plaque 96 puits fonds ronds une première dilution est effectuée dans un volume final de 75 µl dans du PBS-BSA 0,5%. Des dilutions de 2/3 en 2/3 sont réalisées à partir de ce premier puits. Le volume de chaque puits est alors de 25 µl. Afin de déterminer la liaison non spécifique trois dilutions de concentrations différentes de cytokine radiomarquée sont réalisées et un excès de 100 fois de ligand froid est ajouté (conditions « non spécifiques »).

- *Réaction de liaison*

Les cellules 293 ou 293RL sont déposées dans les puits contenant l'OPG radiomarquée seule dans un volume de 25 µl (soit 10^6 cellules par puits). Le volume total de chaque puits est alors de 50 µl. La plaque est ensuite incubée 90 minutes à 4°C sous agitation douce.

- *Séparation du ligand lié et du ligand libre*

A la fin de l'incubation, le contenu de chaque puits est prélevé puis déposé, dans des microtubes Eppendorf, à la surface d'un mélange huileux composé de 10% d'huile de paraffine et de 90% de dibutylphtalate (SIGMA). La séparation s'effectue par centrifugation pendant 4 minutes à 10,000 g. Les tubes sont ensuite congelés rapidement dans de l'azote liquide puis coupés juste au dessus du culot cellulaire. Le surnageant, resté au dessus de la phase huileuse, contient la fraction de ligand marqué libre tandis que le culot contient les cellules ayant fixé la cytokine radiomarquée. La radioactivité des deux fractions est mesurée à l'aide d'un compteur gamma.

Analyse mathématique de la liaison

Les données obtenues à l'issue du comptage sont analysées à l'aide d'un programme de régression non linéaire et multi-paramétrique (Graphit, Erithacus Software Ltd., Staines, G.B.).
Etablissement de l'équation de Scatchard

Soit :

- Bmax : nombre maximum de récepteurs spécifiques présents sur la cellule
- F : radioactivité du ligand libre (Free)
- B : radioactivité du ligand lié (Bound)
- Kd : constante de dissociation du complexe ligand- récepteur. Elle correspond à la concentration en ligand pour laquelle la moitié des récepteurs est occupée.
- R : concentration en récepteur libre

Alors : $B_{max} = R + B$ et $Kd = (F * R) / B$

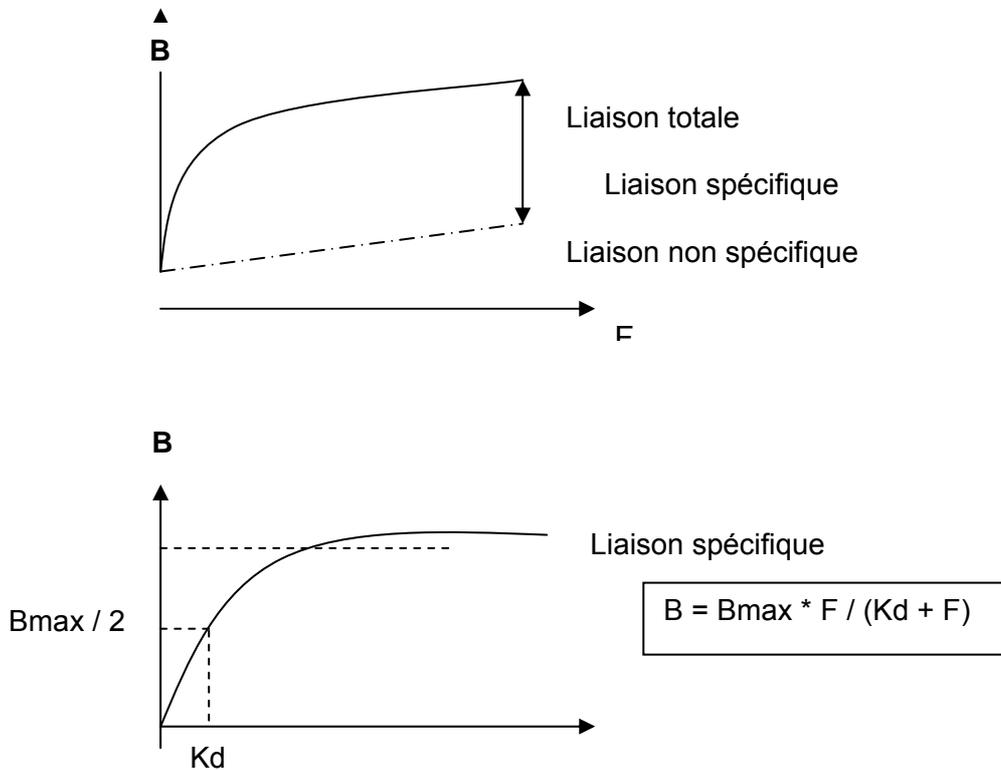
Par l'intégration de ces deux équations l'équation de Scatchard est déterminée ce qui permet d'obtenir la constante de dissociation (Kd) et le nombre maximum moyen de récepteurs par cellules (Bmax). L'équation suivante est obtenue :

$$B / F = (B_{max} - B) / Kd$$

La liaison spécifique de la cytokine radiomarquée sur ses récepteurs est analysée en traçant la courbe de saturation $B = f(F)$ et la représentation de Scatchard $B / F = f(B)$ (figure 16). La

courbe de Scatchard donne, après soustraction de la composante non spécifique, le K_d déterminé par la pente de la droite et le nombre de récepteurs par cellule correspondant à la valeur du point situé à l'intersection de la droite et de l'axe des abscisses.

A. Courbes de saturation



B. Représentation de Scatchard

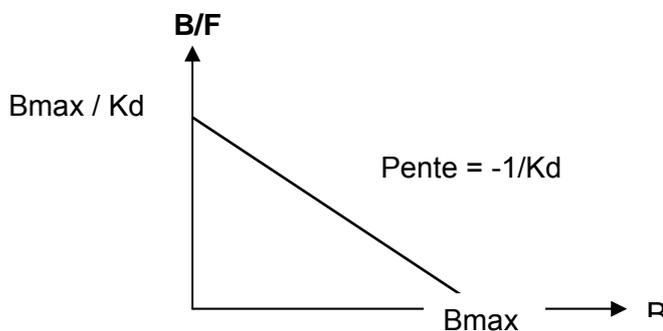


Figure 16 : Représentations théoriques des courbes de saturation (A) et représentation de Scatchard correspondante (B).

Calcul du nombre moyen de récepteurs par cellule

Connaissant les paramètres B et F en cpm il est possible de déduire le nombre moyen de récepteurs par cellule.

Soit :

- x : nombre de cpm spécifiques
- y : nombre de cellules par puits
- RAS : radioactivité spécifique du ligand marqué en cpm/femtomole
- N : nombre d'Avogadro ($6.023 \cdot 10^{23}$)
- n : nombre de récepteurs par cellule

Alors :

$$n = (x \cdot N) / (RAS \cdot y \cdot 10^{15})$$

b) Incubation des cellules 293RL en présence d'OPG radiomarquée

Des cellules 293RL sont déposées dans une plaque 24 puits à raison de 25×10^3 cellules/puits. De l'OPG radiomarquée à concentration de 20 ng/ml est ensuite rajoutée aux cellules 293RL en présence ou non d'un excès d'OPG non radiomarquée (1mg/ml) et la plaque est incubée à 37°C pour une durée maximum de 24 heures. Un prélèvement de 50µl est réalisé à différents temps. Pour chaque prélèvement, une précipitation des protéines à l'acide trichloroacétique (TCA) est réalisée suivi d'une centrifugation à 10000g pendant 10 minutes. Le culot ainsi formé est séparé du surnageant et la radioactivité du culot et du surnageant est mesurée respectivement à l'aide d'un compteur gamma.

6) CONSTRUCTION DES VECTEURS PSUPER SHTACE ET PSUPER SHMT3

Oligonucléotides pour la synthèse de short hairpin RNA (shRNA)

Dans le but de diminuer spécifiquement l'expression d'une protéine dans une cellule eucaryote, la dégradation ciblée de son ARN messenger peut être activée par la synthèse d'ARN tige-boucle (shRNA « short hairpin RNA », Dykxhoorn *et al*, 2003). Ces shRNA présentent une séquence de 19 nucléotides parfaitement complémentaire (ReverseN19) au messenger ciblé. Ils sont transcrits à partir d'une séquence ADN clonée en aval d'un promoteur reconnu par une ARN polymérase III.

La séquence ADN servant à la synthèse des shRNA est formée de deux oligonucléotides parfaitement complémentaires à l'exception des 4 nucléotides à leur extrémité 5'. Ainsi

l'appariement des oligonucléotides Sens et Antisens, dont la structure générale est présentée ci-dessous, laisse des séquences débordantes compatibles avec les sites de restrictions *HindIII* et *BglII*.

Sens 5' gatccccN19ttcaagagaReverseN19tttttgaaa 3'

Antisens 5' agcttttccaaaaaN19tctcttgaaReverseN19ggg 3'

Les N19 et ReverseN19 représentent les séquences de 19 nucléotides identiques et complémentaires, respectivement, de la séquence du gène ciblé. La séquence Sens correspond à la séquence transcrite en shRNA, où les séquences N19 et ReverseN19 formeront la tige complémentaire de l'ARN et la boucle correspondra à la séquence intercalante de ces séquences N19 et ReverseN19.

Les couples d'oligonucléotides suivants ont été commandés à Sigma Genosis:

ShTACE

ShTACE Sens

gatcccc**ACTGCAGCGTCAGAATCGT**ttcaagaga**ACGATTCTGACGCTGCAGT**tttttgaaa

ShTACE AntiSens

agcttttccaaaaa**ACTGCAGCGTCAGAATCGT**tctcttgaa**ACGATTCTGACGCTGCAGT**ggg

ShMT3-MMP

ShMT3-MMP Sens

gatCccc**GACGGTTGGATTCGTGCA**ttcaagaga**TGCACGAAATCCAACCGTC**tttttgaaa

ShMT3-MMP Sens

agcttttccaaaaa**GACGGTTGGATTCGTGCA**tctcttgaa**TGCACGAAATCCAACCGTC**ggg

Les séquences cibles, choisies à partir des cDNA TACE (gi : 11497005) et MT3-MMP (gi : 13027801) sont en positions 2541-2559 et 139-157 respectivement. Les critères qui nous ont guidés dans le choix de ces séquences cibles sont décrits par Reynolds *et al* (2004).

Le pSUPER (SUPpression of Endogenous RNA) a été obtenu auprès de R. Agami (Brummelkamp *et al*, 2002). Ce vecteur pSUPER permet de produire à partir du promoteur du gène H1, une structure d'ARN tige boucle court (Short hairpin = Sh). Cette structure ShRNA

est clivée par la machinerie cellulaire pour générer un SiRNA (Small interfering RNA) qui participera à la dégradation ciblée de l'ARNm dont il est parfaitement complémentaire pour 19 nucléotides. De plus, le pSUPER possède également un gène de résistance à l'ampicilline qui permet la sélection des bactéries l'ayant incorporé.

Clonage moléculaire

Les oligonucléotides portant les séquences des ShRNA contre TACE ou contre la MT3-MMP ont été sous-clonées dans le plasmide pSUPER (figure 17) entre les sites de restrictions *Hind III* et *Bgl II* situés directement après le promoteur H1.

Les oligonucléotides appariés sont clonés entre les sites de restrictions *Hind III* et *Bgl II* selon les mêmes techniques classiques de génie génétique utilisées pour le clonage de RANKL. Les produits de ligation [pSUPER-ShRNA (TACE ou MT3-MMP)] ont été introduits par choc thermique dans des bactéries compétentes SURE (STRATAGENE). L'ADN plasmidique est ensuite extrait des clones bactériens par la méthode classique de mini-préparation d'ADN et la nature de cet ADN est vérifiée par séquençage (Génome express, FRANCE). Le plasmide final est alors amplifié et purifié selon le protocole du kit de maxi-préparation de QIAGEN, donnant un produit suffisamment concentré et purifié pour transfecter des cellules eucaryotes à l'aide du poly éthylène imine (PEI).

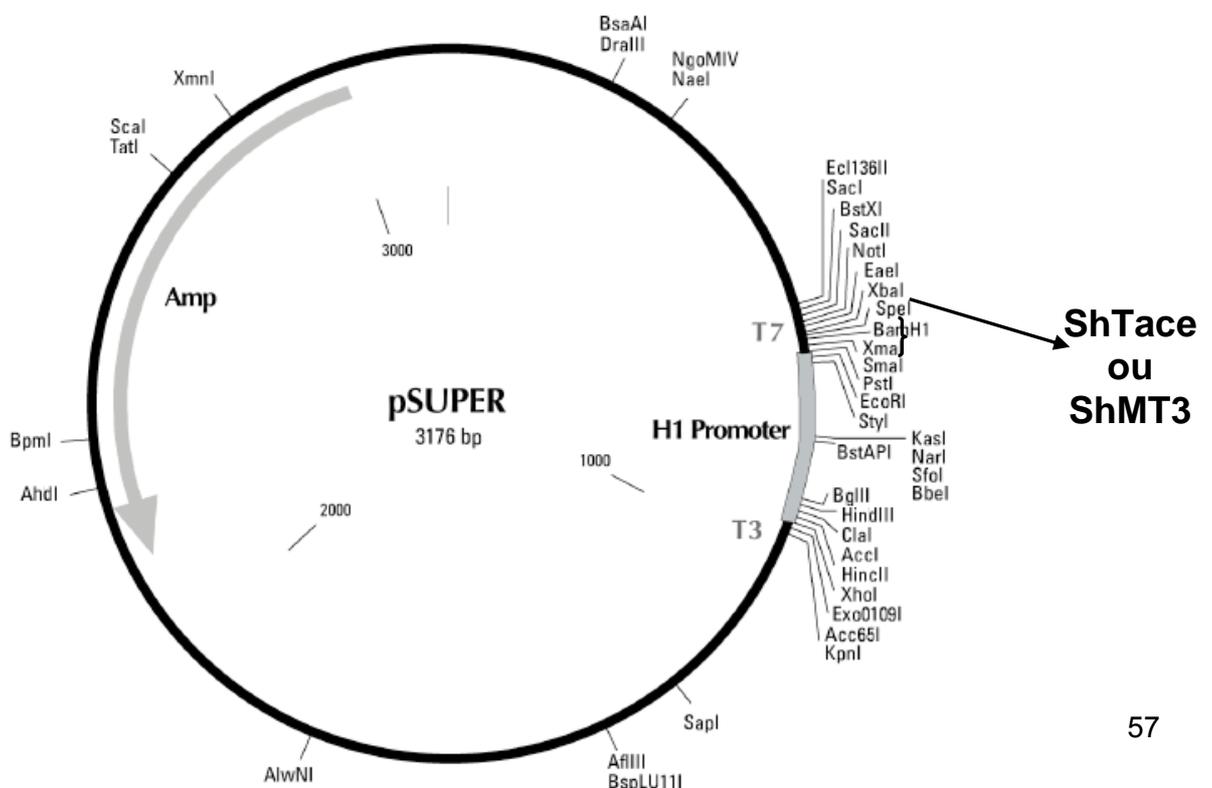


Figure 17 : Carte de plasmide pSUPER

Les oligonucléotides portant les séquences ShTACE ou ShMT3 ont été sous-clonés dans le plasmide pSUPER (Brummelkamp *et al.*, 2002) après le promoteur H1 entre les sites de restriction *Bgl II* et *Hind III*.

Construction des vecteurs pLenti-ShRNA TACE et pLenti-ShRNA MT3.

Le plasmide FG12 (Fig.18) de taille 10 Kb est un plasmide qui est utilisé pour générer des lentivirus. Il a été obtenu auprès de Xiao-Feng Qin (Xiao-Feng Qin *et al.*, 2002). Ce plasmide possède deux LTR (Long Terminal Repeat) 5' et 3' qui permettent l'intégration de l'ADN proviral dans celui de la cellule transfectée. Nous pouvons ainsi intégrer dans le génome des cellules transfectées, des oligonucléotides codant les shRNA qui auront été insérés entre ces LTR, afin qu'ils soient répliqués de la même manière que le génome cellulaire donc constitutivement. Ce plasmide contient également le gène codant la Green Fluorescente Protein (GFP) qui va permettre de visualiser par la suite les cellules qui produiront cette protéine fluorescente et donc qui auront intégré le plasmide. Nous retrouvons également le gène de résistance à l'ampicilline. Ce plasmide va permettre de produire des particules lentivirales et d'intégrer nos cassettes H1-shRNA dans le génome des cellules transfectées (Fig 19).

Les lignées cellulaires

1. La lignée 293 FT (Invitrogen)

Les cellules 293 FT sont des cellules adhérentes, épithéliales de rein humain exprimant de façon stable et constitutive l'antigène T du virus SV40. Cette lignée a la particularité de produire très efficacement des virus par rapport aux autres cellules. Nous l'utiliserons donc pour notre production de particules lentivirales afin d'obtenir une production efficace et de récolter un surnageant avec le maximum de particules lentivirales.

2. Préparation du plasmide pFG12-shRNA (TACE ou MT3-MMP)

Pour obtenir le plasmide pFG12 contenant le shRNA de TACE ou de la MT3-MMP, une digestion de 2 µg des plasmides pSUPER-Transgène et pFG12 est réalisée séparément par

les enzymes de restriction *XbaI* et *XhoI* (BioLabs) dans 50 μ L final. Ces enzymes vont libérer la cassette génomique H1-shRNA du plasmide pSUPER et ce fragment ainsi obtenu est inséré dans le vecteur FG12 (Xiao-Feng Qin *et al.*, 2003) aussi doublement digéré par les mêmes enzymes. Le clonage de ShRNA Tace ou ShRNA MT3 dans le vecteur FG12 est réalisé en utilisant les mêmes techniques classiques de génie génétique que précédemment. Les clones positifs pour notre séquence d'intérêt sont extraits et purifiés selon le protocole de minipréparation de plasmides pour être ensuite amplifiés et purifiés selon le protocole du kit de maxi-préparation de QIAGEN.

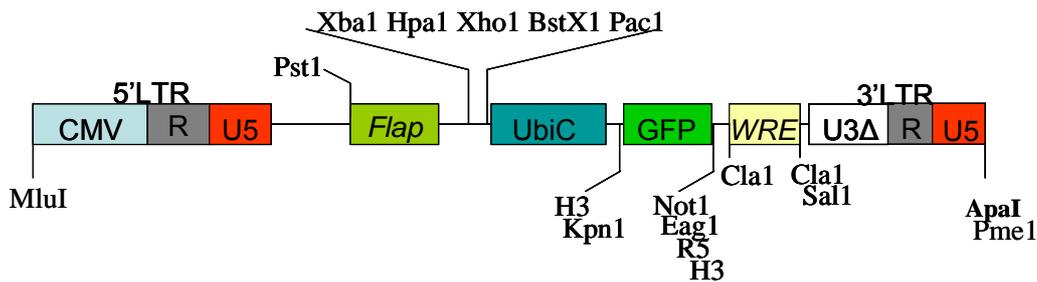


Figure 18 : Carte de restriction de l'ADN proviral du plasmide pFG12

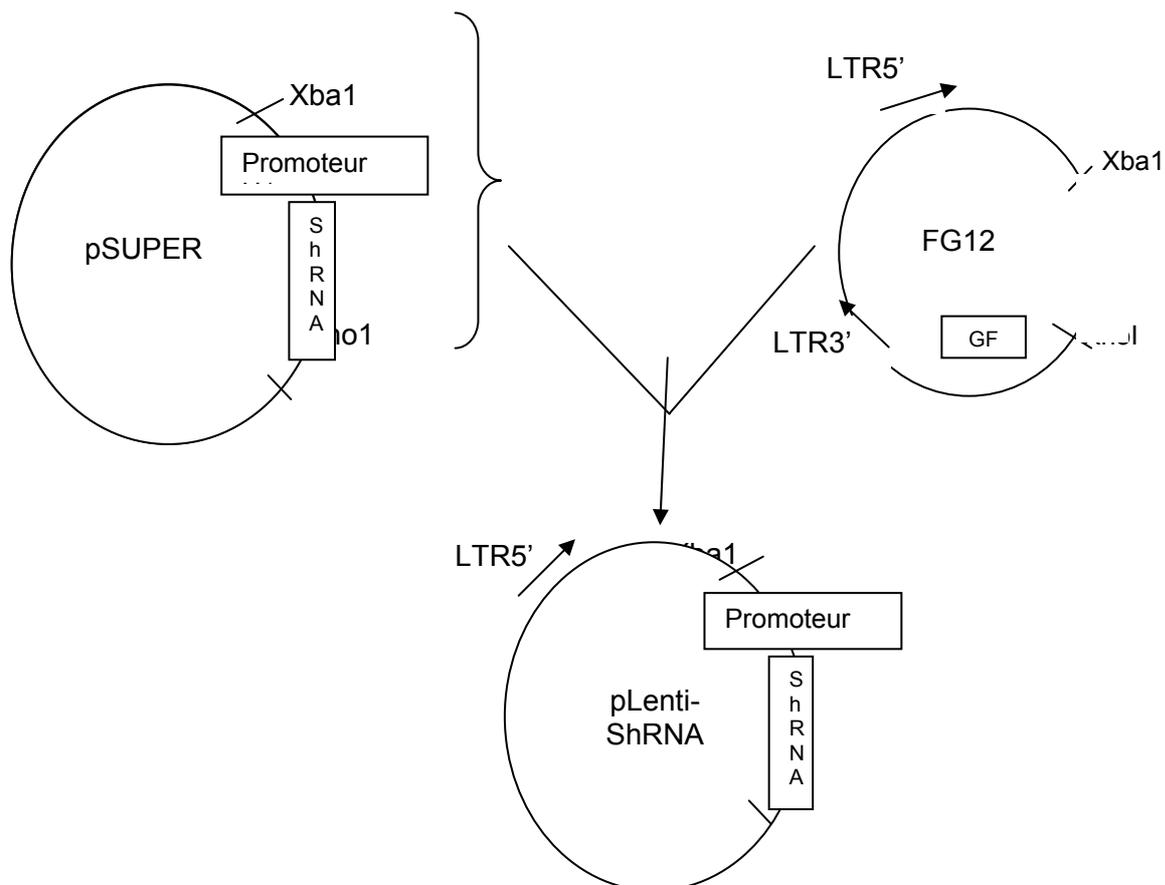
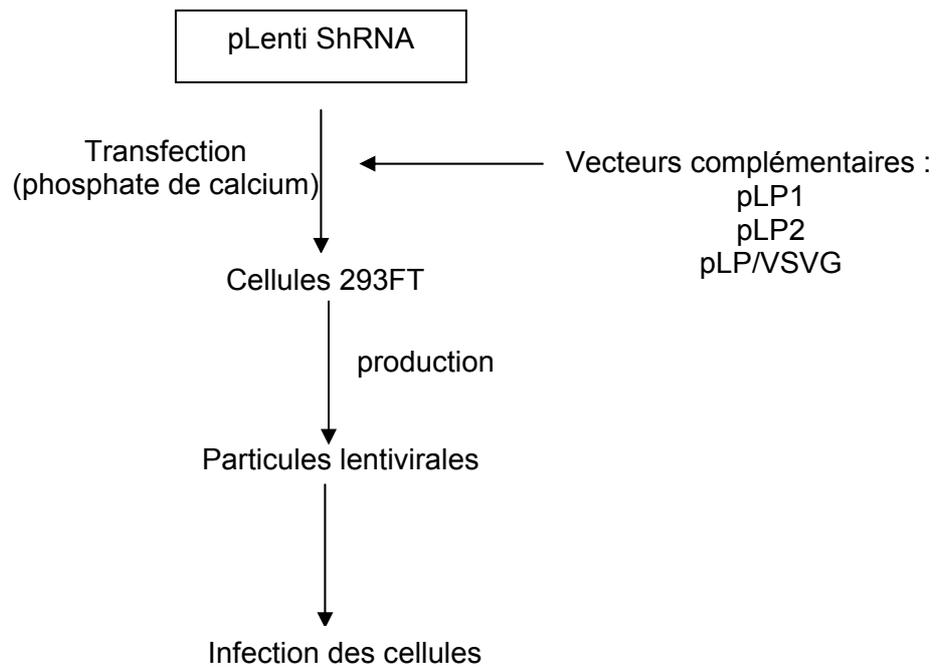




Figure 19 : Schéma représentant les différentes phases du sous clonages.

3. Production de particules lentivirales.



La production du lentivirus a été réalisée selon la méthode décrite par le kit “ViraPower Lentiviral Expression System” (Invitrogen). Les cellules 293 FT sont transfectées en utilisant du

phosphate de calcium. 3µg de maxipréparation de pFG12-duplex ShRNA et 9 µg de mix des vecteurs complémentaires pLP1, pLP2 et pLP-VSV-G sont dilués dans 450µl d'eau stérile. Cette dilution de plasmides est ensuite mélangée à 50µL de CaCl₂ (2,5M) suivi de 500µL de HBS2X (HEPES buffered saline : NaCl 280mM, Na₂HPO₄ 1,5mM, Hepes 50mM pH 7,05) et le tout est dispersé sur les cellules 293 FT. Après 6 heures d'incubation à 37°C, le milieu de culture est changé et remplacé par du milieu frais. Au bout de 48 heures après la transfection, le surnageant des cellules 293 FT dans lequel ont été relargués les virus est récupéré, filtré (0,45µm) et concentré par ultrafiltration.

4. Détermination du nombre de particules virales/µL (Pv/µL)

Un ensemencement de $5 \cdot 10^4$ cellules de 293FT/puits est réalisé dans une plaque 24 puits. Après 24 heures d'incubation à 37°C, 2,5µL ou 10µL de la solution virale obtenue précédemment sont introduits sur les cellules 293FT. Au bout de 3 jours, le comptage des cellules ayant reçu une particule virale est effectué. En effet, le vecteur FG12 porte le gène codant pour la protéine GFP et les cellules ayant été infectées expriment la protéine GFP visible par fluorescence. Une concentration de $1,2 \cdot 10^5$ Pv/µL a été ainsi estimée pour chaque solution virale (lentiShTACE et lentiShMT3).

5. Infection de cellules

Les cellules 293RL sont infectées par le ShRNA Tace ou ShRNA MT3. 2µL de la solution virale spécifique soit $2,4 \cdot 10^5$ particules virales (Pv) sont déposés sur 100,000 cellules en plaque 24 puits, pour une MOI ≥ 2 (Multiplicity of Infection : nombre de particules virales/cellule cible). Après 48 heures d'incubation, les cellules fluorescentes vertes sont dénombrées sur cellule de Malassez afin de déterminer le pourcentage de transduction. Une efficacité de 100% a ainsi été obtenue pour les cellules 293RL. Les ARNm sont ensuite extraits des cellules et une analyse par RT-PCR semi-quantitative de l'expression de Tace et de la MT3-MMP est réalisée. De plus, un western blot de TACE est effectué pour les cellules ayant été infectées par les particules virales exprimant le ShRNA contre TACE.

7) ANALYSES STATISTIQUES DES RÉSULTATS.

Toutes ces expériences ont été réalisées en triplicate. Les résultats sont exprimés en moyenne +/- écart type. Des études comparatives de moyennes ont été effectuées en utilisant le test t-student. Les résultats sont considérés comme significativement différents pour $p < 0,05$.

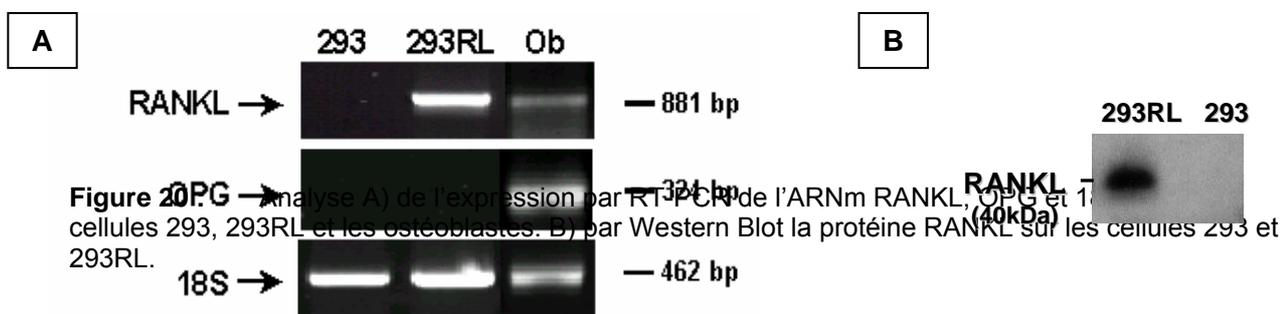
RESULTATS

INTERACTION OPG-RANKL

A. Expression de RANKL par les cellules 293RL

Expression de RANKL et d'OPG par les cellules 293, 293RL et des ostéoblastes de souris.

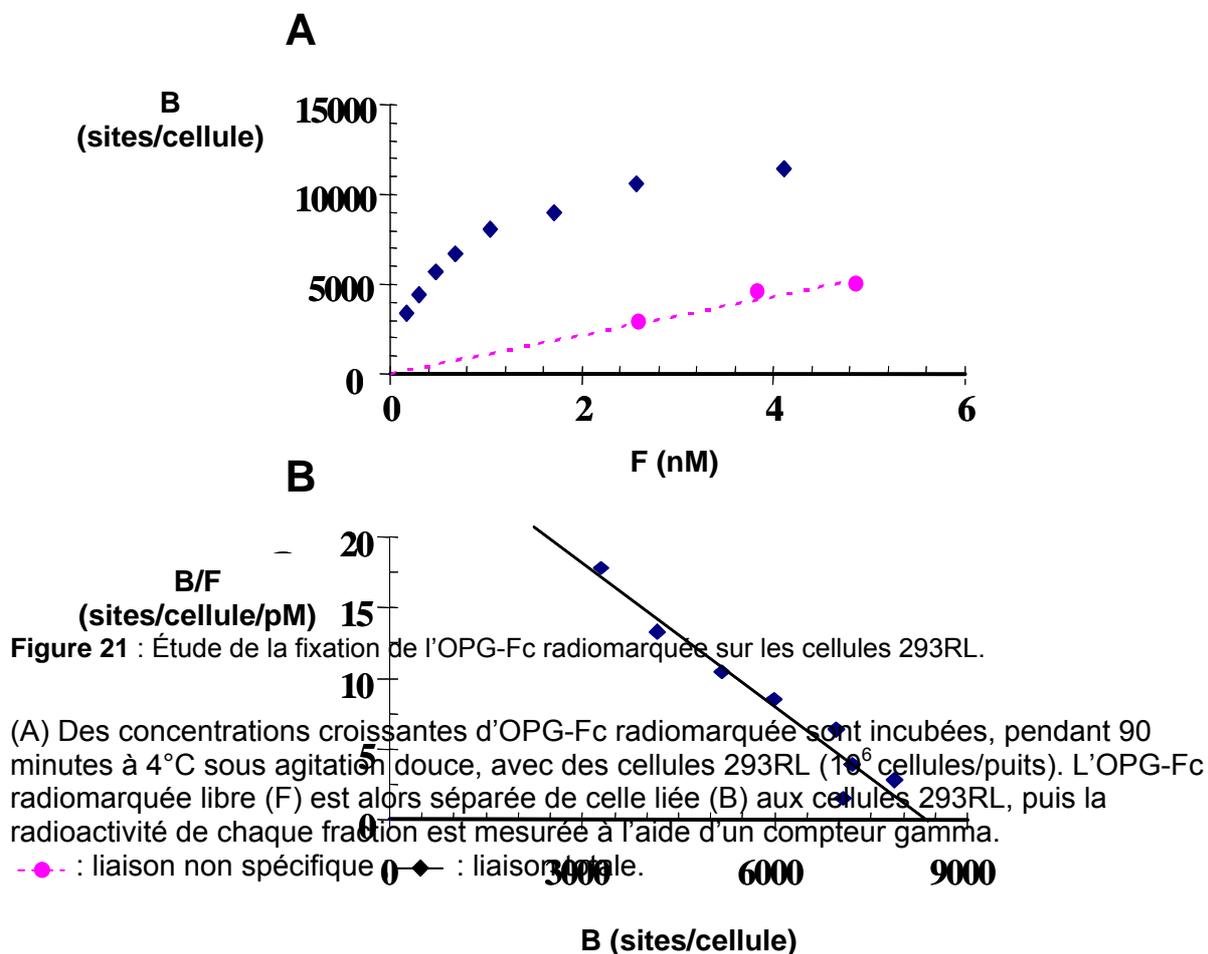
Des cellules humaines de rein fœtal (293) ont été transfectées stablement par le cDNA codant pour RANKL complet de souris (293RL). Le profil d'expression des transcrits RANKL et OPG étudié par RT-PCR semi-quantitative est comparé à un gène de référence, le 18S. Les conditions d'utilisation des amorces RANKL et OPG correspondent au début de la phase exponentielle d'amplification. Les résultats obtenus (Fig. 20A), confirment la transfection des cellules humaines de rein fœtal (293) par de l'ADNc de RANKL complète de souris (293RL). De plus, l'analyse par RT-PCR a confirmé une surexpression de l'ARNm RANKL par les cellules 293RL comparées aux cellules ostéoblastiques et aux cellules non transfectées. Aucune expression de l'ARNm d'OPG n'a été détectée sur les 293 et les 293RL. Les résultats obtenus par Western Blot permettent de vérifier la présence de l'expression de la protéine RANKL par les 293RL contrairement aux 293 (Fig. 20B).



B) Etude de l'interaction OPG/cellules 293RL

1) Expression de récepteurs à haute affinité pour l'OPG par les cellules 293RL

L'OPG sous sa forme complète est capable d'interagir avec des protéoglycanes via son domaine de liaison à l'héparine. Pour éviter toute interaction avec des protéoglycanes exprimés par la cellule 293RL, de l'OPG sans son domaine de liaison à l'héparine a été utilisée (OPG-Fc). Une analyse par la technique du Scatchard est effectuée en utilisant des concentrations croissantes d'OPG-Fc radiomarquée pendant 90 minutes à 4°C. Une fixation spécifique est mise en évidence avec $8,200 \pm 750$ sites de fixation d'OPG-Fc sur la cellule 293RL avec une constante de dissociation (K_d) de $0,27 \pm 0,05$ nM (Fig. 21). A l'inverse, aucune fixation spécifique d'OPG-Fc n'a été détectée sur les cellules non transfectées.



(B) Représentation de Scatchard correspondant à la fixation de l'OPG-Fc radiomarquée sur les cellules 293RL et permettant de déterminer que $K_D = 0,27 \pm 0,05$ nM et que $B_{max} = 8,200 \pm 750$ sites/cellules.

C) Biodisponibilité de l'OPG dans le milieu extracellulaire

1) Dosage d'OPG par la technique ELISA

Les cellules sont incubées à différents temps à 37°C en présence d'OPG à une concentration donnée soit sous sa forme complète (OPGc) soit sous sa forme tronquée (OPG-Fc). La concentration de l'OPG dans les surnageants cellulaires a ensuite été mesurée par la technique d'ELISA. Les cellules 293RL, transfectées par du cDNA de RANKL complet de souris, expriment au niveau membranaire la protéine RANKL. RANKL membranaire peut être clivée pour libérer du RANKL soluble dans le milieu de culture, et de ce fait le dosage d'OPG peut être perturbé par l'interaction OPG-RANKL soluble. Nous avons déterminé qu'après 24 heures d'incubation à 37°C, une concentration d'environ 3,5 ng/ml de RANKL soluble a été détectée dans le surnageant de culture cellulaire des 293RL. Par conséquent, une gamme d'OPG a été effectuée en présence ou en absence de 3,5 ng/ml de RANKL soluble. Les résultats montrent que la présence de 3,5 ng/ml de RANKL soluble n'a pas d'effet sur la reconnaissance d'OPG par le kit ELISA de R&D systems (Figure 22). En outre, l'OPG sous sa forme complète ou tronquée est reconnu de la même façon par le kit Elisa de R&D system (résultat non montré).

Figure 22 : Gamme étalon d'OPG-Fc en absence ou en présence de 3,5ng/ml de RANKL de souris.

2) Cinétique de disparition d'OPG-Fc dans les surnageants de culture cellulaire
 Pour éviter toute interaction à des protéoglycanes, l'OPG-Fc est utilisée. Afin de déterminer le devenir de l'OPG-Fc en présence des cellules 293 et 293RL, les deux types cellulaires sont incubés pendant 24 heures en présence de 100 ng/ml d'OPG-Fc. La concentration d'OPG-Fc mesurée dans le milieu extracellulaire à différents temps par ELISA n'est pas modifiée dans les cellules 293 alors qu'une disparition rapide de l'OPG-Fc est constatée dans les surnageants de culture des cellules 293RL. Cette disparition qui atteint 50% après 5 heures d'incubation n'est pas affectée en présence d'inhibiteurs de protéases extracellulaires (10 µM Pepstatin A, 10 µM Leupeptine, 10 µg/ml Aprotinin and 10 mM Phosphoramidon)

(Figure 23).

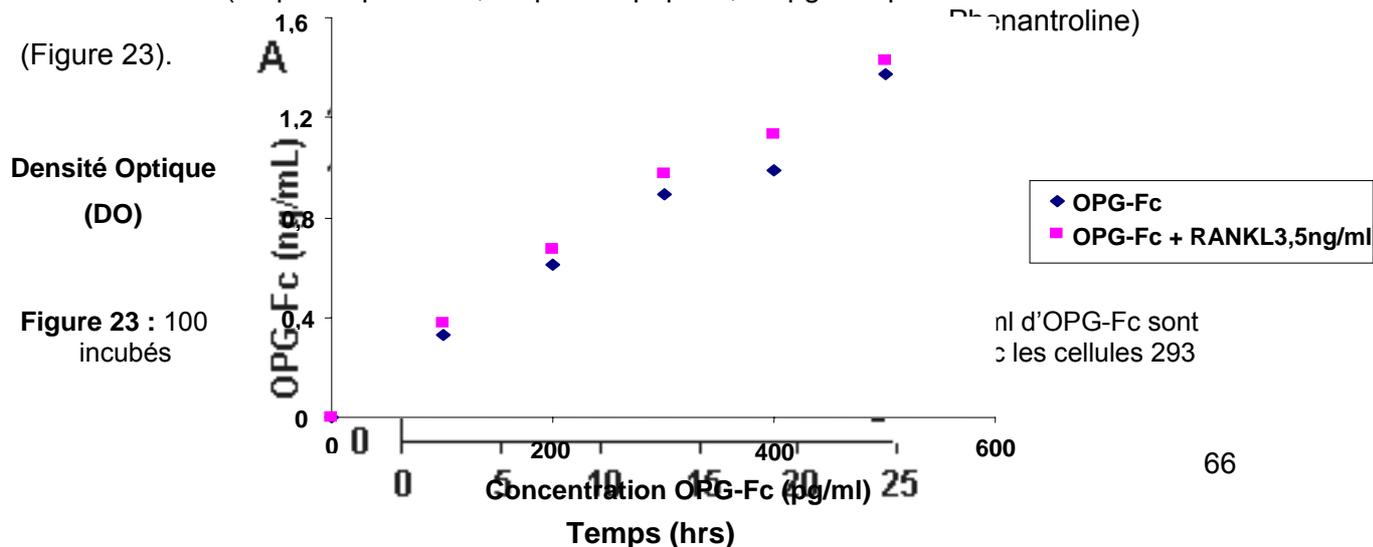


Figure 23 : 100 incubés

(■) ou avec les cellules 293RL en présence ou en absence de protéases extracellulaires (10 μ M Pepstatin A, 10 μ M Leupeptine, 10 μ g/ml Aprotinin et 10 mM Phenantroline) (\blacktriangle) à 37°C pendant 24 heures maximum. Pendant l'incubation, la concentration extracellulaire d'OPG-Fc restant dans les surnageants est mesurée à différents temps par la technique d'ELISA.

3) Influence d'un Anticorps anti-RANKL sur la disparition d'OPG-Fc.

L'hypothèse d'une internalisation d'OPG-Fc est proposée pour les cellules exprimant RANKL membranaire comparée aux cellules 293. Afin de valider l'implication de RANKL membranaire dans un tel phénomène, les cellules 293RL sont incubées en présence d'OPG-Fc 100 ng/ml et en présence ou non d'un anticorps anti RANKL de souris. La disparition d'OPG-Fc observée par les 293RL est inhibée en présence de 4 μ g/ml de l'anticorps anti-RANKL de souris, démontrant ainsi l'implication d'une association RANKL/OPG dans l'hypothèse d'une éventuelle internalisation d'OPG-Fc (Figure 24).

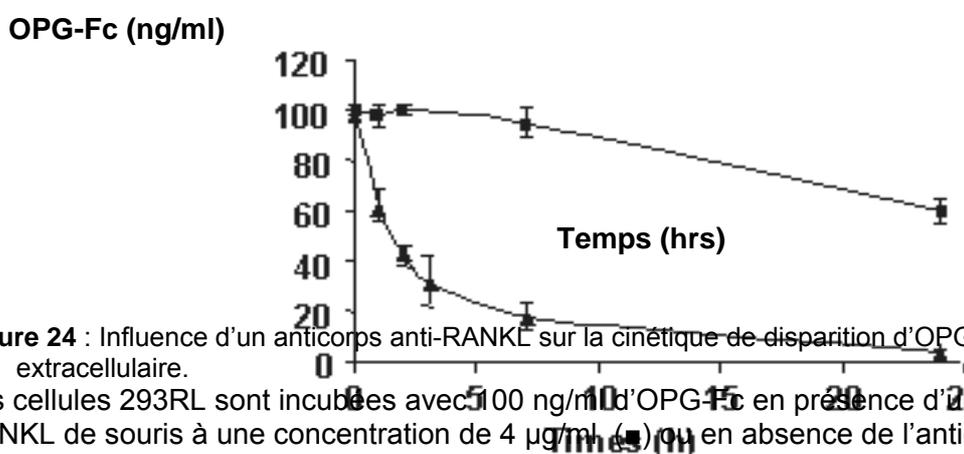


Figure 24 : Influence d'un anticorps anti-RANKL sur la cinétique de disparition d'OPG-Fc extracellulaire.

Les cellules 293RL sont incubées avec 100 ng/ml d'OPG-Fc en présence d'un anticorps anti-RANKL de souris à une concentration de 4 μ g/ml (■) ou en absence de l'anticorps (\blacktriangle) à 37°C pendant 24 heures. La concentration de l'OPG-Fc dans le milieu de culture est ensuite mesurée par la technique d'ELISA.

4) Expression de Syndecan-1

L'OPGc qui est une protéine possédant un site de liaison pour l'héparine, interagit avec celle-ci de même qu'avec des héparanes sulfates (Yamaguchi *et al*, 1998). De plus, des travaux récents ont pu montrer que l'OPGc est capable d'interagir avec un protéoglycane, le syndecan-1 surexprimé par les cellules de myelome (Standal *et al*, 2002). Nos cellules ont par conséquent été analysées pour leur expression en Syndecan-1. Les conditions d'utilisation de l'amorce Syndecan-1 correspondent au début de la phase exponentielle d'amplification. Une expression de l'ARNm du Syndecan-1 est observée sur les trois types cellulaires à savoir les 293, 293RL et les cellules ostéoblastiques (Fig. 25).

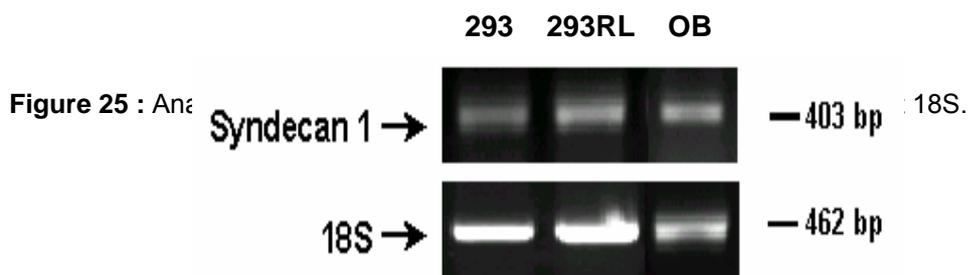
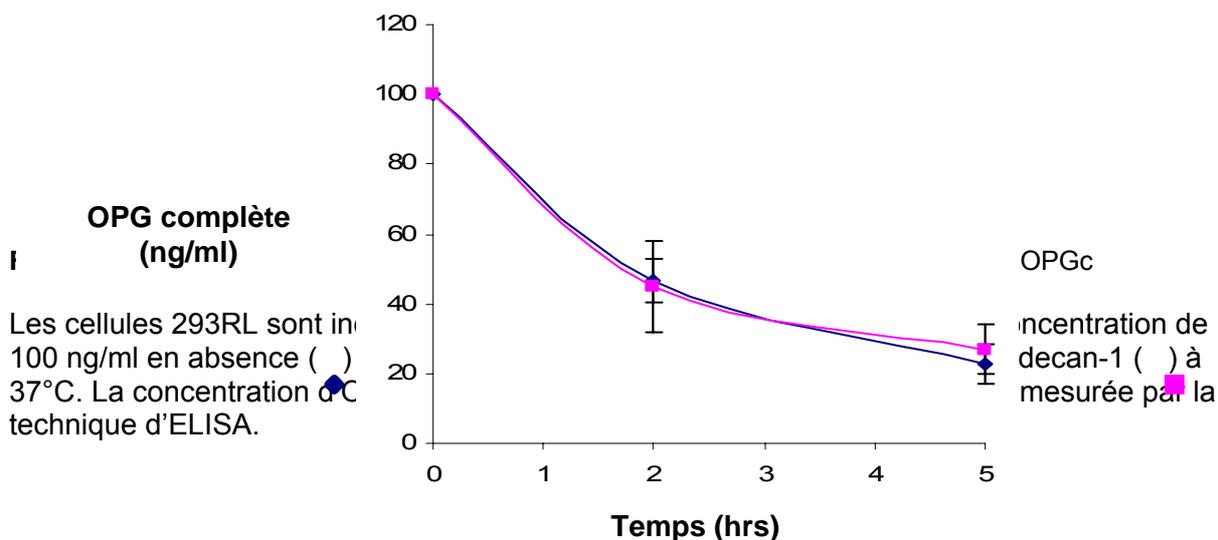


Figure 25 : An

5) Influence d'un anticorps anti-Syndecan-1 sur la disparition d'OPGc.

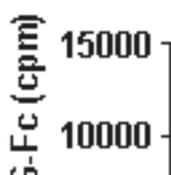
Lorsque les cellules 293RL sont incubées en présence d'OPGc ou d'OPG-Fc, la même cinétique de disparition est observée. Etant donné que le Syndecan-1 est capable d'internaliser l'OPG (Standal *et al.*, 2002), la disparition de l'OPGc a été étudiée en absence ou en présence d'un anticorps anti Syndecan-1. Les résultats de la Figure 26 nous indiquent que la disparition d'OPGc n'est pas affectée dans notre modèle par un anticorps anti Syndecan-1.



6) Mesure de la dégradation d'OPG-Fc par les cellules 293RL

Les cellules 293RL ont été incubées en présence de l'OPG-Fc radiomarquée (¹²⁵I-OPG-Fc). Les produits de dégradation de la protéine radiomarquée sont mesurés dans les surnageants des cellules 293RL après précipitation au TCA et centrifugation. Après 24 heures d'incubation à 37°C, plus de 90% d'OPG-Fc initial sont retrouvés dégradés dans le milieu de culture. De plus, en présence d'un excès d'OPG-Fc non radiomarquée, la disparition d'OPG-Fc radiomarquée dans les surnageants cellulaires n'est pas significative. Ces résultats et ceux obtenus en présence d'inhibiteurs de protéases extracellulaires suggèrent que l'OPG-Fc radiomarquée est internalisée, dégradée puis relarguée par les cellules 293RL. De plus, cette disparition d'OPG-Fc à 37°C est inhibée lorsque les cellules sont incubées à 4°C ce qui renforce l'hypothèse d'une éventuelle internalisation d'OPG (Figure 27b) médiée à 37°C.

Figure 27a : Des cellules 293RL dans des plaques 24 puits sont incubées en présence d'OPG-Fc radiomarquée () et d'un excès (100 fois) d'OPG-Fc non radiomarquée ().



d'OPG-Fc non radiomarquée (■), à 4°C pendant une heure puis incubée à 37°C pendant 24 heures maximum. La radioactivité d'OPG-Fc dégradée est mesurée dans le surnageant cellulaire après précipitation au TCA et centrifugation.

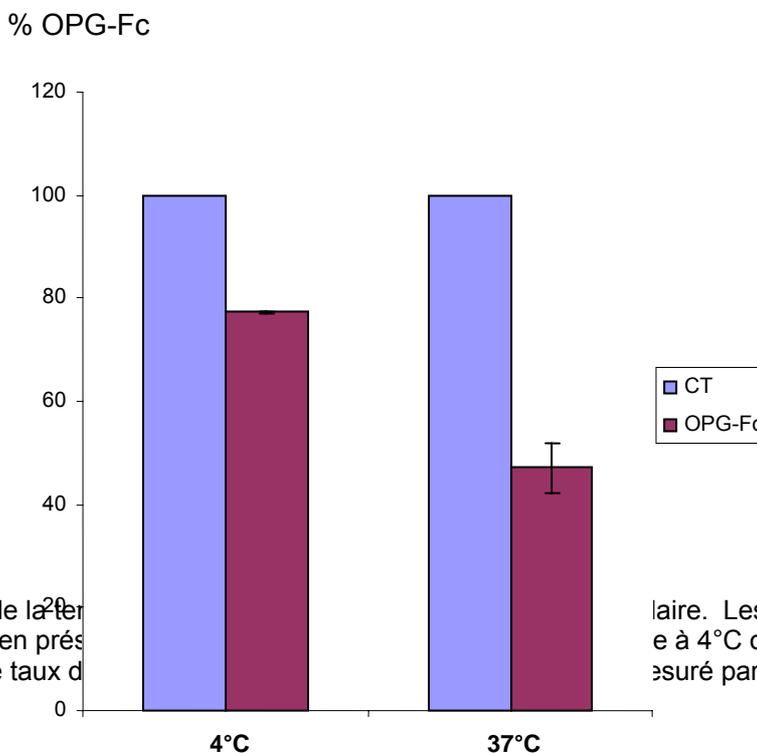


Figure 27b : Effet de la température sur la dégradation d'OPG-Fc. Les cellules 293RL sont incubées en présence ou en absence d'OPG-Fc pendant une heure, le taux de

OPG-Fc dans le surnageant est mesuré par ELISA. Les cellules 293RL sont incubées à 4°C ou 37°C. Au bout de 24 heures, le surnageant est précipité et mesuré par ELISA.

D) Détection d'OPG-Fc à l'intérieur des cellules 293RL

1) Détection par Western Blot de l'OPG-Fc internalisée par les cellules 293RL

Les cellules 293RL sont incubées pendant une heure à 37°C en présence ou en absence de 100 ng/ml d'OPG-Fc. Le surnageant cellulaire est enlevé et remplacé par un milieu constitué de PBS/1%BSA à pH 2 pendant 5 minutes. Ce traitement acide des cellules élimine ainsi toute fixation d'OPG-Fc à RANKL membranaire. Les cellules sont ensuite rincées avec du PBS pour être lysées et analysées par western blot. Sur la Figure 28, on peut constater la présence d'OPG-Fc dans les lysats cellulaires des 293RL. La présence d'OPG-Fc intracellulaire valide ainsi notre hypothèse de départ, à savoir une internalisation d'OPG-Fc par les 293RL.

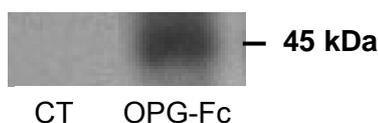


Figure 28 : Western blot d'OPG-Fc après traitement des cellules 293RL avec de l'OPG-Fc à 100 ng/ml.

2) Détection par microscopie confocale de l'OPG-Fc internalisée par les cellules 293RL.

La fixation de l'OPG à RANKL exprimé à la surface des cellules 293RL a également été étudiée par microscopie confocale. Pour cela, des cellules 293RL sont incubées en présence d'OPG-Fc avant d'être déposées sur une lame de verre. Une incubation avec un anticorps anti-OPG-Fc biotinylé est alors effectuée suivie d'une incubation avec une solution de streptavidine-FITC. L'analyse des images obtenues nous indique que l'OPG-Fc fixée à la membrane de la cellule 293RL est internalisée puis dégradée de manière dépendante du temps (Fig 29).

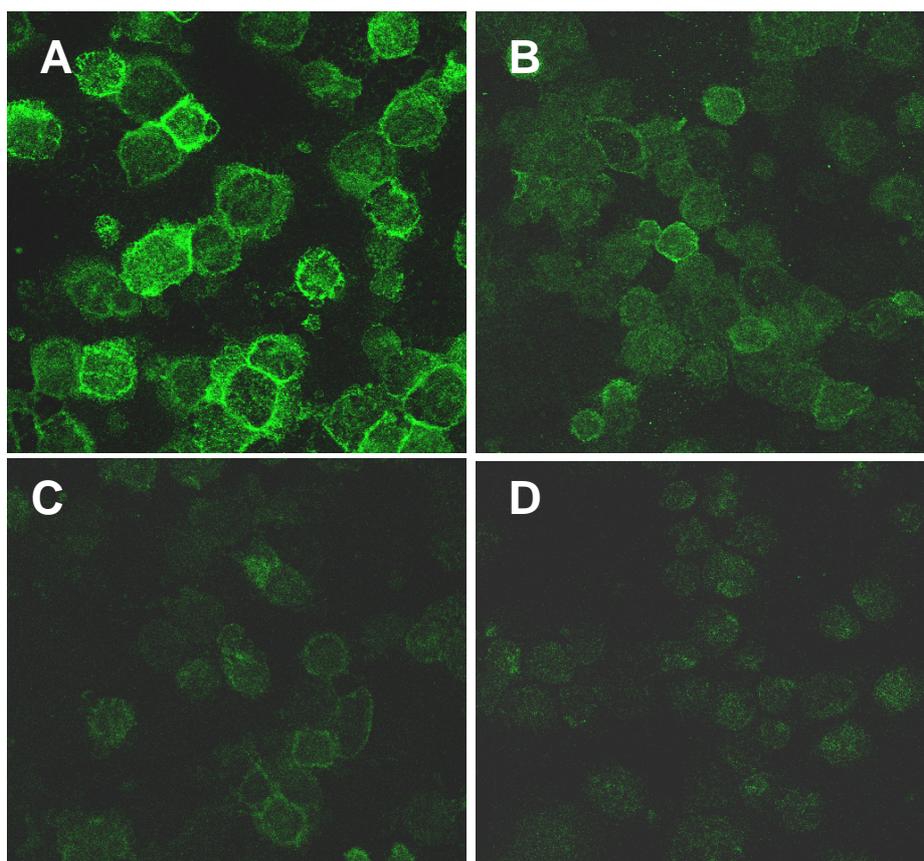


Figure 29 : Cinétique de dégradation intracellulaire d'OPGFc par les cellules 293RL. Les images (agrandissement x 40) correspondant aux coupes de cellules de 0,3µm nous démontrent une distribution intracellulaire d'OPG-Fc. Les cellules 293RL sont incubées en présence de 100 ng/ml d'OPG-Fc pendant une heure à 4°C (A). Le milieu est ensuite remplacé par une solution de DMEM/1%BSA sans OPG-Fc et incubé à 37°C pendant 30 minutes (B), 1 heure (C) et 3 heures (D).

E) Étude de l'internalisation d'OPG par les cellules 293RL

1) Internalisation via la voie des clathrines du complexe OPG-RANKL

Afin de déterminer le mécanisme d'endocytose au cours du processus d'internalisation d'OPG-Fc, des inhibiteurs de deux voies différentes ont été testés : la chlorpromazine (inhibiteur de l'endocytose via la voie des clathrines) et la filipine (inhibiteur de l'endocytose via la voie des lipides-rafts). La filipine est connue pour sa capacité à moduler la distribution du cholestérol au niveau de la membrane plasmique et de son aptitude à bloquer les transports transcellulaire via la perte des structures cavéolaires. A l'inverse, la chlorpromazine, qui est un inhibiteur connu de l'endocytose via les molécules de clathrines, est couramment utilisée pour le blocage de l'endocytose de diverses molécules fixées à leur récepteur membranaire.

Les expériences d'internalisations analysées par microscopie confocal sont effectuées en présence de 3 µg/ml de filipine (Fig. 30B) ou en présence de 1 µg/ml de chlorpromazine (Fig.30C). Aucune inhibition de l'internalisation de l'OPG-Fc n'est constatée en présence de Filipine comparé aux cellules contrôle. A l'inverse en présence de chlorpromazine, l'internalisation d'OPG-Fc par les cellules 293RL est inhibée (Figure 30C). Les résultats ainsi obtenus démontrent que l'OPG-Fc est internalisée par les cellules 293RL via la voie des clathrines.

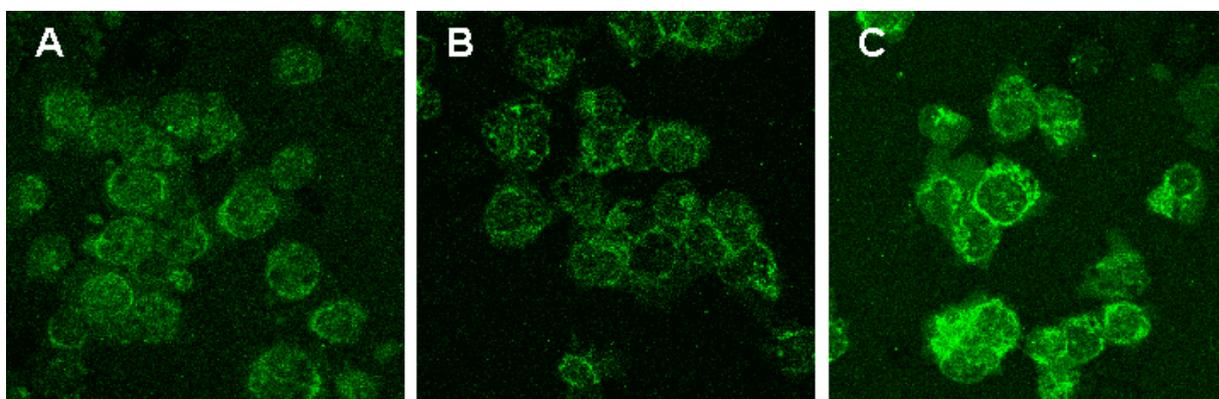


Figure 30 : Implication de la voie des clathrines dans l'internalisation d'OPG-Fc.

Les images (agrandissement x 40) correspondant à des coupes de cellules de 0,3µm nous montrent une distribution intracellulaire ou péricellulaire d'OPG-Fc. Les cellules 293RL sont pré-incubées en absence (A) ou en présence de 3 µg/ml de Filipine (B) ou 1 µg/ml de Chlorpromazine (C) pendant une heure à 37°C. Le milieu est remplacé par les inhibiteurs spécifiques en présence de 100 ng/ml d'OPG-Fc et incubé à 4°C pendant une heure avant d'être incubé à 37°C pendant une heure.

2) Dégradation du complexe OPG-RANKL via la voie des lysosomes et des protéasomes.

Afin de caractériser le mécanisme de dégradation intracellulaire d'OPG-Fc, des inhibiteurs de protéasomes ainsi que des lysosomes ont été utilisés. Les cellules 293RL sont traitées soit par 10 µM de lactacystin (inhibiteur des protéasomes) ou 0,1 mM de chloroquine (inhibiteur des lysosomes) (Figure 31). La dégradation intracellulaire a ensuite été analysée par microscopie confocale. La Figure 31B-E nous indique que la distribution d'OPG-Fc intracellulaire est plus abondante en présence d'inhibiteurs des protéasomes et/ou de lysosomes comparé aux cellules contrôle sans traitement aux inhibiteurs. De plus, cette localisation intracellulaire d'OPG-Fc est retrouvée dans le cytoplasme et au niveau péri nucléaire de la cellule (fig.31 E).

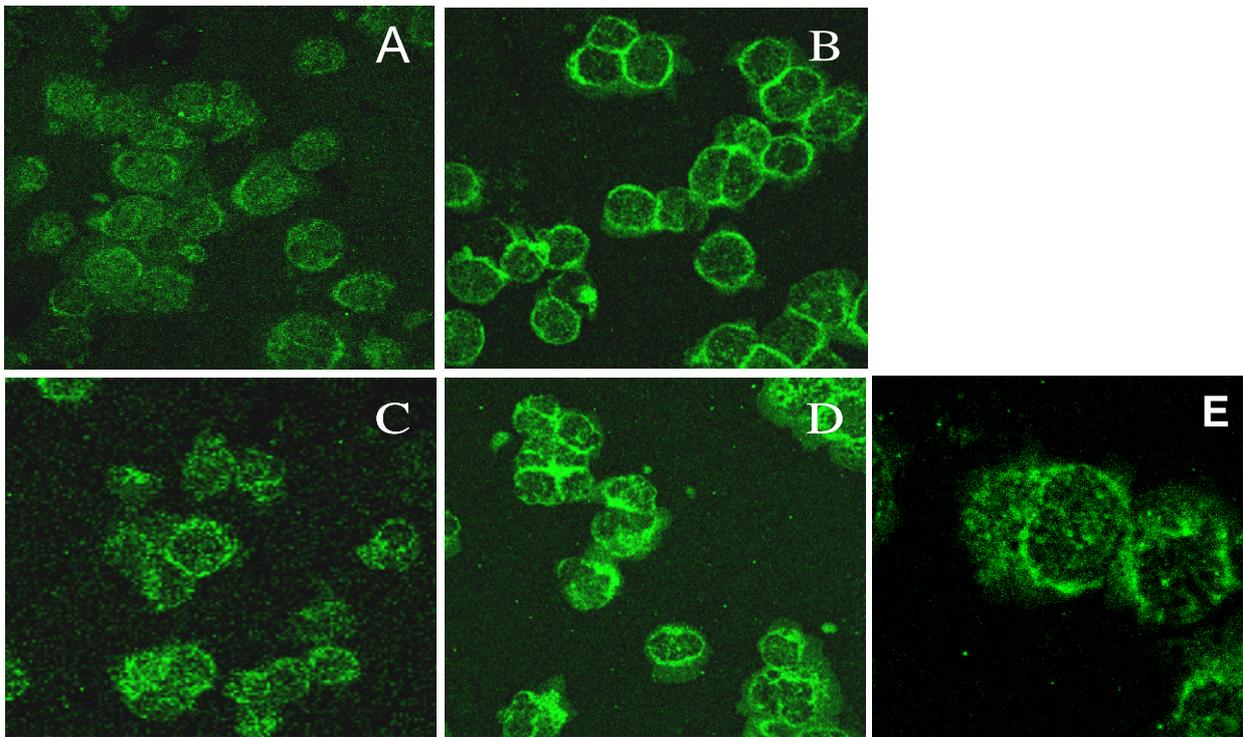


Figure 31 : Dégradation de l'OPG-Fc *via* la voie des lysosomes et des protéasomes. Les cellules 293RL sont pré-incubées sans (A) ou avec 10 μ M de Lactacystin (B), 0.1 mM de Chloroquin (C) et Lactacystin+Chloroquin (D : agrandissement x 40 et E : agrandissement x 160) pendant une heure à 37°C. Le milieu est ensuite remplacé par une solution contenant les inhibiteurs spécifiques toujours en présence d'OPG-Fc 100 ng/ml et incubé à 4°C pendant une heure. Les cellules sont lavées et remplacées par un milieu contenant les inhibiteurs spécifiques uniquement et incubées pendant 4 heures à 37°C.

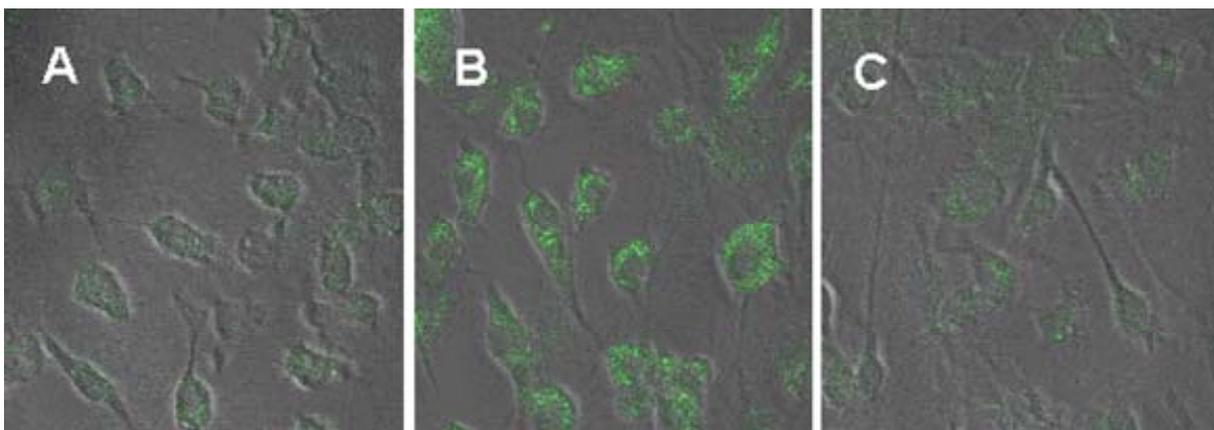
F) Étude de l'internalisation par des cellules ostéoblastiques exprimant physiologiquement RANKL.

1) Internalisation du complexe OPG-RANKL par les cellules ostéoblastiques

Afin de valider notre modèle mécanistique, l'internalisation d'OPG-Fc a été étudiée sur les ostéoblastes qui expriment RANKL physiologiquement. Les cellules obtenues à partir de tissu osseux de tibia de souris, ont été caractérisées par leur expression des marqueurs ostéoblastiques. La présence d'OPG endogène des ostéoblastes a été démontrée par microscopie confocale (Figure 32A) confirmant l'expression de l'ARNm de l'OPG par RT-PCR semi quantitative (Figure 19A). De la même façon que les cellules 293RL, l'OPG-Fc est internalisée par les ostéoblastes lorsque les cellules sont incubées en présence d'OPG-Fc exogène (Figure 32B). Cette internalisation est inhibée lorsque l'expérience est reproduite en présence d'un anticorps anti-RANKL de souris (4 µg/ml), démontrant l'importance de RANKL dans ce phénomène (Figure 32C).

Figure 32 : Internalisation d'OPG-Fc par des cellules ostéoblastiques exprimant RANKL physiologiquement.

Les différentes images sont obtenues par superposition des images des cellules ostéoblastiques sous lumière blanche et sous immunofluorescence. Les ostéoblastes sont



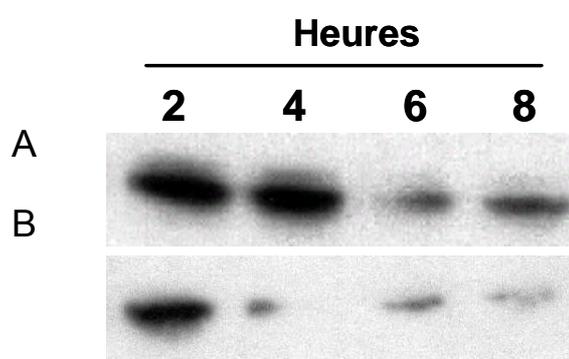
incubés en présence ou absence de 100 ng/ml d'OPG-Fc pendant 2 heures. **A)** Marquage d'OPG endogène des ostéoblastes de souris sans prétraitement à l'OPG-Fc. **B)** Ostéoblastes de souris incubées avec 100 ng/ml d'OPG-Fc. **C)** Une pré-incubation d'une heure est réalisée en présence d'un anticorps anti-RANKL de souris (4 µg/ml) avant de rajouter de l'OPG-Fc 100 ng/ml.

G) Étude de la demi-vie de RANKL.

1) Influence de l'OPG-Fc sur la demi-vie de RANKL

L'OPG-Fc après s'être fixée aux cellules 293RL est internalisée puis dégradée par les cellules 293RL, mais est-ce que la fixation de l'OPG-Fc agit aussi sur la dégradation de RANKL ? Afin de répondre à cette question, le devenir de RANKL a été étudié par Western Blot. Les cellules 293RL ont été incubées, à 37°C pendant 2, 4, 6 ou 8 heures, en présence d'un inhibiteur de synthèse protéique, le cycloheximide, à 4 µg/ml avec ou sans OPG-Fc (100 ng/ml). Les cellules sont ensuite lysées, puis la présence de RANKL est déterminée par western blot. Lorsque les cellules sont incubées en présence de cycloheximide, l'expression de RANKL commence à diminuer après 6 heures d'incubation à 37°C (figure 33A). Au contraire, quand cette incubation est réalisée en présence d'OPG-Fc une diminution de RANKL est mise en évidence dès 4 heures et s'accroît à 6 heures d'incubation. Ces résultats indiquent donc que l'OPG-Fc influence la demi-vie de RANKL membranaire en stimulant son internalisation et sa dégradation. Le même résultat a été observé sur les cellules 293RL2.0 (RANKL avec un domaine intracytoplasmique incomplet) à savoir une baisse de la demi-vie de RANKL2.0 en présence d'OPG-Fc exogène (résultat non montré).

L'analyse par Western Blot démontrant la capacité de l'OPG-Fc à moduler la demi-vie de RANKL, en la dégradant, est inhibée par la présence de 1 µg/ml de chlorpromazine (Figure 33C). A l'inverse, la baisse de la demi-vie de RANKL engendré par l'OPG-Fc n'est pas affectée en présence de filipine.



C

Figure 33 : Les cellules 293RL sont incubées à 37°C pendant 2, 4, 6 and 8 heures en présence de cycloheximide (4µg/ml) en absence d'OPG-Fc (100 ng/ml) (A) ou en présence d'OPG-Fc (100ng/ml) (B). C) Les cellules 293RL sont incubées à 37°C pendant 4 heures (I) en présence de cycloheximide (4µg/ml), (II) en présence de cycloheximide (4 µg/ml) + OPG-Fc (100 ng/ml), (III) en présence de cycloheximide (4µg/ml) + OPG-Fc (100ng/ml) + Filipine (3 µg/ml) et (IV) en présence de cycloheximide (4µg/ml) + d'OPG-Fc (100ng/ml) + Chlorpromazine (1 µg/ml). L'expression de RANKL est ensuite analysée par Western Blot.

2) Influence de l'héparine et des GAG sur la demi-vie de RANKL

L'OPGc via son domaine de liaison à l'héparine est capable d'interagir avec des protéoglycanes de la matrice extracellulaire. Le complexe ainsi formé entre l'OPGc et les protéoglycanes est-t-il toujours capable d'interagir avec RANKL membranaire ? Dans ce contexte, les interactions moléculaires entre l'OPGc et l'héparine ainsi qu'entre l'OPGc et différents GAG ont été étudiées dans la modulation de la demi-vie de RANKL totale de souris.

L'OPGc à 100 ng/ml (0,91 nM) est préalablement pré-incubée, pendant 30 minutes à température ambiante avec 91 nM d'héparine ou de tétrasaccharide ou de décasaccharide ou d'héparane sulfate ou de dermatane sulfate ou de chondroïtine sulfate. Ce mix est ensuite déposé sur les cellules 293RL pendant 2, 3, 4 et 6 heures avant d'extraire le contenu protéique pour une analyse par Western Blot de RANKL. Les résultats présentés dans la figure 34 montrent que seul le tétrasaccharide est sans effet sur l'internalisation de RANKL induite par l'OPGc alors que toutes les autres molécules testées inhibent cette activité de l'OPG.

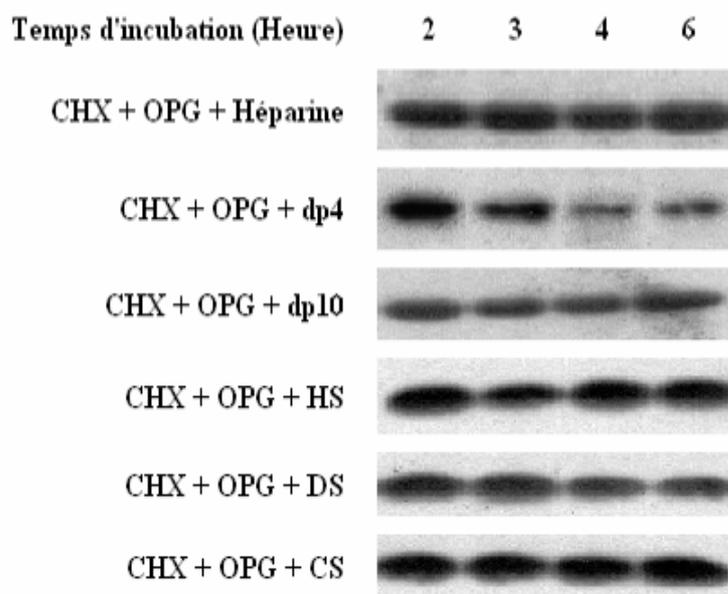


Figure 34 :

incubée

à température ambiante avec 91 nM d'héparine, de tétrasaccharide (dp4), de décasaccharide (dp10), d'héparane sulfate (HS), de dermatane sulfate (DS) ou de chondroïtine sulfate (CS), avant d'être ajoutée sur les cellules 293RL. Les cellules sont lysées puis l'expression de RANKL est analysée par western blot.

L'OPGc est pré-
pendant 30 minutes

ISOFORMES DE RANKL MEMBRANAIRE

A TRANSFECTION STABLE DES ISOFORMES DE RANKL DE SOURIS

1) Cellules humaines de rein foetal (293) transfectées stablement par les différentes isoformes de RANKL de souris.

Les cellules humaines de rein foetal (293) n'exprimant ni RANKL ni OPG ont été transfectées par le cDNA codant pour les différentes isoformes de RANKL de souris : RANKL complet (293RL), RANKL avec le domaine intracytoplasmique plus court (293RL2.0) et RANKL sans domaine intracytoplasmique (293RL2.1) (Fig. 35A). Le profil d'expression du mRNA RANKL est étudié par RT-PCR semi-quantitative et est comparé à un gène de référence, le 18S. Les résultats obtenus (Fig. 35B), confirment la transfection des cellules humaines de rein foetal (293) par de l'ADNc codant pour les différentes isoformes de RANKL de souris. Une extraction protéique sur les 4 types cellulaires a aussi été effectuée une fois les cellules à confluence dans une plaque 6 puits, afin de vérifier par Western Blot, la présence de l'expression de la protéine RANKL (Fig. 35C). RANKL, détectée sur les cellules 293RL et 293RL2.0 est significativement plus abondante lorsque les cellules sont transfectées par l'ADNc codant pour RANKL total. En ce qui concerne les cellules 293RL2.1, si aucune détection de RANKL n'a été observée par Western blot elle a néanmoins pu être dosée par ELISA dans les lysats cellulaires. Une concentration significative de (121 ± 16), (39 ± 12) et (4 ± 0,3) ng/ml a été respectivement obtenue pour les cellules 293RL, 293RL2.0 et 293RL2.1.

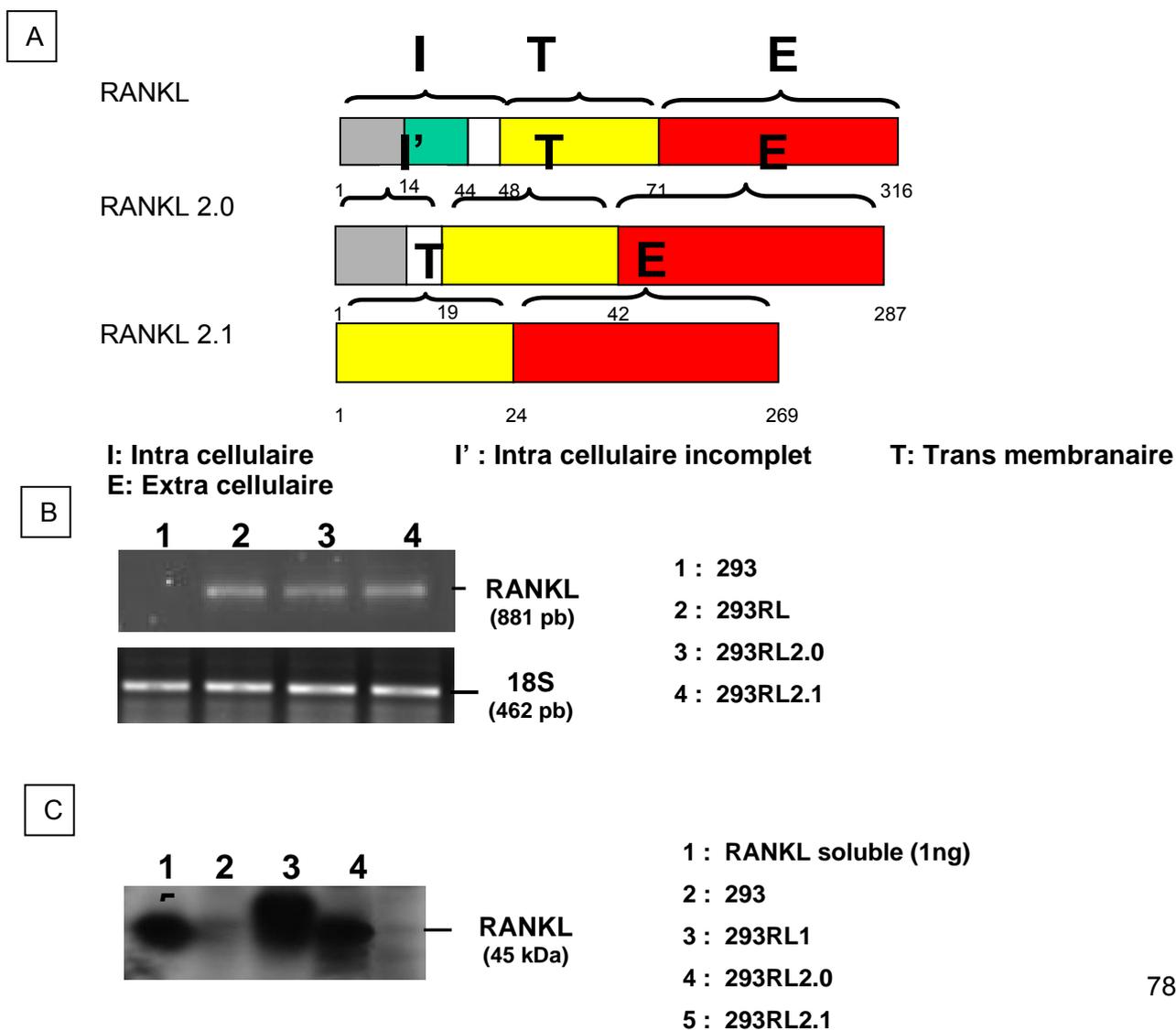


Figure 35 : Analyse par RT-PCR de l'expression de l'ARNm RANKL et 18S sur les cellules 293, 293RL, 293RL2.0 et 293RL2.1. B) La présence de la protéine RANKL par les 4 types cellulaires a été effectuée par Western Blot

2) Localisation cellulaire de la protéine RANKL par les 293, 293RL, 293RL2.0 et 293RL2.1

L'expression des isoformes de RANKL par les cellules transfectées a été étudiée par microscopie confocale. Les 4 types cellulaires (293, 293RL, 293RL2.0 et 293RL2.1) une fois à confluence sont déposés sur une lame de verre et fixés par de l'acétone. Un traitement au Triton permet de perméabiliser la membrane avant d'introduire de l'OPG-Fc-FITC à une concentration de 7 µg/ml pendant une heure. La présence de RANKL est indirectement localisée par la fixation de l'OPG-Fc-FITC sur la protéine RANKL. L'expression de RANKL est détectée sur les 3 types cellulaires transfectés par les différentes isoformes de RANKL confirmant la présence intracellulaire de la protéine RANKL. Aucune expression de RANKL intracellulaire n'est observée sur les cellules 293.

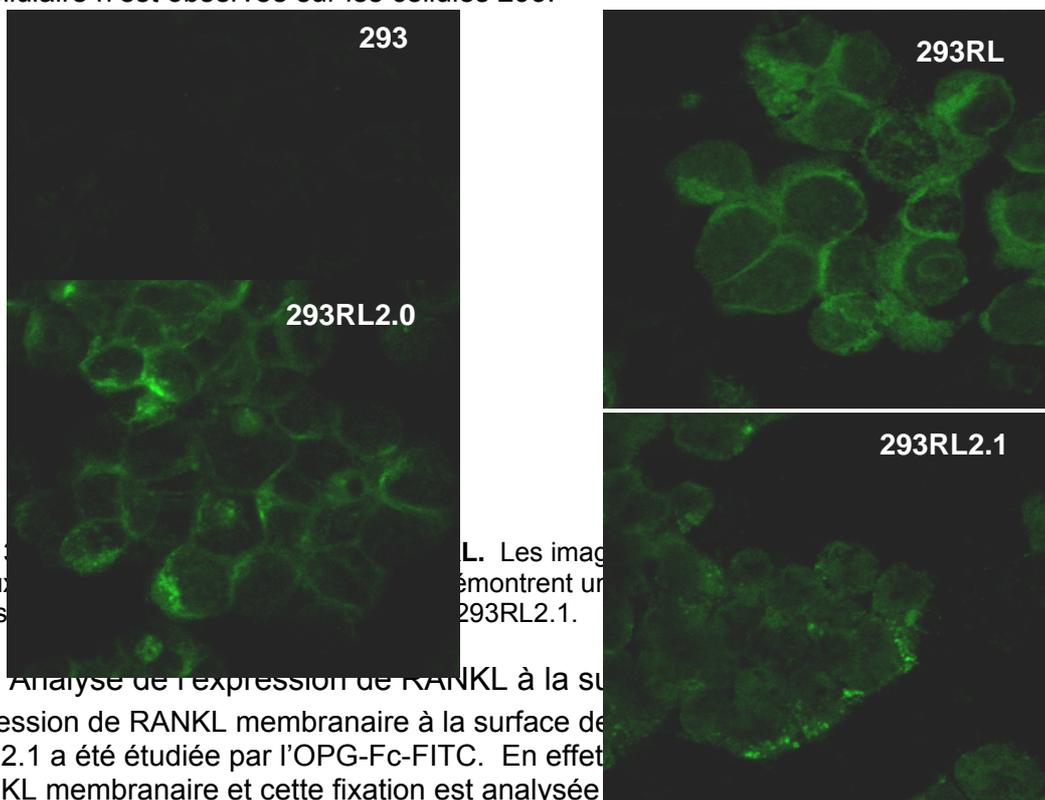


Figure 35 : Localisation intracellulaire de la protéine RANKL. Les images confocales montrent une expression intracellulaire de RANKL dans les cellules 293RL, 293RL2.0 et 293RL2.1.

3) Analyse de l'expression de RANKL à la surface des cellules 293, 293RL, 293RL2.0 et 293RL2.1. L'expression de RANKL membranaire à la surface des cellules 293RL2.1 a été étudiée par l'OPG-Fc-FITC. En effet, la fixation de l'OPG-Fc-FITC à RANKL membranaire et cette fixation est analysée par cytométrie en flux. Les cellules déposées à raison de 10⁶ cellules/puits sont incubées en présence ou en absence d'OPG-Fc-FITC (1pmole/puits) pendant une heure à 4°C. Les cellules sont ensuite rincées trois fois avec du PBS avant d'être analysées en cytométrie en flux. Sur la figure 37 (A, D) aucun marquage positif n'est observé en présence d'OPG-Fc-FITC sur les cellules 293 et 293RL2.1. A l'inverse, un marquage positif est constaté pour les cellules 293RL et 293RL2.0. Ces résultats nous démontrent une expression plus importante de RANKL à la surface des cellules 293RL (MFI 6,4 (Intensité Moyenne de Fluorescence) comparé aux cellules 293RL2.0 (MFI 2,8) (fig.37 B, C). En ce qui concerne les cellules 293RL2.1, une absence d'expression de RANKL à la surface cellulaire est constatée.

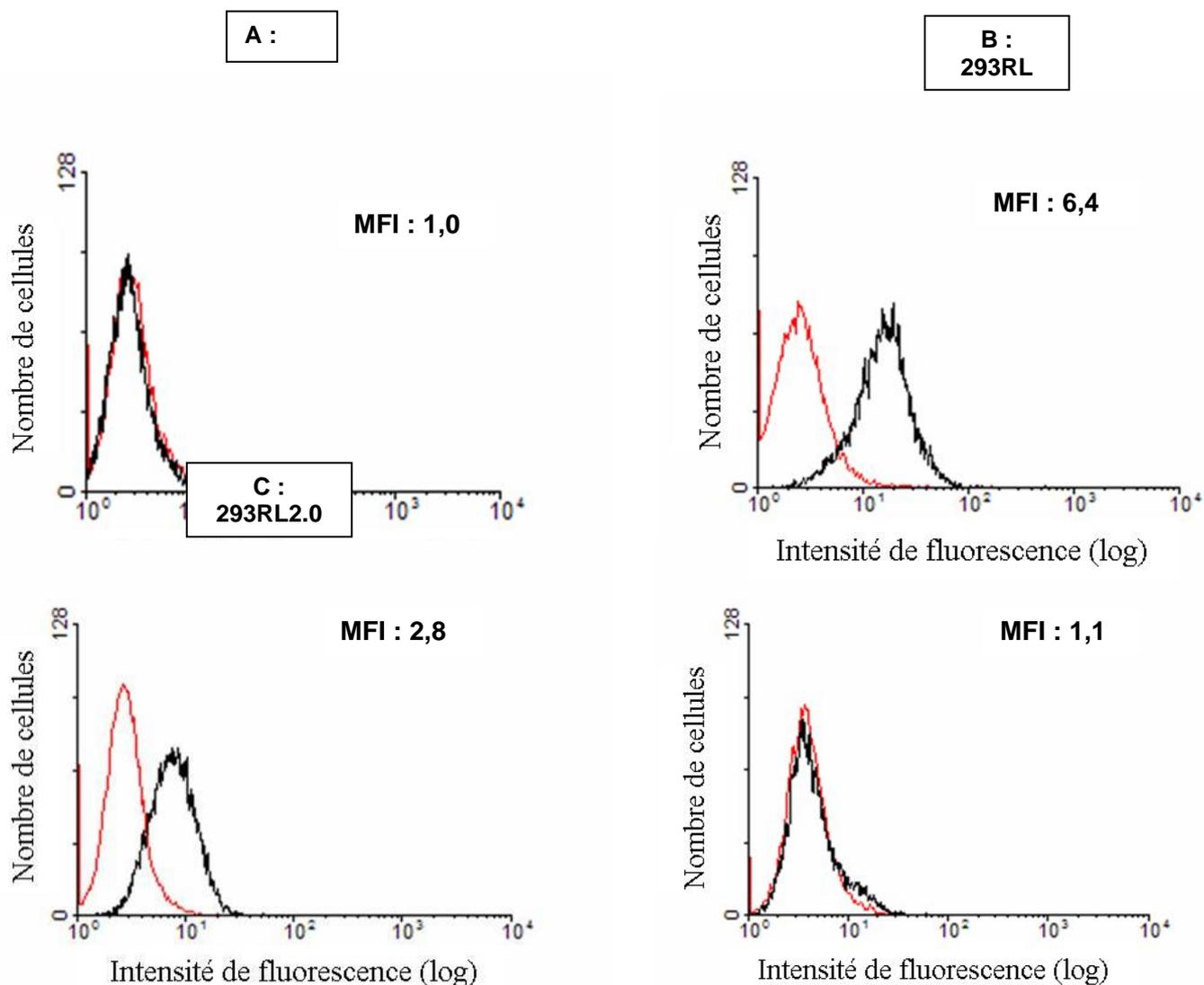


Figure 37 : Une analyse de la présence de RANKL en cytométrie en flux est réalisée sur les cellules 293 (A), 293RL (B), 293RL2.0 (C) et 293RL2.1 (D) avec un marquage d'OPG-Fc-FITC. Un déplacement positif des cellules 293RL et 293RL2.0 est observé en présence d'OPG-Fc-FITC. La fixation d'OPG-Fc-FITC à RANK-L membranaire (profil noir) est comparée aux cellules contrôles sans OPG-Fc-FITC (profil rouge). L'intensité moyenne de fluorescence (MFI) est calculée pour chaque type cellulaire.

$$\text{MFI} = (\text{Intensité fluorescence [OPGFc-FITC]} / \text{Intensité fluorescence cellules contrôles})$$

B) MODULATION DE LA BIODISPONIBILITÉ D'OPG PAR LES DIFFÉRENTES ISOFORMES.

1) Cinétique de disparition d'OPG dans les surnageants de culture cellulaire

Les 4 types cellulaires 293, 293RL, 293RL2.0 et 293RL2.1 sont tous incubés en présence d'OPG-Fc à une concentration de 100 ng/ml pendant 24 heures à 37°C. A différents temps,

un prélèvement est effectué et la concentration d'OPG-Fc est mesurée par ELISA. La concentration d'OPG-Fc dans le milieu de culture des cellules n'est pas modifiée pour les 293 et 293RL2.1 alors qu'une disparition rapide de l'OPG-Fc est constatée pour les cellules 293RL et 293RL2.0 (Figure 38). Les résultats ainsi obtenus démontrent l'importance d'un domaine intra cytoplasmique de RANKL dans l'internalisation d'OPG-Fc.

% OPG-Fc

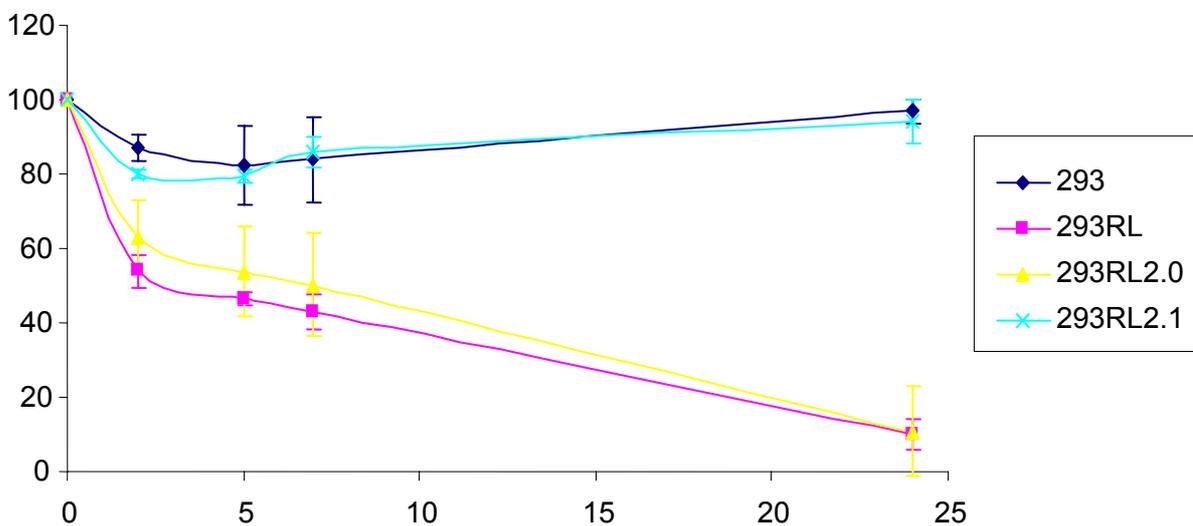


Figure 38 : 100 ng/ml d'OPG-Fc sont incubés avec les cellules 293 (●), 293RL (■), 293RL2.0 (▲) ou 293RL2.1 (×) à 37°C pendant 24 heures maximum. Pendant l'incubation, la concentration extracellulaire d'OPG-Fc restant dans les surnageants cellulaires est mesurée à différents temps par la technique d'ELISA.

2) Analyse par microscopie confocale du devenir de l'OPG-Fc par les cellules 293, 293RL 293RL2.0 et 293RL2.1

Le devenir du complexe OPG-Fc-RANK-L par les 4 types cellulaires (293, 293RL, 293RL2.0 et 293RL2.1) a également été étudié par microscopie confocale. Pour cela, ces cellules sont incubées en présence d'OPG-Fc-FITC à 100 ng/ml pendant 2 heures à 37°C, rincées, puis déposées sur une lame de verre. Les lames sont fixées pour être ensuite analysées par microscopie confocale. Pour les cellules 293 et 293RL2.1, aucun marquage positif d'OPG-Fc-FITC n'est observé alors que pour les cellules 293RL une localisation intracellulaire plus importante d'OPG-Fc-FITC est constatée comparé aux cellules 293RL2.0. Par conséquent, l'OPG-Fc est internalisée par RANKL membranaire localisé à la surface des cellules 293RL et 293RL2.0.

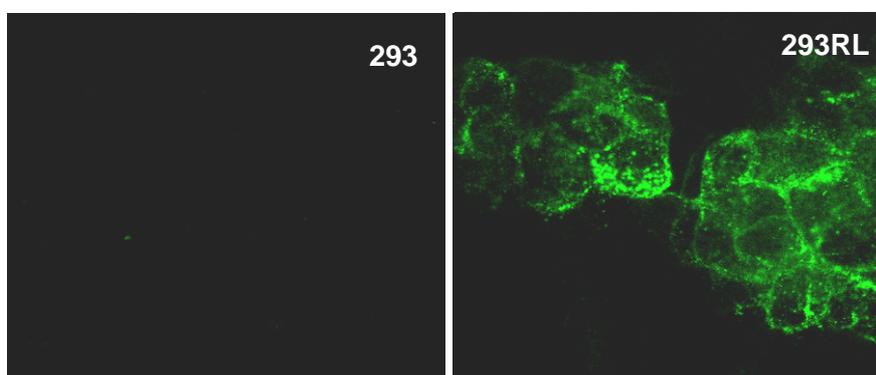


Figure 39 : Localisation intracellulaire d'OPG-Fc-FITC. A confluence, les cellules sont incubées en présence de 100 ng/ml d'OPG-Fc-FITC pendant 2 heures à 37°C. Les images (agrandissement x 40) correspondant aux coupes de cellules de 0,3µm nous démontrent une distribution intracellulaire d'OPG-Fc-FITC pour les cellules de type 293RL et 293RL2.0. En ce qui concerne les cellules 293 et 293RL2.1, aucun marquage d'OPG-Fc-FITC n'est observé.

DIFFÉRENCIATION OSTÉOCLASTIQUE

RANKL, en se fixant sur son récepteur RANK exprimé à la surface des cellules préostéoclastiques, stimule la différenciation et l'activation des préostéoclastes en ostéoclastes matures. Afin de vérifier l'activité biologique de nos cellules 293 transfectées par les différentes isoformes de RANKL de souris sur la différenciation ostéoclastique, un modèle d'ostéoclastogenèse, utilisant la lignée RAW 264.7 a été choisi. Cette lignée se différencie rapidement en ostéoclastes sous l'action de RANKL (Wittrant *et al.*, 2004). Les ostéoclastes différenciés obtenus sont mis en évidence pour leur activité TRAP (Phosphatase Acide Résistante au Tartrate).

A) DIFFÉRENCIATION OSTÉOCLASTIQUE À PARTIR DE LA LIGNÉE RAW 264.7 EN PRÉSENCE DE RANKL SOLUBLE.

Afin de permettre une différenciation optimale des cellules RAW, une densité cellulaire de 3000 cellules par puits a été choisie (Wittrant *et al.*, 2004). En présence de RANKL soluble (100 ng/mL), les cellules RAW 264.7 se différencient en petites cellules multinucléées (> 3 noyaux) TRAP positives (Fig. 40).

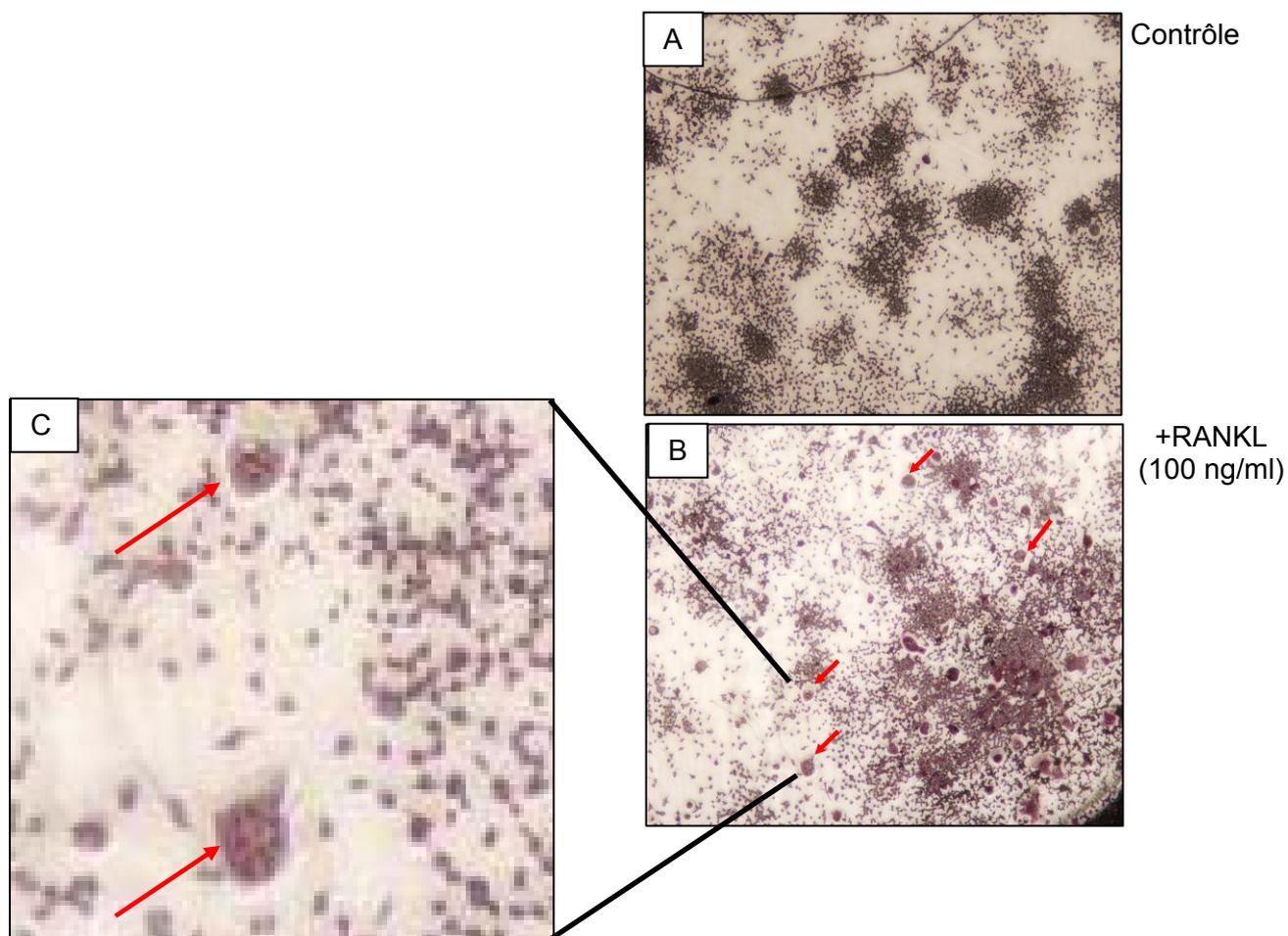


Figure 40: Etude de la différenciation des cellules RAW 264.7 en présence de RANKL soluble. Les cellules RAW ont été cultivées pendant 4 jours en absence (A) ou en présence de 100 ng/ml de RANKL (B). Une coloration TRAP est ensuite réalisée afin de visualiser les cellules multinucléées à caractère ostéoclastique (flèches rouges) (agrandissement x 20). (C) Un agrandissement de cellules multinucléées formées en présence de RANKL soluble est représenté.

B) DIFFÉRENTIATION OSTÉOCLASTIQUE À PARTIR DE LA LIGNÉE RAW EN CO-CULTURE AVEC DES CELLULES 293, 293RL, 293RL2.0 ET 293RL2.1.

La capacité des cellules exprimant les différentes isoformes de RANKL à induire l'ostéoclastogenèse a été étudiée sur la différenciation des cellules RAW *in vitro*. Pour cela, les précurseurs ostéoclastiques ont été cultivés en présence des cellules 293 transfectées

ou non. Les résultats indiquent que les co-cultures des cellules RAW en présence de cellules 293RL ou 293RL2.0, qui expriment une forme membranaire de RANKL, permettent la formation de cellules multinucléées (Fig. 41 A-B). Nous constatons que les cellules différenciées obtenues en présence des 293RL en comparaison avec celles obtenues en présence de RANKL soluble sont plus nombreuses (Fig. 42) et qu'elles sont à un stade de différenciation plus avancé matérialisé par un cytoplasme plus volumineux (Fig. 41A).

En outre, le nombre de cellules multinucléées à caractère ostéoclastique formées en présence de cellules 293RL est supérieur à celui obtenu en présence de cellules 293RL2.0 (Fig. 42). Nous constatons également l'obtention de quelques petites cellules multinucléées après co-culture des cellules RAW avec les cellules 293 n'exprimant pas RANKL (Fig. 41C). De même, les cellules 293RL2.1 n'exprimant pas la forme membranaire de RANKL présentent le même taux de cellules différenciées (Fig. 41D). Ce résultat suggère la production par la cellule 293 d'autres protéines cytokiniques capables d'induire une différenciation ostéoclastique indépendamment de RANKL.

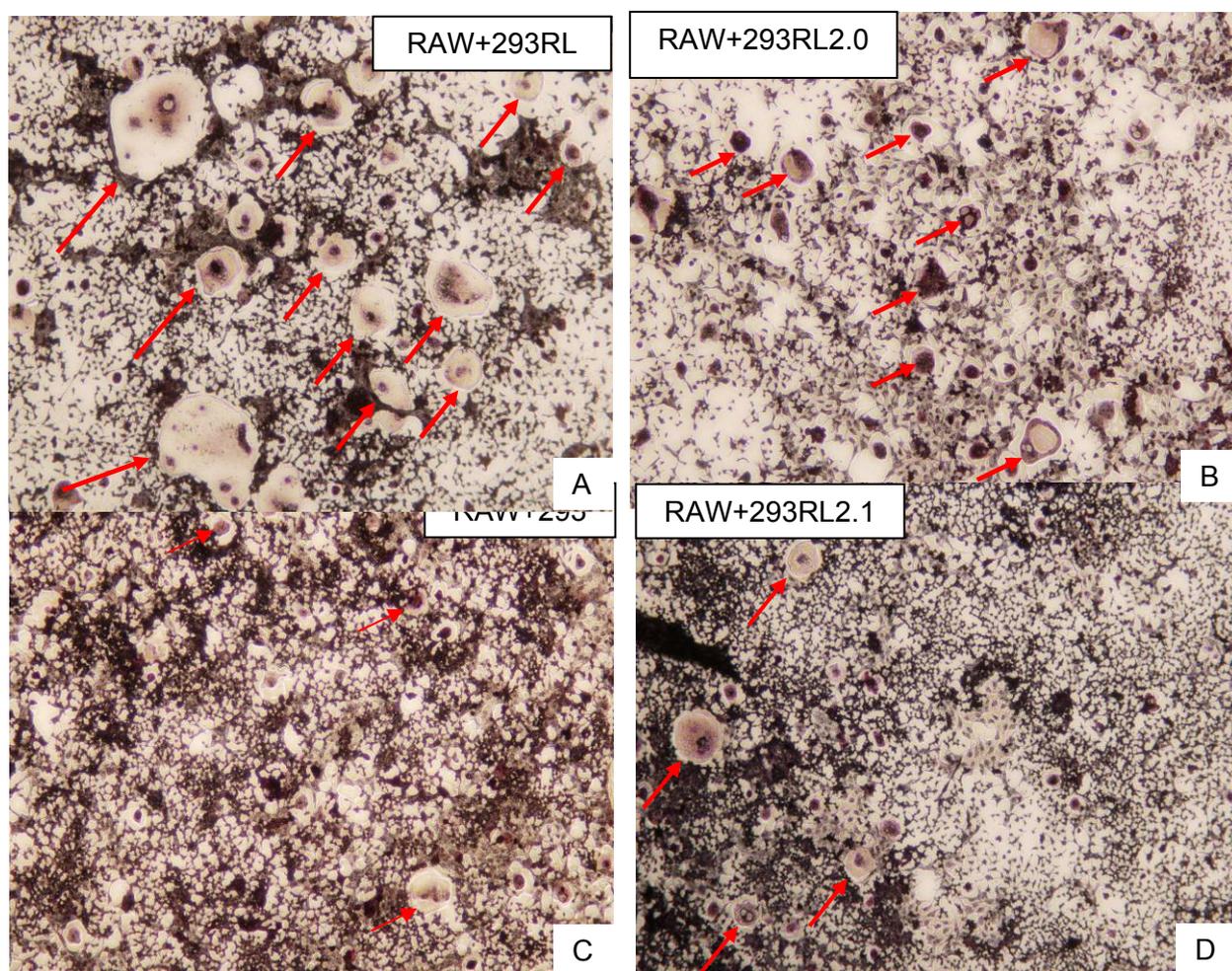


Figure 41 : Différenciation des cellules RAW (flèches rouges) en présence de A : co-culture avec 293RL ; B : co-culture avec 293RL2.0 ; C : co-culture avec 293 et D : co-culture avec 293RL2.1 (agrandissement x 20)

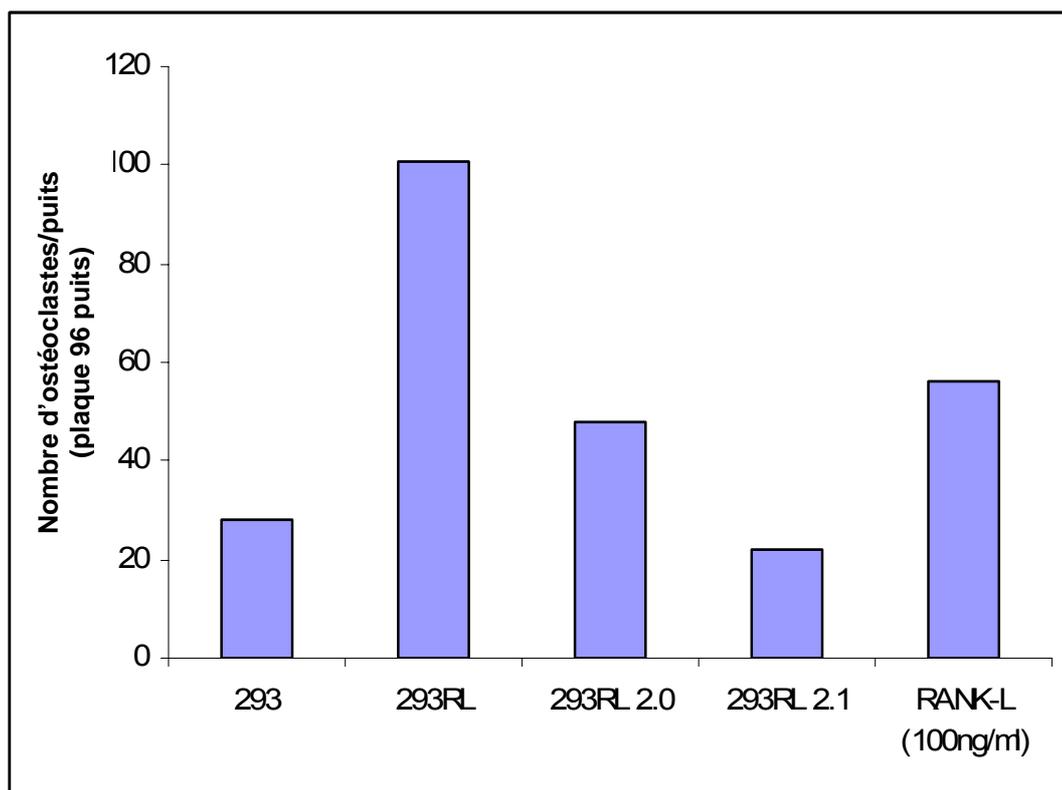


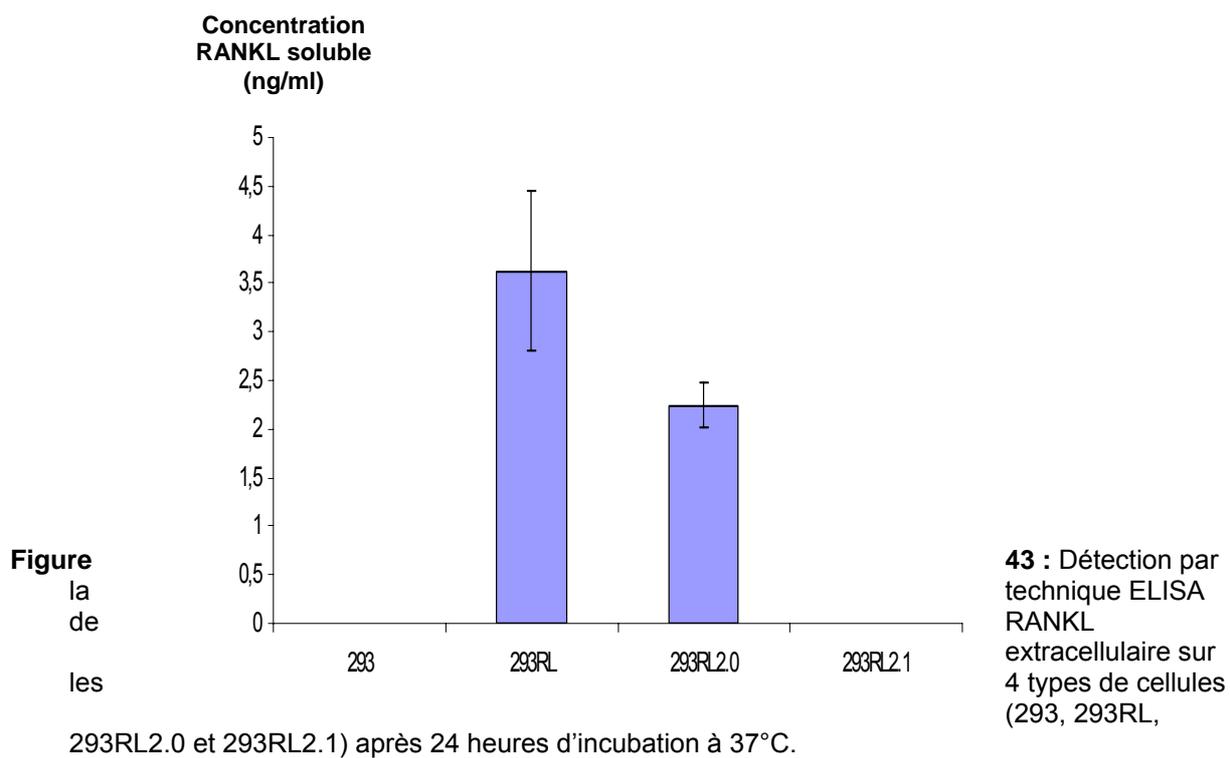
Figure 42 : Différenciation ostéoclastique des cellules RAW 264.7 en présence de RANKL soluble (100 ng/ml) ou en présence des cellules 293 transfectées par les différentes isoformes de RANKL.

ETUDE DU CLIVAGE DE RANKL MEMBRANAIRE

A) INFLUENCE DE FACTEURS OSTÉOTROPIQUES SUR LA PRODUCTION DE RANKL SOLUBLE.

1) Dosage de RANKL soluble dans les surnageants de culture cellulaire des cellules 293 et 293RL.

RANKL soluble peut provenir soit d'un clivage protéolytique de RANKL membranaire soit à partir de transcrits suite à un épissage alternatif de l'ARNm codant pour RANKL membranaire. Notre modèle cellulaire exprimant uniquement RANKL membranaire nous permet d'attribuer une éventuelle production de RANKL soluble extracellulaire exclusivement à un mécanisme de clivage protéolytique. Les concentrations de RANKL soluble libérées dans les surnageants de cultures cellulaires ont été déterminées par la technique ELISA. Une fois à confluence, les cellules 293, 293RL, 293RL2.0 et 293RL2.1 sont incubées pendant 24 heures à 37°C. Le dosage protéique dans les lysats cellulaires révèle des variations non significatives de la quantité de protéines présentes dans ces lysats cellulaires (résultat non montré). Les surnageants de culture cellulaire récupérés sont dosés par la technique d'ELISA nous indiquant une concentration de RANKL soluble de $(3,6 \pm 0,8)$ et $(2,2 \pm 0,2)$ ng/ml pour les cellules 293RL et 293RL2.0. Aucune détection de RANKL soluble n'a été observée sur les 293RL2.1 malgré la présence de la protéine dans les lysats cellulaires. L'absence de RANKL soluble sur les 293RL2.1 corrobore le résultat obtenu par l'analyse en cytométrie en flux à savoir une absence de localisation membranaire de RANKL (Figure 37). En ce qui concerne les cellules non transfectées, aucun RANKL n'a été détecté dans le milieu de culture (Fig 43).

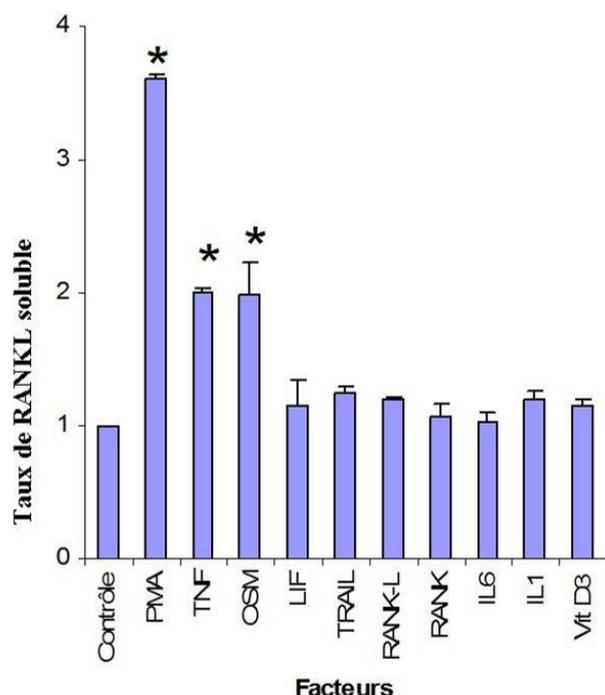


2) Effets de différents facteurs ostéotropiques sur la libération de RANKL soluble par les cellules 293RL

Les facteurs solubles à caractère ostéotropiques testés sont : RANK, OSM, Trail, PMA, $TNF\alpha$, VitD, IL6, LIF, l'IL1 et le RANKL. Les protéines sont dosées dans les lysats cellulaires. Les résultats obtenus (non montrés) révèlent des variations non significatives de la quantité de protéines présentes dans les lysats cellulaires. Ainsi, les facteurs testés n'influencent pas la prolifération cellulaire.

En l'absence de facteurs ostéotropiques, un taux basal de RANKL soluble est détecté (moyenne de 3,5 ng/ml). Après 24 heures de culture en présence de PMA, de TNF α et d'OSM, une stimulation significative de la production de RANKL soluble est observée (Fig. 44). La production de RANKL soluble est ainsi stimulée respectivement de 3,6 ; 2 et 1,98 fois comparé au contrôle sans facteur. Pour tous les autres facteurs testés, aucun effet significatif n'est observé sur cette lignée cellulaire.

Figure 44 : Modulation par des facteurs ostéotropiques de la production de RANKL soluble par les cellules 293RL.



Les cellules 293RL, en confluence, ont été placées durant 24 heures en présence ou non de différents facteurs à une concentration de 100ng/ml sauf pour l'IL1 (50ng/ml) et pour le PMA et la Vit D (10^{-8} M).
* p < 0,01

3) Effet du PMA sur l'expression du mRNA RANKL

Nous avons montré que le TNF α , l'OSM et le PMA stimulent significativement la production de RANKL soluble produite par les cellules 293RL (Fig.44). Etant donné que la stimulation de la protéine soluble est maximale en présence du PMA, l'effet de ce facteur sur l'expression de mRNA RANKL a été étudié. Nous observons une augmentation de la production du transcrite RANKL en présence de ce facteur (Fig.45).

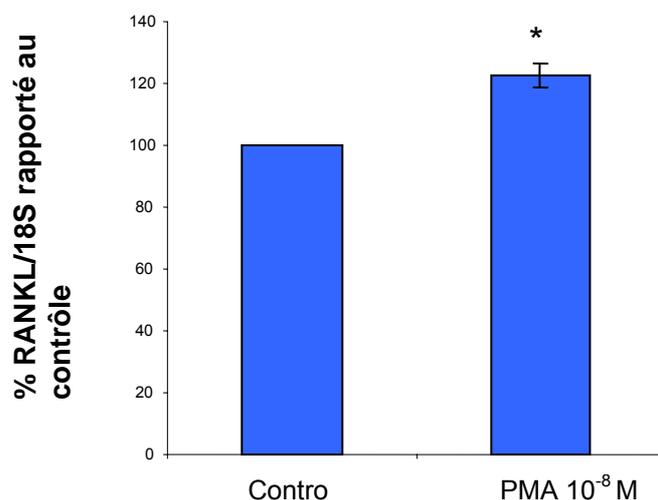


Figure 45 : Effet du PMA à 10^{-8} M sur l'expression du mRNA RANKL après 24 heures d'incubation avec les cellules 293RL.

* p < 0,01

4) L'INFLUENCE D'UN INHIBITEUR DE LA VOIE ERK1/2 SUR LA LIBÉRATION DE RANKL

Afin d'étudier le mécanisme impliqué dans la production de RANKL soluble par le PMA, un inhibiteur de la voie Erk1/2, l'UO126, a été utilisé. Nos résultats (Fig. 46) montrent une inhibition de la stimulation de RANKL soluble lorsque les cellules sont prétraitées avec l'UO126. Par conséquent, la voie Erk 1/2 est impliquée dans l'effet stimulateur du PMA.

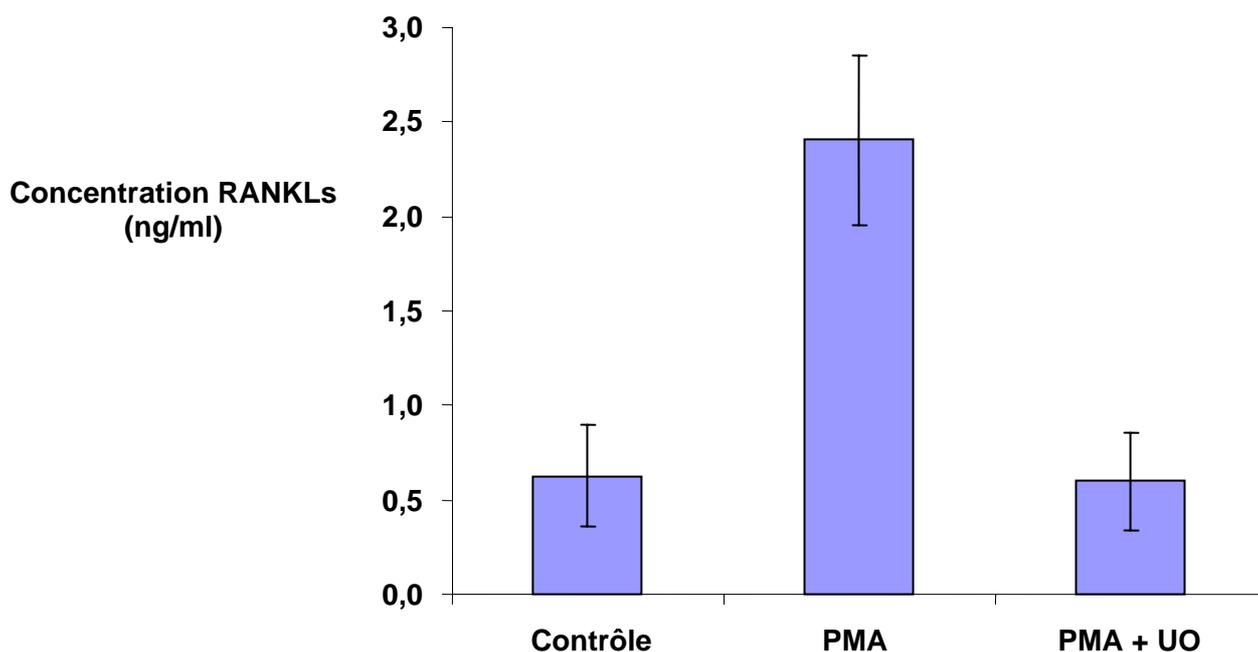


Figure 46 : Effet de l'UO126 sur la production de RANKL soluble produites par les cellules 293RL incubées pendant 6 heures avec le PMA (10^{-8} M).

B) RECHERCHE DE PROTÉASES INTERVENANT DANS LE CLIVAGE DE RANKL MEMBRANAIRE.

1) Influence d'un inhibiteur de métallosecreétase (TAPI-1) sur la libération de RANKL soluble par les cellules 293RL

L'activité protéolytique des métallosecreétases ont été largement décrites pour leur capacité à cliver divers protéines membranaires. De ce fait, un inhibiteur, le TAPI-1 (Tumor necrosis factor-Alpha Protease Inhibitor-1) a été utilisé afin d'appréhender l'implication des métallosecreétases dans le clivage protéolytique de RANKL membranaire. Les cellules 293RL sont ensemencées dans une plaque 6 puits et une fois les cellules à confluence, le milieu de culture est remplacé par du DMEM seul en présence ou non de TAPI-1 à une concentration finale de 100 μ M. Une incubation pendant 6 heures est effectuée à 37°C avant de doser par ELISA la production de RANKL soluble libéré par clivage protéolytique. En présence de TAPI-1, la libération de RANKL soluble est inhibée de 70%, démontrant ainsi une forte implication des métalloprotéases dans le clivage de RANKL membranaire (fig.47).

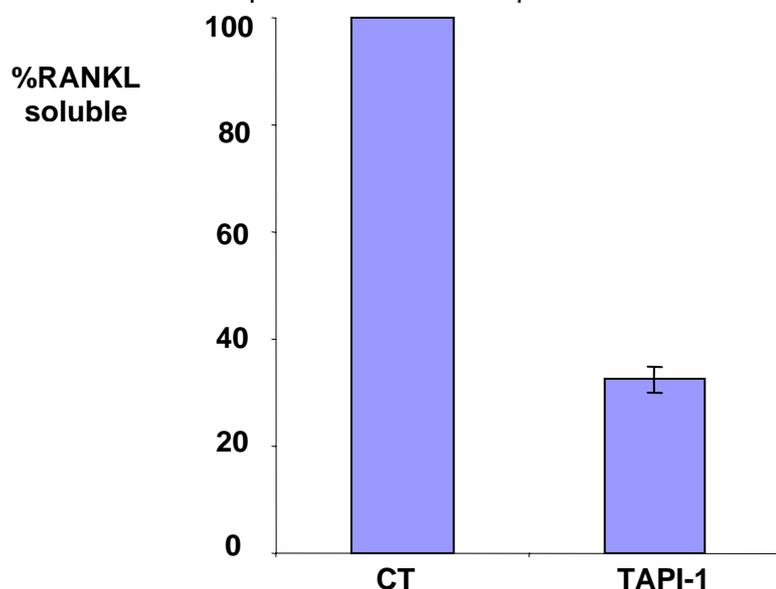
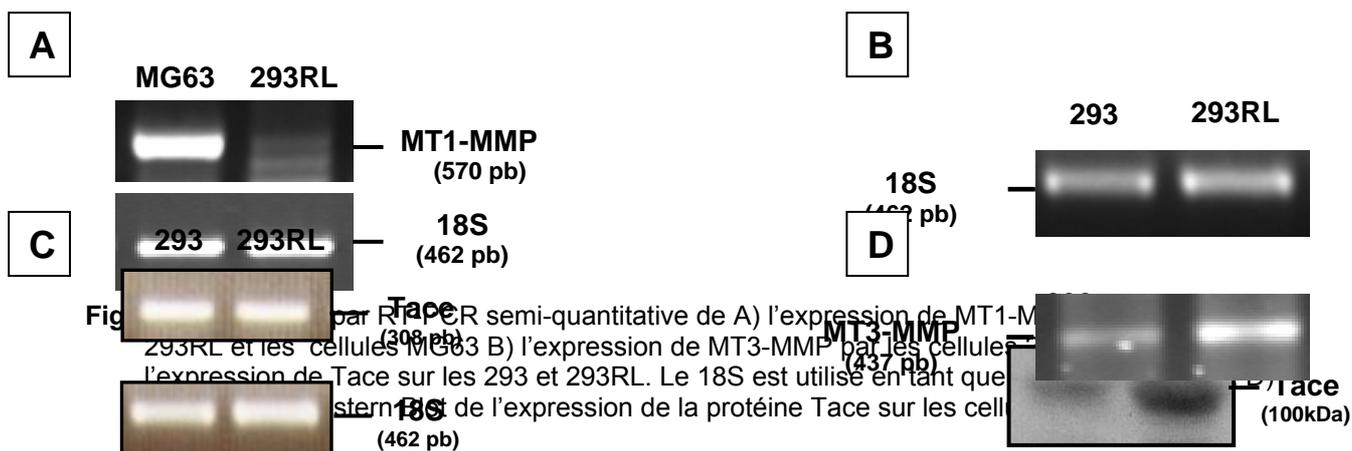


Figure 47 : Les cellules 293RL une fois à confluence dans les plaques 6 puits sont incubées en présence de TAPI-1 (100 μ M) pendant 6 heures à 37°C. Le milieu de culture des cellules est ensuite récupéré pour un dosage de RANKL soluble par ELISA.

2) Comparaison 293 et 293RL

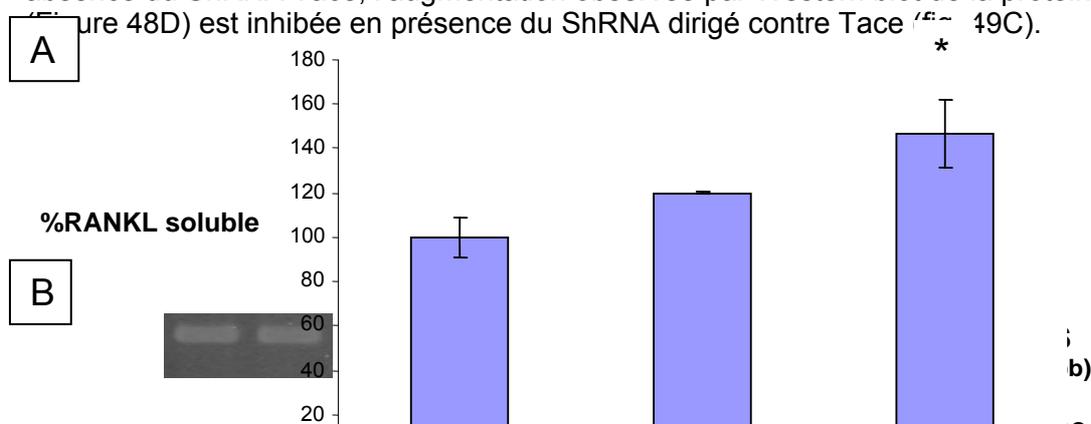
Des cellules 293, 293RL ainsi que des cellules MG63 (cellule contrôle exprimant la MT1-MMP) sont déposées dans des plaques 6 puits à raison de 100,000 cellules par puits. A confluence, les cellules sont lysées pour extraire soit le contenu protéique soit tout l'ARNm. Une analyse par RT-PCR semi-quantitative sur les cellules 293 et 293RL a été effectuée sur l'expression de plusieurs transcrits : MT-1, 2, 3, 4 et 5 et ADAM- 9, 10, 17 et 19. Une absence d'expression de la MT1-MMP a été observée sur les cellules 293RL (fig.48A) contrairement aux cellules contrôle MG63 qui expriment la MT1-MMP. De plus, aucune modulation n'a été constatée pour les différents transcrits sur les 293 et 293RL à l'exception de la MT3-MMP. En effet, une augmentation de l'expression de l'ARNm MT3-MMP a été remarquée sur les 293RL comparée aux cellules 293 (fig.48B). Malgré le même taux du transcrit Tace dans les cellules 293 et 293RL, une analyse de la protéine Tace par Western Blot a montré une expression plus importante de Tace dans les cellules 293RL (fig. 48C-D).



3) Effets du ShRNA de Tace et de la MT3-MMP sur la production de RANKL soluble par les 293RL

Les effets du ShRNA Tace et ShRNA MT3-MMP ont été testés sur les cellules 293RL par transfection transitoire. Par la machinerie cellulaire, les ShRNA sont clivés pour libérer des séquences spécifiques (SiRNA) responsables de la dégradation d'ARNm ciblé. Le surnageant de culture cellulaire après 24 heures d'incubation à 37°C est récupéré pour un dosage de RANKL soluble par ELISA et les cellules sont lysées pour extraire soit le contenu protéique pour une analyse par Western Blot de la protéine Tace soit l'ARNm pour une analyse par RT-PCR semi-quantitative de l'expression des transcrits Tace et MT3-MMP. Aucune modulation de la libération de RANKL soluble n'est observée en présence des séquences ShRNA Tace et MT3-MMP. De plus, l'analyse des transcrits ne nous a révélé aucune inhibition de l'expression des ARNm Tace ou MT3-MMP en présence des ShRNA Tace et MT3 respectivement et par Western Blot, aucune modulation de la protéine Tace n'a été constatée.

Au vu de ces résultats, une transfection stable par les différents ShRNA a été réalisée afin de produire suffisamment de ShRNA dans la cellule. Les cellules 293RL sont transfectées stablement par des séquences codant soit pour le ShRNA Tace soit pour le ShRNA MT3. Les cellules une fois à confluence sont incubées pendant 24 hrs à 37°C dans du DMEM seul. Le surnageant est récupéré pour un dosage de RANKL soluble par ELISA et les cellules sont lysées soit pour une analyse par Western Blot de la protéine Tace soit pour une analyse par RT-PCR semi-quantitative de l'expression des transcrits Tace et MT3-MMP. D'après le dosage ELISA, aucune modulation de la libération de RANKL soluble n'est observée en présence des séquences ShRNA Tace. Par contre, une augmentation de RANKL soluble est constatée en présence de ShRNA MT3 (fig. 49A). L'analyse des transcrits ne montre aucune diminution de l'expression de l'ARNm de Tace. A l'inverse, une inhibition de l'expression de l'ARNm MT3-MMP est observée en présence du ShRNA MT3-MMP (fig. 49B). Cependant, malgré la non modulation du transcrite Tace en présence ou en absence du ShRNA Tace, l'augmentation observée par Western blot de la protéine Tace (figure 48D) est inhibée en présence du ShRNA dirigé contre Tace (figure 49C).



C **Figure 49 :** Les cellules M3RL sont transfectées stablement par des séquences ShRNA Tace et ShRNA CT. Après 24 heures d'incubation à 37°C, le surnageant cellulaire est récupéré et les cellules sont analysées pour la présence de RANKL soluble par ELISA dans les surnageants de culture. Les cellules sont également analysées pour la présence de séquences ShRNA Tace et ShRNA MT3-MMP. B) Analyse quantitative de l'expression des transcrits Tace et MT3-MMP en présence des séquences ShRNA spécifiques. Le 18S est utilisé comme gène de référence. C) Western Blot de la protéine Tace en présence de la séquence ShRNA Tace.

* p<0,05

DISCUSSION

Le tissu osseux est en perpétuel remaniement grâce à un équilibre entre les phases d'apposition, assurées par les ostéoblastes, et les phases de résorption, dépendantes de l'activité des ostéoclastes. Afin de permettre le maintien de la masse osseuse, ces deux processus sont finement régulés par des cytokines appartenant à la superfamille du TNF et de leurs récepteurs, et plus particulièrement par une triade moléculaire constituée d'OPG, de RANK et de RANKL. Cette triade représente l'élément clé pour la régulation de la résorption osseuse. La protéine RANKL, par sa fixation sur son récepteur RANK à la surface des précurseurs ostéoclastiques, est un facteur stimulant de la différenciation et de l'activation ostéoclastique. A l'inverse, l'OPG agit comme un inhibiteur en se liant à RANKL et empêche ainsi la fixation de celui-ci sur son récepteur RANK.

L'équilibre entre la formation et la résorption osseuse est rompue en faveur d'une dégradation osseuse lors de pathologies ostéolytiques. Le traitement couramment utilisé se compose principalement de l'administration de bisphosphonate (Heymann *et al.*, 2004). Cependant, bien que l'efficacité de ce traitement soit clairement démontrée dans l'inhibition de la résorption osseuse, plusieurs effets secondaires et indésirables ont été récemment constatés (Pfister *et al.*, 2000 ; Peter *et al.*, 2004 ; Whyte *et al.*, 2003). Par conséquent, de nouvelles approches thérapeutiques ont été proposées afin de pallier à ces effets secondaires (Wittrant *et al.*, 2004 ; Heymann *et al.*, 2005). Parmi ces approches, l'OPG représente un agent moléculaire stratégique capable de réduire la perte osseuse de par son rôle d'inhibiteur sur la résorption osseuse. Bien que plusieurs résultats encourageants soient rapportés dans la littérature au sujet des effets de l'OPG en tant qu'agent thérapeutique contre des maladies ostéolytiques, peu de données *in vitro* sont accessibles au sujet de sa biodisponibilité dans le compartiment extracellulaire.

Nous nous sommes par conséquent intéressés à la biodisponibilité de l'OPG une fois fixée à RANKL membranaire. Afin de mener à bien notre projet, nous avons utilisé des cellules humaines de rein fœtal (293) n'exprimant ni RANKL ni OPG et qui ont été transfectées par du cDNA de la forme complète de RANKL transmembranaire de souris (293RL). Après vérification de l'expression de l'ARNm par RT-PCR et de la protéine RANKL par Western Blot, les expériences concernant la biodisponibilité de l'OPG sont réalisées en présence d'OPG-Fc. L'absence du domaine de liaison à l'héparine permet d'exclure toute interaction avec des protéoglycane exprimés par la cellule 293RL. Lorsque les cellules 293RL ont été incubées en présence de l'OPG-Fc, une diminution rapide de l'OPG-Fc a été observée dans le surnageant de culture cellulaire, processus qui a lieu sans activité enzymatique extracellulaire. En effet, en présence d'inhibiteurs de protéases extracellulaires, aucune inhibition de la disparition de l'OPG-Fc n'est observée. L'hypothèse d'une éventuelle internalisation de l'OPG-Fc par la cellule 293RL est proposée. De plus, un anticorps anti-RANKL de souris est capable de maintenir la concentration extracellulaire de l'OPG-Fc. Des résultats similaires ont été obtenus sur des ostéoblastes de souris exprimant physiologiquement RANKL membranaire. Ces données précisent un rôle primordial de la fixation d'OPG-Fc à RANKL membranaire exprimé par les cellules 293RL dans la biodisponibilité de l'OPG.

L'analyse par microscopie confocale nous a également montré que l'OPG-Fc une fois fixée à RANKL membranaire sur la cellule 293RL est internalisée et localisée au niveau cytoplasmique et au niveau périméridien. Le complexe formé entre l'OPG-Fc et RANKL est internalisé par un processus d'endocytose passant par la voie de la formation d'un manteau de clathrine puisqu'en présence de chlorpromazine une accumulation de l'OPG-Fc par la cellule est observée. A l'inverse, la filipine, qui est capable de modifier la structure de lipides-rafts de la membrane plasmique, n'est pas capable d'inhiber l'internalisation de l'OPG-Fc. De plus, les résultats d'une cinétique d'OPG-Fc sur les cellules 293RL nous

indiquent qu'une fois internalisée par la cellule, l'OPG est dégradée. Cette dégradation intracellulaire nécessite l'intervention du protéasome et du lysosome, puisque la dégradation intracellulaire de l'OPG est ralentie par leurs inhibiteurs respectifs (lactacystine et chloroquine).

L'OPG en se fixant à RANKL membranaire est, soit entraînée par l'internalisation de RANKL de façon constitutive, soit augmente l'internalisation de RANKL. L'analyse de l'expression de la protéine RANKL par Western Blot dans les lysats cellulaires montre que l'OPG en se fixant à RANKL stimule l'internalisation et la dégradation intracellulaire de RANKL par les cellules 293RL et de ce fait diminue la demi-vie de celle-ci. De plus, nous observons que RANKL disparaît par un processus d'endocytose passant par la voie de la formation d'un manteau de clathrine corroborant les résultats obtenus lors de l'étude de l'internalisation de l'OPG (Kwan *et al.*, 2006).

La forme complète de l'OPG (OPGc) peut interagir via son domaine de liaison à l'héparine avec des protéoglycanes. Ainsi, Standal *et al.* (2002) ont montré que l'OPGc peut se fixer au syndecan-1, surexprimé à la surface des cellules de myélome. Cette OPGc une fois fixée au syndecan-1 est ensuite internalisée et dégradée par ces cellules de myélome. De plus, des travaux effectués par Mosheimer *et al.* (2005) ont démontré que l'OPGc pouvait affecter la migration des monocytes en interagissant toujours avec le syndecan-1. Lorsque l'OPG sous sa forme complète est incubée avec les cellules 293RL une disparition de l'OPGc dans le milieu de culture est également observée. A l'inverse des résultats obtenus en présence d'un anticorps anti-RANKL de souris, la disparition de l'OPGc n'est pas affectée dans le milieu extracellulaire en présence d'un anticorps anti-Syndecan-1. Par conséquent, dans notre modèle cellulaire, on n'a pu mettre en évidence une éventuelle implication du Syndecan-1 dans la disparition d'OPG extracellulaire.

Ces résultats ne sont pas contradictoires puisque l'OPG peut se lier à RANKL et/ou au Syndecan-1. Par conséquent, la fixation de l'OPG à la cellule aussi bien que sa disparition extracellulaire dépendra du niveau d'expression de RANKL ou du Syndecan-1 dans un modèle cellulaire. La biodisponibilité de l'OPG peut ainsi être modulée par un équilibre entre des protéoglycanes tels que le Syndecan-1 ou de l'expression de RANKL membranaire (Llorente *et al.*, 2001). Ces deux voies pourraient par conséquent expliquer les différents mécanismes impliqués dans l'internalisation d'OPG observée soit sur les cellules de myélome surexprimant le Syndecan-1 soit sur les ostéoblastes exprimant physiologiquement RANKL membranaire. En effet, en présence d'un anticorps anti-RANKL de souris, l'internalisation d'OPG-Fc est inhibée sur les cellules ostéoblastiques.

Des héparanes sulfates sont responsables de la séquestration de différents facteurs de croissance et de cytokines (Vlodavsky *et al.*, 1991 ; Hildebrand *et al.*, 1994) dans la matrice extracellulaire ou à la surface des cellules. Cette séquestration peut promouvoir la fixation du facteur de croissance à son récepteur spécifique et ainsi stimuler son action (Steinfeld *et al.*, 1996) ou au contraire l'empêcher d'interagir avec ses cellules cibles et ainsi avoir un effet inhibiteur (Bi *et al.*, 2005). Borset *et al.* (2000) ont mis en évidence que les molécules de Syndecan-1, regroupées au niveau d'uropodes dans les cellules de myélome polarisées, sont capables de séquestrer l'HGF (Hepatocyte growth factor) et l'OPG. L'ensemble de ces données suggère que l'OPG, ainsi séquestrée, ne puisse plus interagir avec RANKL ce qui favoriserait la résorption osseuse. Ainsi, par Western Blot nous démontrons que la préincubation de l'OPG à différents GAG (Glycoaminoglycane) inhibe la baisse de la demi-vie de RANKL sous l'influence de l'OPG. Ce résultat est donc en corrélation avec l'inhibition de la fixation de l'OPG par les GAG observés par Résonance Plasmonique de Surface

(Théoleyre *et al.*, 2006). Il est à noter qu'une taille minimale de 10 résidus saccharidiques est nécessaire pour obtenir une activité inhibitrice comparable à celle de l'héparine. Nous mettons ainsi en évidence la capacité de l'héparine et d'autres GAG à inhiber la fixation de l'OPG à RANKL, révélant une possible implication de ces molécules dans le contrôle de la biodisponibilité de l'OPG. En effet, ces différents GAG testés pourraient séquestrer l'OPG dans la matrice osseuse et inhiber son internalisation via RANKL membranaire.

RANKL, membre de la superfamille du TNF, interagit sur son récepteur transmembranaire RANK, qui possède un long domaine cytoplasmique responsable de la transduction d'un signal intracellulaire (Anderson *et al.*, 1997 ; Lee et Kim, 2003 ; Hsu *et al.*, 1999). Le complexe ainsi formé est alors internalisé. Il a été montré récemment que les cavéoles et les lipides-rafts sont impliqués dans le processus d'internalisation des membres de la famille des récepteurs au TNF (Alessio *et al.*, 2005). La voie des rafts joue également un rôle essentiel dans la stimulation de RANK durant l'activation et la différenciation ostéoclastique. Ainsi, la désorganisation des lipides-rafts est responsable du blocage de TRAF6 et de l'activation d'Akt médié par RANKL dans les ostéoclastes (Ha *et al.*, 2003). Au contraire de RANK, RANKL possède un court domaine cytoplasmique de 44 acides aminés (Lacey *et al.*, 1998 ; Horowitz *et al.*, 2001). Selon nos résultats, la voie des lipides rafts n'est pas impliquée dans l'internalisation de RANKL après fixation à l'OPG. Nous pouvons faire le parallèle avec la métalloprotéase MT1-MMP (membrane type-1 matrix metalloproteinases) qui, comme la forme complète de RANKL, possède un court domaine cytoplasmique composé d'une vingtaine d'acides aminés (Lehti *et al.*, 2000 ; Lacey *et al.*, 1998). Il a été récemment démontré que ce court domaine de la MT1-MMP est important dans le processus d'internalisation modulée par la voie des clathrines (Uekita *et al.*, 2001) et via la voie des cavéoles (Remacle *et al.*, 2003). En effet, l'enzyme ayant ce domaine cytoplasmique complètement tronqué reste localisée à la surface des cellules, alors que la MT1-MMP de type sauvage est rapidement internalisée (Lehti *et al.*, 2000 ; Jiang *et al.*, 2001 ; Uekita *et al.*, 2001). Par conséquent, nous pouvons émettre l'hypothèse que le domaine cytoplasmique de RANKL soit nécessaire pour l'internalisation et la dégradation intracellulaire après fixation de l'OPG.

Afin d'étudier l'hypothèse que le domaine cytoplasmique de RANKL est nécessaire pour l'internalisation et la dégradation de l'OPG extracellulaire, des cellules humaines de rein fœtal (293) n'exprimant ni RANKL ni OPG ont été transfectées par le cDNA codant pour les différentes isoformes de RANKL de souris : RANKL complet (293RL), RANKL avec le domaine intracytoplasmique tronqué entre l'acide aminé 14 à 44 (293RL2.0) et RANKL sans domaine intracytoplasmique (293RL2.1) équivalent à l'isoforme RANKL2 humaine. L'expression de l'ARNm de même que la protéine RANKL de souris ont été détectées sur les trois types cellulaires transfectés par les cDNA codant pour les différentes isoformes. Cependant, une différence d'expression a été observée pour la protéine RANKL dans les lysats cellulaires. Une concentration significative de (121 ± 16) , (39 ± 12) et $(4 \pm 0,3)$ ng/ml a ainsi été obtenue respectivement pour les cellules 293RL, 293RL2.0 et 293RL2.1. Aucune détection de RANKL membranaire n'a été constatée sur les 293RL2.1 contrairement aux cellules 293RL et aux cellules 293RL2.0. En outre, une expression membranaire plus importante de RANKL a été constatée pour les cellules 293RL comparée aux cellules 293RL2.0. A l'inverse de la MT1-MMP, nos résultats démontrent que RANKL n'ayant plus de domaine intracytoplasmique n'est plus localisée à la surface cellulaire. L'importance d'un tel domaine dans le contrôle de la biodisponibilité de l'OPG exogène reste à être affirmée.

Lorsque les différentes isoformes sont incubées en présence d'OPG-Fc, une internalisation est observée pour les cellules 293RL et 293RL2.0. A l'inverse aucune internalisation d'OPG-Fc n'est observée pour les cellules 293 et les cellules 293RL2.1. Comme nous l'avons

observé pour la protéine RANKL complète, l'OPG module la demi-vie de RANKL2.0. Les résultats ainsi obtenus démontrent l'importance d'un domaine intra cytoplasmique de RANKL dans l'internalisation d'OPG-Fc. Le manque d'un tel domaine entraîne une absence d'expression de RANKL à la surface cellulaire et par conséquent l'OPG n'est plus capable de se fixer et d'être internalisée. Ce résultat concernant l'expression des isoformes de RANKL confirme ceux obtenus par Suzuki *et al.* (2004) En effet, ils ont pu constater qu'en transfectant RANKL2 humaine sans le domaine intracellulaire, une absence de localisation membranaire de RANKL était constatée. Si la présence d'un domaine intracellulaire de RANKL est importante pour sa localisation membranaire, le rôle de l'isoforme RANKL2 chez la souris pour lequel le domaine intracellulaire est tronqué entre les acides aminés 14 et 44, reste à ce jour sans réponse dans la physiologie osseuse.

Par ailleurs, si la forme membranaire et les formes solubles de RANKL semblent jouer des rôles semblables dans la biologie des ostéoclastes, une étude récente a pu montrer une participation plus subtile de ces différentes isoformes dans la différenciation ostéoclastique (Ikeda *et al.*, 2003). La différenciation ostéoclastique est commandée par des interactions complexes entre OPG, RANK et RANKL. Des molécules d'OPG, de RANK et de RANKL sont caractérisées par leurs possibilités de former des complexes homo et hétérotrimériques (Theoleyre *et al.*, 2004a). Ainsi, alors que le monomère d'OPG est biologiquement actif, la formation d'un dimère d'OPG est exigée pour obtenir sa pleine activité biologique *in vitro* et *in vivo* (Schneeweis *et al.*, 2005). De même, par une étude cristallographique, il a été montré que RANKL pouvait former un homotrimère. Dans ce contexte, Lam *et al.* (2001), ont proposé un modèle dans lequel RANKL trimérique se lie à un complexe trimérique de RANK. Cette trimérisation permet la pleine activité biologique de RANKL. Récemment, Ikeda *et al.* (2003) ont indiqué que les isoformes de RANKL de souris pouvaient interagir entre elles afin d'exercer leurs activités biologiques. Dans leurs études, des cellules murines NIH3T3 sont transfectées stablement par les différentes isoformes de RANKL de souris et ils ont constaté que RANKL et RANKL2 pouvaient former des préostéoclastes mononuclés à partir des cellules de moëlle, alors que RANKL3 (RANKL soluble) n'induit ni des préostéoclastes ni des ostéoclastes multinuclés. Ikeda *et al.* (2003) ont également démontré que la coexpression de RANKL et de RANKL2 de souris augmente la formation d'ostéoclastes multinuclés. Au contraire, la coexpression de RANKL3 avec RANKL complet ou RANKL2 diminue significativement la proportion d'ostéoclaste multinucléé formée comparée au RANKL complet ou au RANKL2 seul. De plus, le même résultat a été obtenu en présence des cellules NIH3T3 transfectées, exprimant soit la forme complète de RANKL humaine seule soit en co-expression avec RANKL3 humaine.

Nous avons vérifié l'activité biologique de nos cellules 293 transfectées à induire une différenciation ostéoclastique. Nous observons une formation de cellules multinuclées plus accentuée lorsque les cellules RAW sont co-cultivées en présence de cellules 293RL comparativement aux cultures des RAW en présence de la molécule RANKL soluble. La concentration de RANKL soluble produite par les cellules 293RL est très inférieure à la concentration de RANKL soluble utilisée pour la différenciation des cellules RAW ce qui démontre le fait que le contact cellule-cellule ou la présence d'autres protéines cytokiniques sécrétées par les cellules 293 transfectées, faciliteraient la formation de cellules multinuclées. Cependant, une différence a été observée pour le nombre de cellules multinuclées formées en présence des cellules 293RL ou 293RL2.0. Cette différence peut être expliquée par la baisse du taux de la protéine RANKL par les cellules 293RL2.0.

Contrairement au RANKL2 de souris (domaine intracytoplasmique incomplet), Suzuki *et al.* (2004) ont constaté que les cellules exprimant l'isoforme RANKL2 humaine (sans le domaine intracytoplasmique) n'étaient pas capables d'induire une différenciation ostéoclastique.

Dans notre modèle d'ostéoclastogenèse, les cellules RAW 264.7 en co-culture avec soit les cellules 293 soit les cellules 293RL2.1 forment des cellules multinucléées. Etant donné que les cellules 293 n'expriment pas RANKL et que les cellules 293RL2.1 n'ont aucune localisation membranaire de RANKL, ces résultats mettent en évidence l'implication d'autres protéines cytokiniques sur la différenciation ostéoclastique. Les cytokines telles que le TNF α , l'IL-6, l'IL-1 et l'IL-11 sécrétées par les cellules du microenvironnement osseux (cellules stromales, lymphocytes...), sont capables d'induire une différenciation ostéoclastique et ce de manière indépendante de RANKL (Itonaga *et al.*, 2004 ; Kwan Tat *et al.*, 2004). Le TNF α peut, en présence de M-CSF (Macrophage-Colony Stimulating Factor), stimuler la formation d'ostéoclastes *via* un mécanisme impliquant les deux récepteurs spécifiques du TNF, TNFR1 et TNFR2 (Azuma *et al.*, 2000 ; Kobayashi *et al.*, 2000). 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). Enfin, 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⁺ du sang périphérique et ce, indépendamment de RANKL (Kudo *et al.*, 2003). Par conséquent, ces diverses cytokines pourraient être sécrétées par nos cellules 293 et 293RL2.1 et expliquer le mécanisme de formation ostéoclastique indépendamment de RANKL.

Des études portant sur l'efficacité de l'OPG en tant que molécule thérapeutique anti-résorptive ont été menées contre les maladies ostéolytiques telles que l'ostéoporose postmenopausale (Bekker *et al.*, 2001), le myélome multiple (Vanderkerken *et al.*, 2003), l'hypercalcémie humorale associée aux tumeurs (Capparelli *et al.*, 2000) et l'arthrite rhumatoïde (Romas *et al.*, 2002). Bien que la thérapie de l'OPG soit tout à fait efficace et encourageante, la diminution de l'OPG observée dans le milieu de culture des cellules exprimant RANKL soulève la question de sa biodisponibilité biologique lors de ces thérapies ostéolytiques quand RANKL est abondamment exprimé comme il a été récemment constaté dans le tissu synovial des patients atteints d'arthrite rhumatoïde (Takayanagi *et al.*, 2000). En outre, l'OPG est capable d'interagir avec une protéine TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand) et d'inhiber l'effet apoptotique de celle-ci sur les cellules cancéreuses (Fisher *et al.*, 2003, 2006). Dans ce contexte, l'OPG agit indirectement en tant que molécule activatrice de la progression tumorale. Des études supplémentaires devront donc être menées sur l'OPG afin de mieux comprendre cet effet pro-tumoral. D'autres approches thérapeutiques ont été réalisées. Ainsi, Bekker *et al.* (2004) ont démontré qu'un anticorps monoclonal contre RANKL (AMG 162) était un agent anti-résorptif efficace contre l'interaction RANK/RANKL. Lors de l'étude l'anticorps était bien toléré et ne possédait aucun événement défavorable. De plus, contrairement à l'OPG, l'anticorps anti-RANKL ne peut interagir avec TRAIL et ainsi l'apoptose des cellules cancéreuses sensibles à TRAIL n'est plus perturbée. Enfin, l'utilisation d'une 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 (Zhang *et al.*, 2003 ; Sordillo et Pearse, 2003). L'utilisation de ces molécules pourrait ainsi devenir un champ d'applications thérapeutiques futures contre la résorption osseuse.

En conclusion, les données actuelles démontrent que l'internalisation et la dégradation de l'OPG de même que la différenciation ostéoclastique, dépendent de la présence de RANKL membranaire et que pour une localisation membranaire de celle-ci, la présence d'un domaine intracellulaire de RANKL est indispensable. L'effet inhibiteur de l'OPG ne peut être uniquement expliqué en tant que récepteur de RANKL (inhibiteur de la fixation de RANK/RANKL) mais également en tant que modulateur de la demi-vie de RANKL.

RANKL3 de souris est une protéine soluble qui peut être produite par les ostéoblastes soit à la suite d'un épissage alternatif d'un même gène soit après un clivage protéolytique de RANKL ou de RANKL2. Les cellules 293 utilisées lors de cette étude ont été transfectées par une forme membranaire de RANKL. De ce fait, la formation de RANKL soluble par les cellules 293RL et 293RL2.0 ne peut s'expliquer que par l'intervention d'une ou de plusieurs protéases non encore déterminées. En absence de facteurs ostéotropiques, un taux basal moyen de RANKL soluble de $(3,6 \pm 0,8)$ et $(2,2 \pm 0,2)$ ng/ml a été déterminé respectivement dans les surnageants cellulaires des 293RL et 293RL2.0 après 24 heures d'incubation à 37°C. L'absence de RANKL soluble dans les surnageants des 293RL2.1 corrobore nos résultats et confirme ceux obtenus par Suzuki *et al.* (2004) montrant une absence de localisation membranaire de RANKL2 humaine et de RANKL2.1 ainsi qu'une absence de RANKL soluble dans le milieu extracellulaire.

Nous démontrons que la biodisponibilité de l'OPG exogène est influencée par l'expression de RANKL membranaire. RANKL membranaire pouvant être clivé pour libérer du RANKL soluble, la modulation d'un tel clivage interviendrait indirectement dans la modulation de la biodisponibilité de l'OPG exogène. La réduction de RANKL membranaire via ce clivage protéolytique permettrait de réduire l'internalisation de l'OPG par les cellules exprimant RANKL membranaire. En outre, il a été montré par Nakashima *et al.* (2000), que RANKL membranaire était plus efficace à induire l'ostéoclastogenèse comparé à sa forme soluble. La même observation a été constatée pour l'action du Fas ligand sur l'apoptose des cellules à savoir une activité plus importante pour la forme membranaire de Fas ligand comparé à sa forme soluble (Schneider *et al.*, 1998). De ce fait, l'importance d'un tel mécanisme de clivage protéolytique est essentielle dans la compréhension de la différenciation/activation ostéoclastique via l'implication directe de RANKL sous sa forme membranaire ou soluble dans le processus d'ostéoclastogenèse ainsi que dans la modulation de la biodisponibilité de l'OPG. Par conséquent, une étude sur le shedding de RANKL membranaire a été réalisée sur les cellules 293RL afin de mettre en évidence l'implication d'une ou de plusieurs protéases dans ce mécanisme enzymatique.

Un certain nombre de facteurs exercent leurs effets sur l'ostéoclastogénèse en régulant la production de RANKL et de l'OPG par les cellules stromales/ostéoblastiques. Ainsi, afin d'étudier la modulation de RANKL soluble produite exclusivement via un clivage protéolytique, des facteurs ostéotropiques et des activateurs de shedding cellulaires ont été testés sur les cellules 293RL. Si plusieurs des différents facteurs testés sont déjà connus dans la littérature pour leur capacité à réguler l'ostéoclastogenèse, leur effet sur le clivage de RANKL membranaire n'est par contre, pas déterminé. Parmi tous les facteurs utilisés au cours de notre étude, l'OSM, le TNF α et le PMA ont été identifiés comme étant capables d'augmenter significativement la production de RANKL soluble par les cellules 293RL et ce exclusivement via un clivage protéolytique. Un effet maximum a ainsi été obtenu en présence de PMA avec une augmentation de 3,6 fois comparée au contrôle sans facteur.

Concernant les deux cytokines, le TNF α et l'OSM, une stimulation d'environ 2 fois par rapport au contrôle sans facteur a été observée. Cette stimulation pour le TNF α et l'OSM est en accord avec les résultats obtenus par Nakashima *et al.* (2000) et Palmqvist *et al.* (2002). Le PMA qui est un phorbol ester est capable d'activer le clivage protéolytique de diverses protéines membranaires telles que le TNF- α , le récepteur à l'IL6, le TGF- α et le TNFR-I et -II (Huovila *et al.*, 2005). Par conséquent, l'activation du shedding cellulaire par le PMA pourrait expliquer l'augmentation de la production de RANKL soluble.

L'effet stimulateur du PMA sur la production de RANKL soluble est dose dépendante et une cinétique de libération de RANKL soluble met en évidence un effet rapide pour le PMA (2 heures). Ce temps rapide d'activation a aussi été constaté par Lee et Lorenzo (1999) qui ont montré que le PMA, par activation de la PKC, pouvait, au bout d'une heure, moduler le niveau d'expression des ARNm de RANKL dans des cellules de moëlle osseuse. Nous avons par conséquent, analysé le niveau d'expression du transcrit RANKL par RT-PCR semi-quantitative sur les cellules 293RL. On a pu ainsi noter une stimulation de (22 \pm 3,6) % de l'expression de l'ARNm RANKL par le PMA. Des résultats similaires à savoir un effet stimulateur du PMA sur l'ARNm RANKL ont aussi été obtenus sur des cellules ostéoblastiques et sur des cellules de moëlle osseuse (Takami *et al.*, 2000 ; Lee et Lorenzo, 2002). Cette stimulation de l'ARNm RANKL membranaire induirait une augmentation du substrat de l'enzyme responsable du clivage et de ce fait une augmentation de la production de RANKL soluble. Mais il n'est pas à exclure que la stimulation de la production de RANKL soluble soit due à une augmentation de l'activité protéasique d'un ou de plusieurs protéases responsables du clivage de RANKL membranaire.

Plusieurs études ont pu montrer que le PMA via la PKC stimule la voie des MAP kinases et plus spécifiquement la voie Erk/MAP kinase pour exercer son effet stimulateur (Park *et al.*, 2002). Néanmoins, il a aussi été démontré que le PMA via la PKC est capable d'activer le shedding cellulaire via une autre voie non encore déterminée (Weskamp *et al.*, 2004). Afin de caractériser la voie empruntée par le PMA pour le shedding de RANKL membranaire, nous avons utilisé un inhibiteur spécifique de la voie Erk, l'UO126. En présence de cet inhibiteur, nous observons une inhibition significative de l'effet stimulateur du PMA sur la production de RANKL soluble sans inhiber le taux basal, résultat similaire à celui obtenu par l'équipe de Schlöndorff *et al.* (2001). La voie Erk/MAP kinase semble donc impliquée dans la modulation de la production de RANKL soluble sous l'action du PMA.

Ce mécanisme de clivage protéolytique implique des métallosecrétases qui ont été largement cités pour leur aptitude à cliver des protéines membranaires (Hooper *et al.*, 1997). En effet, plusieurs protéines membranaires telles que le TGF- α , le TNF- α , le Fas ligand, les récepteurs aux TNF (TNFR-I et II) ainsi que le récepteur à l'IL-6 sont toutes clivées par des métallosecrétases (Huovila *et al.*, 2005). Nous avons utilisé un inhibiteur des métallosecrétases afin de mettre en évidence leur participation dans le mécanisme de shedding cellulaire de RANKL. En présence de TAPI-1 (Hooper *et al.*, 1997 ; Slack *et al.*, 2006) la production constitutive de RANKL soluble était inhibée de 70% par les cellules 293RL, ce qui démontre ainsi une forte implication des métalloprotéases dans le clivage de RANKL membranaire (Lum *et al.*, 1999). La production constitutive de RANKL soluble non inhibée par le TAPI-1 pourrait s'expliquer par la surexpression de RANKL membranaire par la cellule 293RL. En outre, l'utilisation de TAPI-1 dans notre étude n'a pas été suffisante pour inhiber totalement la libération de RANKL soluble. Enfin, il n'est pas à exclure que le clivage protéolytique de RANKL membranaire soit médié par des protéases autres que les métallosecrétases.

A ce jour, plusieurs protéases faisant partie de la famille des métalloprotéases ont été proposées pour leur capacité à cliver RANKL membranaire. Parmi les protéases citées, on trouve notamment la proposition de la TNF α Converting Enzyme (TACE) ou ADAM 17 (A Disintegrin And Metalloprotease 17) (Lum *et al.*, 1999), l'ADAM-19 (Chesneau *et al.*, 2003), la MT1-MMP (Schlondorff *et al.*, 2001 ; Hikita *et al.*, 2005) et plus récemment la MMP-7 (Lynch *et al.*, 2005). Si toutes ces protéases sont citées pour leur rôle dans le shedding cellulaire de RANKL, leur implication réelle reste cependant très controversée. En effet, Lum *et al.* (1999) ont démontré la participation de TACE dans le clivage de RANKL membranaire de souris sur des cellules COS-7 transfectées transitoirement par RANKL. La même équipe a ensuite proposé l'implication d'une nouvelle protéase autre que TACE (Schlondorff *et al.* 2001). En effet, sur des cellules CHO transfectées transitoirement par RANKL, la surexpression de la MT1-MMP serait responsable de l'augmentation de la production de RANKL soluble. De même, Hikita *et al.* (2005) ont aussi démontré une association entre le clivage de RANKL membranaire et l'augmentation de l'expression de la MT1-MMP. L'ADAM-19 a quant à elle été proposée par Chesneau *et al.* (2003) pour sa participation dans le clivage de RANKL membranaire. Ils ont pu constater, qu'en transfectant RANKL et ADAM-19 sur des cellules COS-7, la libération constitutive de RANKL était nettement supérieure par rapport aux cellules transfectées par une ADAM-19 inactive et mutée pour son domaine catalytique. Enfin, la MMP-7 a été récemment découverte pour son intervention dans le clivage de RANKL membranaire. En effet, Lynch *et al.* (2005), ont démontré que des cellules ostéoclastiques sont capables de sécréter la MMP-7 dans le milieu extracellulaire et que le clivage de RANKL exprimé sur les ostéoblastes était médié par la MMP-7.

Le shedding cellulaire est responsable du clivage protéolytique du domaine extracellulaire des protéines. Par conséquent, des protéases localisées plus particulièrement à la surface des cellules ont été étudiées. Ainsi, des protéases membranaires en particulier celles de la super famille des ADAMs et des MT-MMP ont été analysées sur les cellules 293 et 293RL. Cette analyse permet de vérifier si la transfection stable de RANKL membranaire de souris par les 293RL induit une augmentation de l'activité d'une ou de plusieurs protéases impliquées dans le shedding de RANKL. L'ARNm des cellules 293 et 293RL a été extrait et analysé pour l'expression de plusieurs transcrits des protéases les plus couramment citées pour le shedding cellulaire, à savoir la MT-1, 2, 3, 4 et 5 et ADAM- 9, 10, 17 et 19. Une absence d'expression de la MT1-MMP par les cellules 293RL a été observée, ce qui exclut dans notre modèle cellulaire, la proposition de l'implication de la MT1-MMP dans le clivage de RANKL membranaire. Par conséquent, la MT1-MMP ne serait pas l'unique protéase pouvant intervenir sur RANKL membranaire malgré les résultats de plusieurs équipes qui ont démontré un rôle potentiel de la MT1-MMP (Schlondorff *et al.*, 2001 ; Hikita *et al.*, 2005). Aucune modulation des transcrits des protéases étudiées n'a été constatée sur les 293 et 293RL à l'exception de la MT3-MMP pour laquelle nous observons une augmentation de son expression. Malgré la non modulation du transcrit TACE par les cellules 293 et 293RL, une analyse de l'expression de la protéine par Western Blot a démontré une expression plus importante de TACE dans les cellules 293RL comparée aux cellules non transfectées. Ainsi, l'augmentation de l'expression du mRNA MT3-MMP et de la protéine TACE pourrait éventuellement être impliquée dans la libération de RANKL soluble par les cellules 293RL.

La MT3-MMP est connue pour sa participation dans la progression tumorale en dégradant la matrice extracellulaire. En effet, la MT3-MMP est responsable de la dégradation du collagène de type II et III, la fibronectine, la laminine-1 et la vitronectine. De plus, elle est capable de cliver des protéines membranaires telles que le Syndecan-1, le CD44 et l' α -2 macroglobuline (Sounni et Noel, 2005). En ce qui concerne l'activité de TACE ou ADAM-17, plusieurs études ont pu montrer sa participation directe dans le clivage de nombreuses cytokines et de facteurs de croissance tels que le TNF- α , le TGF- α , la neuregulins ainsi que

des récepteurs tels que l'IL-1, l'IL6 et le TNFR-I et II (Huovila *et al.*, 2005). Cette grande diversité de substrats justifie son rôle crucial lors de l'inflammation et du développement de l'organisme (Peschon *et al.*, 1998 ; Mohammed *et al.*, 2004).

Afin d'appréhender l'implication de la MT3-MMP ainsi que de TACE dans le clivage de RANKL membranaire de souris, des séquences spécifiques dirigées contre la dégradation des transcrits MT3-MMP et TACE ont été utilisées. Les cellules 293RL sont transfectées par des séquences ShRNA (Short hairpin RNA) dirigées contre les transcrits MT3-MMP et TACE. Par la machinerie cellulaire, les ShRNA sont clivés par une RNase III cytoplasmique afin de libérer des séquences SiRNA (Small interfering RNA) responsables de la dégradation spécifique, en formant un complexe RISC (RNA-Induced Silencing Complex), des transcrits correspondants (Pekarik, 2005). De ce fait, l'absence d'expression de TACE ou de la MT3-MMP par la cellule 293RL induirait une inhibition de la production de RANKL soluble et mettrait en évidence une éventuelle implication de ces deux protéases dans le clivage protéolytique de RANKL membranaire.

Une inhibition de l'expression du mRNA MT3-MMP a été observée par RT-PCR ainsi qu'une inhibition de l'expression de la protéine TACE par Western Blot. Malgré l'inhibition de leur expression, on n'a pu mettre en évidence une éventuelle baisse du clivage protéolytique de RANKL membranaire. Au contraire, une augmentation significative de RANKL soluble a été constatée en présence de ShRNA MT3-MMP. Cet effet stimulateur de la production de RANKL soluble par les cellules 293RL en présence de ShRNA MT3-MMP peut s'expliquer soit par un effet non spécifique du ShRNA soit par un effet indirect de la MT3-MMP sur le clivage de RANKL membranaire. Par conséquent, l'expérience doit être reproduite en utilisant des séquences ShRNA autres que celles testées dans notre étude.

Notre hypothèse de départ à savoir une possible implication de TACE et de la MT3-MMP dans le shedding de RANKL membranaire dans les cellules 293RL n'a pu être affirmée. De plus, la surexpression de RANKL membranaire dans notre modèle mécanistique fait masquer une éventuelle inhibition de la production de RANKL soluble en présence de séquences ShRNA spécifiques. TACE qui a été largement étudiée et proposée comme étant une protéase pouvant médier un tel phénomène n'est pas la seule protéase impliquée. L'ADAM-19 et la MMP-7 ayant été aussi proposées pour intervenir dans le clivage de RANKL membranaire pourraient compenser l'inhibition de TACE ou de la MT3-MMP en présence de leur séquence ShRNA respective. Cette hypothèse pourrait également expliquer l'absence d'inhibition de la libération de RANKL soluble par les cellules 293RL. Par conséquent, une double transfection par des séquences ShRNA TACE ou MT3-MMP ou par des séquences codant pour soit l'ADAM-19 soit la MMP-7 pourrait être envisagée afin d'inhiber plus efficacement la production de RANKL soluble via le clivage protéolytique.

Via l'utilisation de séquences ShRNA codant pour soit ADAM-19 soit la MMP-7, leur importance dans le clivage protéolytique de RANKL membranaire devra être abordée afin d'affirmer les résultats des équipes suggérant un rôle potentiel de ces protéases dans l'activité enzymatique de libération de RANKL soluble (Chesneau *et al.*, 2003 ; Lynch *et al.*, 2005). Les résultats préliminaires obtenus sur le clivage de RANKL membranaire par les cellules 293RL sont très encourageants et restent à être approfondis. Des séquences ShRNA autres que celles utilisées, dirigées spécifiquement contre TACE et la MT3-MMP devront être reproduites sur l'effet du shedding de RANKL membranaire afin de confirmer les données obtenues au cours de notre étude.

CONCLUSION GENERALE

Si l'efficacité de l'OPG a été démontrée contre la résorption osseuse lors de pathologies ostéolytiques, cependant, son devenir après son administration reste très flou. L'ensemble de ce travail a permis de montrer que l'internalisation et la dégradation de l'OPG exogène de même que la différenciation ostéoclastique, dépendent de la présence de RANKL membranaire possédant un domaine intracellulaire. Nos résultats démontrent que l'OPG n'est pas seulement un récepteur leurre, inhibiteur de la fixation de RANKL sur RANK, mais qu'elle module également la demi-vie de RANKL.

RANKL est produite sous une forme soluble suite à un clivage protéolytique. Nous avons ainsi pu démontrer que des métalloprotéases sont majoritairement impliqués dans ce phénomène de clivage protéolytique dans notre modèle cellulaire n'exprimant pas la MT1-MMP. En outre, au vu de nos résultats, malgré l'augmentation de l'expression des enzymes TACE et MT3-MMP, on n'a pu confirmer leur implication dans la production de RANKL soluble par les cellules 293RL.

Les travaux ainsi réalisés s'inscrivent dans le cadre d'une meilleure compréhension de la triade moléculaire OPG/RANK/RANKL pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques.

BIBLIOGRAPHIE

Aarden EM, Burger EH, Nijweide PJ. Function of osteocytes in bone. *J Cell Biochem* 1994 ; 55 : 287-299

Akatsu T, Murakami T, Nishikawa M, Ono K, Shinomiya N, Tsuda E, Mochizuki S, Yamaguchi K, Kinoshita M, Higashio K, Yamamoto M, Motoyoshi K, Nagata N. Osteoclastogenesis inhibitory factor suppresses osteoclast survival by interfering in the interaction of stromal cells with osteoclast. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998. 250:229-34.

Alessio A, Al-Lamki RS, Bradley JR, Pober JS. Caveolae participate in tumor necrosis factor receptor 1 signaling and internalization in a human endothelial cell line. *Am J Pathol.* 2005. 166 :1273-82.

Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, Teepe MC, DuBose RF, Cosman D, Galibert L. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature.* 1997. 390:175-9.

Armstrong AP, Tometsko ME, Glaccum M, Sutherland CL, Cosman D, Dougall WC. A RANK/TRAF6-dependent signal transduction pathway is essential for osteoclast cytoskeletal organization and resorptive function. *J Biol Chem.* 2002. 277:44347-56.

Azuma Y, Kaji K, Katogi R, Takeshita S and Kudo A. Tumor necrosis factor-alpha induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts. *J Biol Chem* 2000. 275 : 4858-4864.

Baron R. L'ostéoclastes et les mécanismes moléculaire de la résorption osseuse. *Médecine/Sciences.* 2001, 12 :1260-1269.

Bataille R, Chappard D, Marcelli C, Dessauw P, Sany J, Baldet P, Alexandre C. Mechanisms of bone destruction in multiple myeloma: the importance of an unbalanced process in determining the severity of lytic bone disease. *J Clin Oncol.* 1989. 7:1909-14.

Bataille R, Manolagas SC, Berenson JR. Pathogenesis and management of bone lesions in multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1997. 11:349-61.

Bechet D, Tassa A, Taillandier D, Combaret L, Attaix D. Lysosomal proteolysis in skeletal muscle. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005. 37:2098-114.

Bekker PJ, Holloway D, Nakanishi A, Arrighi M, Leese PT and Dunstan CR. The effect of a single dose of osteoprotegerin in postmenopausal women. *J Bone Miner Res.* 2001. 16: 348-360.

Bekker PJ, Holloway DL, Rasmussen AS, Murphy R, Martin SW, Leese PT, Holmes GB, Dunstan CR, DePaoli AM. A single-dose placebo-controlled study of AMG 162, a fully human monoclonal antibody to RANKL, in postmenopausal women. *J Bone Miner Res.* 2004. 19:1059-66.

Benmerah A, Lamaze C. Endocytose : chaque voie compte! *Medecine/Sciences.* 2002. 18 :1126-36.

- Bernfield M, Sanderson RD.** Syndecan, a developmentally regulated cell surface proteoglycan that binds extracellular matrix and growth factors. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1990. 327:171-86.
- Bernfield M, Kokenyesi R, Kato M, Hinkes MT, Spring J, Gallo RL, Lose EJ.** Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Cell Biol.* 1992. 8:365-93.
- Bi Y, Stuelten CH, Kilts T, Wadhwa S, Iozzo RV, Robey PG, Chen XD, Young MF.** Extracellular matrix proteoglycans control the fate of bone marrow stromal cells. *J Biol Chem.* 2005. 280:30481-9.
- Bianco P, Fisher LW, Young MF, Termine JD, Robey PG.** Expression and localization of the two small proteoglycans biglycan and decorin in developing human skeletal and non-skeletal tissues. *J Histochem Cytochem.* 1990. 38:1549-63.
- Birch MA, Skerry TM.** Differential regulation of syndecan expression by osteosarcoma cell lines in response to cytokines but not osteotropic hormones. *Bone.* 1999. 24:571-8.
- Boissy P, Malaval L, Jurdic P.** Ostéoblastes et ostéoclastes : une coopération exemplaire entre cellules mésenchymateuses et cellules hématopoïétiques. *Hématologie.* 2000. 1:6-16.
- Borset M, Hjertner O, Yaccoby S, Epstein J, Sanderson RD.** Syndecan-1 is targeted to the uropods of polarized myeloma cells where it promotes adhesion and sequesters heparin-binding proteins. *Blood.* 2000. 96:2528-36.
- Brandstrom H, Bjorkman T, Ljunggren O.** Regulation of osteoprotegerin secretion from primary cultures of human bone marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001. 280:831-5.
- Brew K, Dinakarandian D, Nagase H.** Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta.* 2000. 1477:267-83.
- Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R.** A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science.* 2002. 296:550-3.
- Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS.** Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev.* 1998. 12:1260-8.
- Capparelli C, Kostenuik PJ, Morony S, Starnes C, Weimann B, Van G, Scully S, Qi M, Lacey DL, Dunstan CR.** Osteoprotegerin prevents and reverses hypercalcemia in a murine model of humoral hypercalcemia of malignancy. *Cancer Res.* 2000. 60:783-7.
- Cappellen D, Luong-Nguyen NH, Bongiovanni S, Grenet O, Wanke C, Susa M.** Transcriptional program of mouse osteoclast differentiation governed by the macrophage colony-stimulating factor and the ligand for the receptor activator of NFkappa B. *J Biol Chem.* 2002. 277:21971-82.

Chesneau V, Becherer JD, Zheng Y, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Blobel CP. Catalytic properties of ADAM19. *J Biol Chem.* 2003. 278:22331-40.

Chomczynski P, Mackey K. Short technical reports. Modification of the TRI reagent procedure for isolation of RNA from polysaccharide and proteoglycan-rich sources. *Biotechniques.* 1995;19:942-5.

Collin-Osdoby P, Rothe L, Anderson F, Nelson M, Maloney W, Osdoby P. 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.* 2001. 276:20659-72.

Darnay BG, Haridas V, Ni J, Moore PA, Aggarwal BB. Characterization of the intracellular domain of receptor activator of NF-kappaB (RANK). Interaction with tumor necrosis factor receptor-associated factors and activation of NF-kappaB and c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem.* 1998. 273:20551-5.

Darnay BG, Ni J, Moore PA, Aggarwal BB. Activation of NF-kappaB by RANK requires tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 6 and NF-kappaB-inducing kinase. Identification of a novel TRAF6 interaction motif. *J Biol Chem.* 1999. 274:7724-31.

Doherty FJ, Dawson S, Mayer RJ. The ubiquitin-proteasome pathway of intracellular proteolysis. *Essays Biochem.* 2002. 38:51-63.

Dykxhoorn DM, Novina CD, Sharp PA. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003.4:457-67.

Emery JG, McDonnell P, Burke MB, Deen KC, Lyn S, Silverman C, Dul E, Appelbaum ER, Eichman C, DiPrinzio R, Dodds RA, James IE, Rosenberg M, Lee JC and Young PR. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J. Biol. Chem.* 1998. 273: 14363-67.

Falguieres T, Mallard F, Baron C, Hanau D, Lingwood C, Goud B, Salamero J, Johannes L. Targeting of Shiga toxin B-subunit to retrograde transport route in association with detergent-resistant membranes. *Mol Biol Cell.* 2001. 12:2453-68.

Fisher LW, Termine JD, Young MF. Deduced protein sequence of bone small proteoglycan I (biglycan) shows homology with proteoglycan II (decorin) and several nonconnective tissue proteins in a variety of species. *J Biol Chem.* 1989. 264:4571-6.

Fisher JL, Thomas-Mudge RJ, Elliott J, Hards DK, Sims NA, Slavin J, Martin TJ, Martin TJ, Gillespie MT. Fc-OPG osteoclast activity while tumor-derived OPG enhances tumor growth [abstract]. *J Bone Miner Res.* 2003. 18:S63.

Fisher JL, Thomas-Mudge RJ, Elliott J, Hards DK, Sims NA, Dunstan CR, Slavin J, Martin TJ, Gillespie MT. Osteoprotegerin overexpression by breast cancer cells enhances orthotopic and osseous tumor growth and contrasts with that delivered therapeutically. *Cancer Res.* 2006. 66:3620-8.

Franz-Odendaal TA, Hall BK, Witten PE. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn.* 2006. 235:176-90.

Galibert L, Tometsko ME, Anderson DM, Cosman D, Dougall WC. The involvement of multiple tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factors in the signaling mechanisms of receptor activator of NF-kappaB, a member of the TNFR superfamily. *J Biol Chem.* 1998. 273:34120-7.

Gao YH, Shinki T, Yuasa T, Kataoka-Enomoto H, Komori T, Suda T, Yamaguchi A. 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.* 1998. 252:697-702.

Giuliani N, Bataille R, Mancini C, Lazzaretti M, Barille S. Myeloma cells induce imbalance in the osteoprotegerin/osteoprotegerin ligand system in the human bone marrow environment. *Blood.* 2001. 98:3527-33.

Goldberg AL, Cascio P, Saric T, Rock KL. The importance of the proteasome and subsequent proteolytic steps in the generation of antigenic peptides. *Mol Immunol.* 2002. 39:147-64.

Grant DS, Yenisey C, Rose RW, Tootell M, Santra M, Iozzo RV. Decorin suppresses tumor cell-mediated angiogenesis. *Oncogene.* 2002. 21:4765-77.

Greene J, Wang M, Liu YE, Raymond LA, Rosen C, Shi YE. Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *J Biol Chem.* 1996. 271:30375-80.

Grimaud E, Soubigou L, Couillaud S, Coipeau P, Moreau A, Passuti N, Guin F, Redini F, Heymann D. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL)/osteoprotegerin (OPG) ratio is increased in severe osteolysis. *Am J Pathol.* 2003. 163:2021-31.

Ha H, Kwak HB, Lee SK, Na DS, Rudd CE, Lee ZH and Kim HH. Membrane rafts play a crucial role in receptor activator of nuclear factor κ B signaling and osteoclast function. *J Biol Chem* 2003. 278: 18573-18580.

Haas AL, Siepmann TJ. Pathways of ubiquitin conjugation. *FASEB J.* 1997. 11:1257-68.

Hakeda Y, Kobayashi Y, Yamaguchi K, Yasuda H, Tsuda E, Higashio K, Miyata T, Kumegawa M. Osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) directly inhibits bone-resorbing activity of isolated mature osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998. 251:796-801.

Hattersley G, Chambers TJ. Generation of osteoclasts from hemopoietic cells and a multipotential cell line in vitro. *J Cell Physiol.* 1989. 140:478-82.

Heymann D, Ory B, Guin F, Green JR, and Rédini F. Bisphosphonates: new therapeutic agents for the treatment of bone tumors. *Trends Mol Med* 2004. 10: 337-343.

Heymann D, Fortun Y, Rédini F, and Padrines M. Osteolytic bone diseases : physiological analogues of bone resorption effectors as alternative therapeutic tools. *Drug Discov Today* 2005. 10: 242-247.

Hikita A, Kadono Y, Chikuda H, Fukuda A, Wakeyama H, Yasuda H, Nakamura K, Oda H, Miyazaki T, Tanaka S. Identification of an alternatively spliced variant of Ca²⁺-promoted Ras inactivator as a possible regulator of RANKL shedding.. *J Biol Chem*. 2005. 280:41700-6.

Hildebrand A, Romaris M, Rasmussen LM, Heinegard D, Twardzik DR, Border WA, Ruoslahti E. Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta. *Biochem J*. 1994. 302:527-34.

Hill PA. Bone remodelling. *Br J Orthod*. 1998. 25:101-7.

Hofbauer LC, Dunstan CR, Spelsberg TC, Riggs BL, Khosla S. Osteoprotegerin production by human osteoblast lineage cells is stimulated by vitamin D, bone morphogenetic protein-2, and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998. 250:776-81.

Hofbauer LC, Gori F, Riggs BL, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, Khosla S. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrinology*. 1999. 140:4382-9.

Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res*. 2000. 15:2-12.

Hooper NM, Karran EH, Turner AJ. Membrane protein secretases. *Biochem J*. 1997. 321:265-79.

Horowitz MC, Xi Y, Wilson K, and Kacena MA. Control of osteoclastogenesis and bone resorption by members of the TNF family of receptors and ligands. *Cytokine and Growth Factor Rev* 2001. 12: 9-18.

Hosford GE, Fang X, Olson DM. Hyperoxia decreases matrix metalloproteinase-9 and increases tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 protein in the newborn rat lung: association with arrested alveolarization. *Pediatr Res*. 2004. 56:26-34.

Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, Solovyev I, Colombero A, Timms E, Tan HL, Elliott G, Kelley MJ, Sarosi I, Wang L, Xia XZ, Elliott R, Chiu L, Black T, Scully S, Capparelli C, Morony S, Shimamoto G, Bass MB, Boyle WJ. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999. 96:3540-5.

Huang JC, Sakata T, Pflieger LL, Bencsik M, Halloran BP, Bikle DD, Nissenson RA. PTH differentially regulates expression of RANKL and OPG. *J Bone Miner Res*. 2004. 19:235-44.

Huovila AP, Turner AJ, Peltto-Huikko M, Karkkainen I, Ortiz RM. Shedding light on ADAM metalloproteinases. *Trends Biochem Sci.* 2005. 30:413-22.

Iida J, Pei D, Kang T, Simpson MA, Herlyn M, Furcht LT, McCarthy JB. Melanoma chondroitin sulfate proteoglycan regulates matrix metalloproteinase-dependent human melanoma invasion into type I collagen. *J Biol Chem.* 2001.276:18786-94.

Ikeda T, Kasai M, Utsuyama M, Hirokawa K. Determination of three isoforms of the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and their differential expression in bone and thymus. *Endocrinology.* 2001. 142:1419-26.

Ikeda T, Kasai M, Suzuki J, Kuroyama H, Seki S, Utsuyama M, Hirokawa K. Multimerization of the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) isoforms and regulation of osteoclastogenesis. *J Biol Chem.* 2003. 278:47217-22.

Inaba K, Inaba M. Antigen recognition and presentation by dendritic cells. *Int J Hematol.* 2005. 81:181-7.

Iqbal J, Zaidi M. Molecular regulation of mechanotransduction. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;328:751-5.

Itonaga I, Sabokbar A, Sun SG, Kudo O, Danks L, Ferguson D, Fujikawa Y, Athanasou NA. Transforming growth factor-beta induces osteoclast formation in the absence of RANKL. *Bone.* 2004. 34:57-64.

Jiang A, Lethi K, Wang X, Weiss SJ, Keski-Oja J, and Pei D. Regulation of membrane-type matrix metalloproteinase 1 activity by dynamin-mediated endocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001. 98: 13693-13698.

Jimi E, Akiyama S, Tsurukai T, Okahashi N, Kobayashi K, Udagawa N, Nishihara T, Takahashi N, Suda T. Osteoclast differentiation factor acts as a multifunctional regulator in murine osteoclast differentiation and function. *J Immunol.* 1999.163:434-42.

Kanamaru F, Iwai H, Ikeda T, Nakajima A, Ishikawa I, Azuma M. Expression of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) in human T cells. *Immunol Lett.* 2004. 94:239-46.

Karsenty G. The genetic transformation of bone biology. *Genes Dev.* 1999. 13:3037-51.

Karsenty G. Minireview: transcriptional control of osteoblast differentiation. *Endocrinology.* 2001. 142:2731-3.

Kartsogiannis V, Zhou H, Horwood NJ, Thomas RJ, Hards DK, Quinn JMW, Niforas P, Ng KW, Martin TJ and Gillespie MT. Localization of RANKL (Receptor Activator of NF κ B Ligand) mRNA and protein in skeletal and extraskeletal tissues. *Bone.* 1999. 25: 525-34.

Kim CW, Goldberger OA, Gallo RL, Bernfield M. Members of the syndecan family of heparan sulfate proteoglycans are expressed in distinct cell-, tissue-, and development-specific patterns. *Mol Biol Cell.* 1994. 5:797-805.

Kim HH, Lee DE, Shin JN, Lee YS, Jeon YM, Chung CH, Ni J, Kwon BS, Lee ZH. Receptor activator of NF-kappaB recruits multiple TRAF family adaptors and activates c-Jun N-terminal kinase. *FEBS Lett.* 1999. 443:297-302.

Kjellen L, Lindahl U. Proteoglycans: structures and interactions. *Annu Rev Biochem.* 1991. 60:443-75.

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 TJ and Suda T. Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *J Exp Med.* 2000. 191 : 275-286.

Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, Morony S, Oliveira-dos-Santos AJ, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR, Lacey DL, Mak TW, Boyle WJ, Penninger JM. OPG is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature.* 1999. 397:315-23.

Krueger KM, Daaka Y, Pitcher JA, Lefkowitz RJ. The role of sequestration in G protein-coupled receptor resensitization. Regulation of beta2-adrenergic receptor dephosphorylation by vesicular acidification. *J Biol Chem.* 1997. 272:5-8.

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

Kwan Tat S, Padrines M, Theoleyre S, Couillaud-Battaglia S, Heymann D, Redini F and Fortun Y. OPG/membranous-RANKL complex is internalized *via* the clathrin pathway before a lysosomal and a proteasomal degradation. *Bone, Mars* 2006 (Sous presse)

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

Kurzchalia TV, Parton RG. Membrane microdomains and caveolae. *Curr Opin Cell Biol.* 1999. 11:424-31.

Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell.* 1998. 93:165-76.

Lam J, Nelson CA, Ross FP, Teitelbaum SL, Fremont DH. Crystal structure of the TRANCE/RANKL cytokine reveals determinants of receptor-ligand specificity. *J Clin Invest.* 2001. 108:971-9.

Lamaze C, Dujeancourt A, Baba T, Lo CG, Benmerah A, Dautry-Varsat A. Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Mol Cell.* 2001. 7:661-71.

- Lee ZH, and Kim HH.** Signal transduction by receptor of nuclear factor kappa B in osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2003. 305: 211-214.
- Lee SK, Lorenzo JA.** Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acid expression in murine bone marrow cultures: correlation with osteoclast-like cell formation. *Endocrinology*. 1999. 140:3552-61.
- Lee SK., Lorenzo JA.** Regulation of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand and osteoprotegerin mRNA expression by parathyroid hormone is predominantly mediated by the protein kinase A pathway in murine bone marrow cultures. *Bone*. 2002. 31:252-9.
- Lehti K, Valtanen H, Wickstrom S, Lohi J, and Keski-Oja J.** Regulation of membrane-type-1 matrix metalloproteinase activity by its cytoplasmic domain. *J Biol Chem* 2000. 275: 15006-15013.
- Le PU, Guay G, Altschuler Y, Nabi IR.** Caveolin-1 is a negative regulator of caveolae-mediated endocytosis to the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 2002. 277:3371-9.
- Li J, Sarosi I, Yan XQ, Morony S, Capparelli C, Tan HL, McCabe S, Elliott R, Scully S, Van G, Kaufman S, Juan SC, Sun Y, Tarpley J, Martin L, Christensen K, McCabe J, Kostenuik P, Hsu H, Fletcher F, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ.** 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*. 2000. 97:1566-71.
- Li HS, Stolz DB, Romero G.** Characterization of endocytic vesicles using magnetic microbeads coated with signalling ligands. *Traffic*. 2005. 6:324-34.
- Liu W, Xu D, Yang H, Xu H, Shi Z, Cao X, Takeshita S, Liu J, Teale M, Feng X.** Functional identification of three receptor activator of NF-kappa B cytoplasmic motifs mediating osteoclast differentiation and function. *J Biol Chem*. 2004. 279:54759-69.
- Llorente A, Prydk K, Sprangers M, Skretting G, Kolset SO, and Sandvig K.** Proteoglycan synthesis is increased in cells with impaired clathrin-dependent endocytosis. *J Cell Sci* 2001. 114: 335-343.
- Lobie PE, Sadir R, Graichen R, Mertani HC, Morel G.** Caveolar internalization of growth hormone. *Exp Cell Res*. 1999. 246:47-55.
- Luger NM, Honore P, Sabino MA, Schwei MJ, Rogers SD, Mach DB, Clohisy DR, Mantyh PW.** Osteoprotegerin diminishes advanced bone cancer pain. *Cancer Res*. 2001. 61:4038-47.
- Lum L, Wong BR, Josien R, Becherer JD, Erdjument-Bromage H, Schlondorff J, Tempst P, Choi Y, Blobel CP.** Evidence for a role of a tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-converting enzyme-like protease in shedding of TRANCE, a TNF family member involved in osteoclastogenesis and dendritic cell survival. *J Biol Chem*. 1999. 274:13613-8.

Lynch CC, Hikosaka A, Acuff HB, Martin MD, Kawai N, Singh RK, Vargo-Gogola TC, Begtrup JL, Peterson TE, Fingleton B, Shirai T, Matrisian LM, Futakuchi M. MMP-7 promotes prostate cancer-induced osteolysis via the solubilization of RANKL. *Cancer Cell*. 2005. 7:485-96.

Machwate M, Zerath E, Holy X, Hott M, Godet D, Lomri A, Marie PJ. Systemic administration of transforming growth factor-beta 2 prevents the impaired bone formation and osteopenia induced by unloading in rats. *J Clin Invest*. 1995. 96:1245-53.

Malaval L, Chenu C, Delmas P.D. Protéine de l'os : Maladies systémiques osseuses de l'adulte. D. Kuntz, édition Flammarion. 1996. 17-35.

Marie PJ. Fibroblast growth factor signaling controlling osteoblast differentiation. *Gene*. 2003. 316:23-32.

Marie PJ Human osteoblastic cells: a potential tool to assess the etiology of pathologic bone formation. *J Bone Miner Res*. 1994. 9:1847-50.

Martinez-Vicente M, Sovak G, Cuervo AM. Protein degradation and aging. *Exp Gerontol*. 2005. 40:622-33.

Massova I, Kotra LP, Fridman R, Mobashery S J. Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *FASEB*. 1998. 12:1075-95.

Matsumoto S, Katoh M, Saito S, Watanabe T, Masuho Y. Identification of soluble type of membrane-type matrix metalloproteinase-3 formed by alternatively spliced mRNA. *Biochim Biophys Acta*. 1997. 1354:159-70.

Min H, Morony S, Sarosi I, Dunstan CR, Capparelli C, Scully S, Van G, Kaufman S, Kostenuik PJ, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS. Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis. *J Exp Med*. 2000. 192:463-74.

Min JK, Kim YM, Kim EC, Gho YS, Kang IJ, Lee SY, Kong YY, Kwon YG. 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*. 2003. 278:39548-57.

Mohammed FF, Smookler DS, and Khokha R. Metalloproteinases, inflammation, and rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2003;62: 43-47.

Mohammed FF, Smookler DS, Taylor SE, Fingleton B, Kassiri Z, Sanchez OH, English JL, Matrisian LM, Au B, Yeh WC, Khokha R. Abnormal TNF activity in Timp3^{-/-} mice leads to chronic hepatic inflammation and failure of liver regeneration. *Nat Genet*. 2004 36:934-5.

Mosheimer BA, Kaneider NC, Feistritz C, Djanani AM, Sturn DH, Patsch JR, Wiedermann CJ. Syndecan-1 is involved in osteoprotegerin-induced chemotaxis in human peripheral blood monocytes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005. 90:2964-71.

- Moss ML, White JM, Lambert MH, Andrews RC.** Tace and other ADAM proteases as targets for drug discovery. *Drug Discovery Today*. 2001. 6:417-426.
- Murphy G, Knauper V.** Relating matrix metalloproteinase structure to function: why the "hemopexin" domain? *Matrix Biol*. 1997. 15:511-8.
- Murphy G, Lee MH.** What are the roles of metalloproteinases in cartilage and bone damage? *Ann Rheum Dis*. 2005. 64:44-7.
- Nagase H, Woessner JF.** Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*. 1999. 274:21491-4.
- Nakagawa N, Kinoshita M, Yamaguchi K, Shima N, Yasuda H, Yano K, Morinaga T, Higashio K.** RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998. 253:395-400.
- Nakano K, Okada Y, Saito K, Tanaka Y.** Induction of RANKL expression and osteoclast maturation by the binding of fibroblast growth factor 2 to heparan sulfate proteoglycan on rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum*. 2004. 50:2450-8.
- Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, Kawakami A, Eguchi K, Sasaki H, Sakai H.** 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*. 2000. 275:768-75.
- Neame PJ, Choi HU, Rosenberg LC.** The primary structure of the core protein of the small, leucine-rich proteoglycan (PG I) from bovine articular cartilage. *J Biol Chem*. 1989. 264:8653-61.
- Ohuchi E, Imai K, Fujii Y, Sato H, Seiki M, Okada Y.** Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *J Biol Chem*. 1997. 272:2446-51.
- Orlandi PA, Fishman PH.** Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains. *J Cell Biol*. 1998. 141:905-15.
- Ortho MP, Will H, Atkinson S, Butler G, Messent A, Gavrilovic J, Smith B, Timpl R, Zardi L, Murphy G.** Membrane-type matrix metalloproteinases 1 and 2 exhibit broad-spectrum proteolytic capacities comparable to many matrix metalloproteinases. *Eur J Biochem*. 1997. 50:751-7.
- Owen M.** Marrow stromal stem cells. *J. Cell. Sci*. 1988. 10:63-76.
- Owen TA, Bortell R, Yocum SA, Smock SL, Zhang M, Abate C, Shalhoub V, Aronin N, Wright KL, van Wijnen AJ.** 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*. 1990. 87:9990-4.

Pacifici R. Cytokines, estrogen, and postmenopausal osteoporosis--the second decade. *Endocrinology*. 1998. 139:2659-61.

Palmqvist P, Persson E, Conaway HH, Lerner UH. IL-6, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M stimulate bone resorption and regulate the expression of receptor activator of NF-kappa B ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF-kappa B in mouse calvariae. *J Immunol*. 2002. 169:3353-62.

Park MJ, Park IC, Hur JH, Kim MS, Lee HC, Woo SH, Lee KH, Rhee CH, Hong SI, Lee SH. Modulation of phorbol ester-induced regulation of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases by SB203580, a specific inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Neurosurg*. 2002. 97:112-8.

Pei D, Weiss S, Transmembrane-deletion mutants of the membrane-type matrix metalloproteinase-1 process progelatinase A and express intrinsic matrix-degrading activity. *J. Biol. Chem*. 1996. 271:9135-40.

Pekarik V. Design of shRNAs for RNAi-A lesson from pre-miRNA processing: possible clinical applications. *Brain Res Bull*. 2005. 68:115-20.

Peschon JJ, Slack JL, Reddy P, Stocking KL, Sunnarborg SW, Lee DC, Russell WE, Castner BJ, Johnson RS, Fitzner JN, Boyce RW, Nelson N, Kozlosky CJ, Wolfson MF, Rauch CT, Cerretti DP, Paxton RJ, March CJ, Black RA. An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science*. 1998. 282:1281-4.

Peter R, Mishra V, and Fraser WD. Severe hypocalcemia after being given intravenous bisphosphonate. 2004. *B M J* 328: 335-336.

Pfister T, Atzpodien E, and Bauss F. The renal effects of minimally nephrotoxic doses of ibandronate and zoledronate following single and intermittent intravenous administration in rats. *Toxicology* 2000. 191: 159-167.

Prydz K, Dalen KT. Synthesis and sorting of proteoglycans. *J Cell Sci*. 2000. 2:193-205.

Puri C, Tosoni D, Comai R, Rabellino A, Segat D, Caneva F, Luzzi P, Di Fiore PP, Tacchetti C. Relationships between EGFR signaling-competent and endocytosis-competent membrane microdomains. *Mol Biol Cell*. 2005. 16:2704-18.

Remacle A, Murphy G, and Roghi C. Membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) is internalized by two different pathways and recycled to the cell surface. *J Cell Sci* 2003. 116: 3905-3916.

Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorova A. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol*. 2004. 22:326-30.

Romas E, Sims NA, Hards DK, Lindsay M, Quinn JW, Ryan PF, Dustan CR, Martin TJ, and Gillespie MT. Osteoprotegerin reduces osteoclast numbers and prevents bone erosion in collagen-induced arthritis. *Am J Pathol* 2002. 161: 1419-1427.

- Roodman GD.** Advances in bone biology: the osteoclast. *Endocr Rev* 1996;17:308-332.
- Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, Anderson RG.** Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell*. 1992.68:673-82.
- Rousselle AV, Heymann D.** Osteoclastic acidification pathways during bone resorption. *Bone*. 2002. 30:533-40.
- Roux S, Meignin V, Quillard J, Meduri G, Guiochon-Mantel A, Femand JP, Milgrom E, Mariette X.** RANK (receptor activator of nuclear factor-kappaB) and RANKL expression in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2002;117:86-92.
- Ruoslahti E.** Structure and biology of proteoglycans. *Annu Rev Cell Biol*. 1988. 4:229-55.
- Saika M, Inoue D, Kido S, Matsumoto T.** 17beta-estradiol stimulates expression of osteoprotegerin by a mouse stromal cell line, ST-2, via estrogen receptor-alpha. *Endocrinology*. 2001. 142:2205-12.
- Sato H, Kinoshita T, Takino T, Nakayama K, Seiki M.** Activation of a recombinant membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) by furin and its interaction with tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-2). *FEBS Let*. 1996. 393:101-4.
- Saunders S, Jalkanen M, O'Farrell S, Bernfield M.** Molecular cloning of syndecan, an integral membrane proteoglycan. *J Cell Biol*. 1989. 108:1547-56.
- Schlondorff J, Lum L, Blobel CP.** Biochemical and pharmacological criteria define two shedding activities for TRANCE/OPGL that are distinct from the tumor necrosis factor alpha convertase. *J Biol Chem*. 2001. 276:14665-74.
- Schneeweis LA, Willard D, Milla ME.** Functional dissection of osteoprotegerin and its interaction with RANK-L. *J Biol Chem*. 2005. 280:41155-64.).
- Schneider P, Holler N, Bodmer JL, Hahne M, Frei K, Fontana A, Tschopp J.** Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *J Exp Med*. 1998. 187:1205-13.
- Seals DF, Courtneidge SA.** The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev*. 2003. 17:7-30.
- Seiki M.** Membrane-type matrix metalloproteinases. *APMIS*. 1999. 107:137-43.
- Seufert W, Futcher B, Jentsch S.** Role of a ubiquitin-conjugating enzyme in degradation of S- and M-phase cyclins. *Nature*. 1995. 373:78-81.
- Shajahan AN, Tirupathi C, Smrcka AV, Malik AB, Minshall RD.** Gbetagamma activation of Src induces caveolae-mediated endocytosis in endothelial cells. *J Biol Chem*. 2004. 279:48055-62.

Shalhoub V, Faust J., Boyle WJ., Dunstan CR., Kelly M., Kaufman S., Scully S., Van G., Lancey DL. Osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand effects on osteoclast formation from human peripheral blood mononuclear cell precursors. *J Cell Biochem* 1999;72:251-261.

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Amgen EST Program and Boyle WJ. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 1997. 89:309-19.

Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2000 Oct;1(1):31-9. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001. 2:216.

Slack BE, Siniatia MS, Blusztajn JK. Collagen type I selectively activates ectodomain shedding of the discoidin domain receptor 1: involvement of Src tyrosine kinase. *J Cell Biochem*. 2006. 98:672-84.

Sordillo EM, Pearse RN. RANK-Fc: a therapeutic antagonist for RANK-L in myeloma. *Cancer*. 2003. 97:802-12.

Sounni NE, Noel A. Membrane type-matrix metalloproteinases and tumor progression. *Biochimie*. 2005. 87:329-42.

Srivastava S, Matsuda M, Hou Z, Bailey JP, Kitazawa R, Herbst MP, Horseman ND. Receptor activator of NF-kappaB ligand induction via Jak2 and Stat5a in mammary epithelial cells. *J Biol Chem*. 2003. 278:46171-8.

Standal T, Seidel C, Hjertner O, Plesner T, Sanderson RD, Waage A, Borset M, Sundan A. Osteoprotegerin is bound, internalized, and degraded by multiple myeloma cells. *Blood*. 2002. 100:3002-7.

Steinfeld R, Van Den Berghe H, David G. Stimulation of fibroblast growth factor receptor-1 occupancy and signaling by cell surface-associated syndecans and glypican. *J Cell Biol*. 1996. 133:405-16.

Suda T, Takahashi N, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation. *Endocr Rev*. 1992. 13:66-80.

Suzuki J, Ikeda T, Kuroyama H, Seki S, Kasai M, Utsuyama M, Tatsumi M, Uematsu H, Hirokawa K. Regulation of osteoclastogenesis by three human RANKL isoforms expressed in NIH3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004. 314:1021-7.

Takami M., Takahashi N., Udagawa N., Miyaura C., Suda K., Woo JT., Martin TJ., Nagai K., Suda T. Intracellular calcium and protein kinase C mediate expression of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in osteoblasts. *Endocrinology*. 2000. 141:4711-9.

- Takayanagi H, Lizuka H, Juji T, Nakagawa T, Yamamoto A, Miyazaki T, Koshihara Y, Oda H, Nakamura K, and Tanaka S.** Involvement of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand/osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis from synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000. 43: 259-269.
- Takeuchi Y, Kodama Y, Matsumoto T.** Bone matrix decorin binds transforming growth factor-beta and enhances its bioactivity. *J Biol Chem.* 1994. 269:32634-8.
- Tejedor F, and Ballesta JP.** Reaction of some macrolide antibiotics with the ribosome. Labeling of the binding site components. *Biochemistry* 1986; 25: 7725-7731.
- Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK, Fortun Y, Redini F, Heymann D.** The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004a. 15:457-75.
- Theoleyre S, Wittrant Y, Couillaud S, Vusio P, Berreur M, Dunstan C, Blanchard F, Redini F, Heymann D.** Cellular activity and signaling induced by osteoprotegerin in osteoclasts: involvement of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and MAPK. *Biochim Biophys Acta.* 2004b. 1644:1-7.
- Theoleyre S., Kwan Tat S., Vusio P., Blanchard F., Gallagher J., Ricard-Blum S., Fortun Y., Padrines M., Rédini F., Heymann D.** Characterization of osteoprotegerin binding to glycosaminoglycans by surface plasmon resonance: role in the interactions with Receptor Activator of Nuclear Factor kB Ligand (RANKL) and RANK *Biochem Biophys Res Com.* 2006. (Sous presse)
- Thirunavukkarasu K, Miles RR, Halladay DL, Yang X, Galvin RJ, Chandrasekhar S, Martin TJ, Onyia JE.** 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.* 2001. 276:36241-50.
- Thomsen P, Roepstorff K, Stahlhut M, van Deurs B.** Caveolae are highly immobile plasma membrane microdomains, which are not involved in constitutive endocytic trafficking. *Mol Biol Cell.* 2002.13:238-50.
- Trejo J, Coughlin SR.** The cytoplasmic tails of protease-activated receptor-1 and substance P receptor specify sorting to lysosomes versus recycling. *J Biol Chem.* 1999. 274:2216-24.
- Turner CH, Pavalko FM.** Mechanotransduction and functional response of the skeleton to physical stress: the mechanisms and mechanics of bone adaptation. *J Orthop Sci.* 1998.3:346-55.
- Uekita T, Itoh Y, Yana I, Ohno H, and Seiki M.** Cytoplasmic tail-dependent internalization of membrane-type 1 matrix metalloproteinase is important for its invasion-promoting activity. *J Cell Biol.* 2001. 155: 1345-1356.
- Vanderkerken K, De Leenheer E, Shipman C, Asosingh K, Willems A, Van Camp B, and Croucher P.** Recombinant osteoprotegerin decreases tumor burden and increases survival in a murine model of multiple myeloma. *Cancer Res* 2003. 63: 287-289.

- Visse R, Nagase H.** Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 2003. 92:827-39.
- Vlodavsky I, Bar-Shavit R, Ishai-Michaeli R, Bashkin P, Fuks Z.** Extracellular sequestration and release of fibroblast growth factor: a regulatory mechanism? *Trends Biochem Sci.* 1991. 16:268-71.
- Vrecl M, Anderson L, Hanyaloglu A, McGregor AM, Groarke AD, Milligan G, Taylor PL, Eidne KA.** Agonist-induced endocytosis and recycling of the gonadotropin-releasing hormone receptor: effect of beta-arrestin on internalization kinetics. *Mol Endocrinol.* 1998. 12:1818-29.
- Weskamp G, Schlondorff J, Lum L, Becherer JD, Kim TW, Saftig P, Hartmann D, Murphy G, Blobel CP.** Evidence for a critical role of the tumor necrosis factor alpha convertase (TACE) in ectodomain shedding of the p75 neurotrophin receptor (p75NTR). *J Biol Chem.* 2004. 279:4241-9.
- Whyte M.P., Wenkert D, Clements KL, McAlister WH, and Mumm S.** Bisphosphonate-induced osteopetrosis. *N Engl J Med* 2003. 349: 457-463.
- Wittrant Y, Theoleyre S, Chipoy C, Padrines M, Blanchard F, Heymann D, Redini F.** RANKL/RANK/OPG: new therapeutic targets in bone tumours and associated osteolysis. *Biochim Biophys Acta.* 2004. 1704:49-57.
- Wong BR, Rho J, Arron J, Robinson E, Orlinick J, Chao M, Kalachikov S, Cayani E, Bartlett FS 3rd, Frankel WN, Lee SY, Choi Y.** TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. *J Biol Chem.* 1997a. 272:25190-4.
- Wong BR, Josien R, Lee SY, Sauter B, Li HL, Steinman RM, Choi Y.** TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. *J Exp Med.* 1997b. 186:2075-80.
- Wong BR, Josien R, Lee SY, Vologodskaja M, Steinman RM, Choi Y.** The TRAF family of signal transducers mediates NF-kappaB activation by the TRANCE receptor. *J Biol Chem.* 1998. 273:28355-9.
- Woods A, Couchman JR.** Syndecans: synergistic activators of cell adhesion. *Trends Cell Biol.* 1998. 8:189-92.
- Wu X, McKenna MA, Feng X, Nagy TR, McDonald JM.** Osteoclast apoptosis: the role of Fas in vivo and in vitro. *Endocrinology.* 2003. 144:5545-55.
- Xiao-Feng Qin, Dong Sung An, Irvin S. Y. Chen, and David Baltimore.** Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5. 2003. *PNAS* 100: 183-188.

Yamaguchi K, Kinoshita M, Goto M, Kobayashi F, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K. Characterization of structural domains of human osteoclastogenesis inhibitory factor. *J Biol Chem.* 1998. 273:5117-23.

Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinoshita M, Mochizuki SI, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N and Suda T. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998a. 95: 3597-602.

Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Mochizuki SI, Yano K, Fujise N, Sato Y, Goto M, Yamaguchi K, Kuriyama M, Kanno T, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology.* 1998b. 139:1329-37.

Young MF, Bi Y, Ameye L, Chen XD. Biglycan knockout mice: new models for musculoskeletal diseases. *Glycoconj J.* 2002. 19:257-62.

Yun TJ, Chaudhary PM, Shu GL, Frazer JK, Ewings MK, Schwartz SM, Pascual V, Hood LE, Clark EA. OPG/FDCR-1, a TNF receptor family member, is expressed in lymphoid cells and is up-regulated by ligating CD40. *J Immunol.* 1998. 161:6113-21.

Zhang J, Dai J, Yao Z, Lu Y, Dougall W, Keller ET. Soluble receptor activator of nuclear factor kappaB Fc diminishes prostate cancer progression in bone. *Cancer Res.* 2003. 63:7883-90.

ANNEXE

1) Solutions de Western Blot

Tampon de lyse (RIPA buffer)

- Chlorure de sodium (Merck, Damstadt, Allemagne)	150 mM
- Tris pH 7,4 (Merck)	50mM
- Nonidet P-40 (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France)	1 %
- Sodium déoxycholate (Sigma)	0,25 %
- Sodium fluoride (Sigma)	1 mM
- Sodium orthovanadate (Sigma)	1mM
- Glycérol (Sigma)	10 %

A ajouter extemporanément :

- Leupeptine (Sigma)	10 µg/mL
- Aprotinine (Sigma)	10 µg/mL
- Phenylmethylsulfonylfluoride : PMSF (Sigma)	0,5 mM

Gel de séparation

- Acrylamide/bis-acrylamide (Sigma)	10 ou 12 %
- Tris pH 8,8 (Sigma)	375mM
- SDS (Sigma)	0,1 %
- APS (Sigma)	0,1 %
- TEMED (Sigma)	0,04 %

Gel de concentration

- Acrylamide/bis-acrylamide (Sigma)	5 %
- Tris pH 6,8 (Sigma)	125 mM
- SDS (Sigma)	0,1 %
- Ammonium Persulfate : APS (Sigma)	0,1 %
- TEMED: N, N, N', N',-tétraméthyléthylènediamine (Sigma)	0,1 %

Bleu de chargement

- Tris-HCl pH 6,8 (Sigma)	62,5 mM
- Glycérol (Sigma)	25 %

-
- SDS (Sigma) 2 %
 - Bleu de bromophénol (Sigma) 0,01 %
 - β -mercaptoéthanol (Sigma) 5 %

Tampon dénaturant

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

Tampon de transfert

- Tris (Sigma) 25 mM
- Glycine (Merck) 192 mM
- Méthanol (Grosseron, Saint Herblain, France) 20 %

Tampon de lavage

- Phosphate buffered saline : PBS (Eurobio, Les Ulis, France) 1X
- Tween (Sigma) 0,05 %

2) Analyse du niveau d'expression des transcrits

1) MOPS 10X pH7:

MOPS	10g
Acétate de sodium 1M	12,5 mL
EDTA à 0,02 %	5 mL

NaOH 10 M	2,25 mL
Eau DEPC	qsp 250 mL

2) Tampon d'échantillon :

400 µL de formamide
128 µL de formaldéhyde à 37 %
80 µL de MOPS 10X
60 µL de glycérol 87%
30 µL de bleu de bromophénol saturé
2 µL de Bromure d'éthidium (BET)

3) Mélange réactionnel de retro-transcription :

Tampon5X (Invitrogen)	10 µl
Dithiothréitol(DTT)à100mM (Invitrogen)	5µl
Désoxyribonucléotides tri-phosphate (dNTP) à 10 mM (Eurobio)	2,5 µl
Rnasine 40 U /µl (Promega)	0,5 µl
Murine Moloney Leukemia Virus-Reverse transcriptase 200 U/µl (Invitrogen)	2 µl

4) Mélange réactionnel pour PCR :

Tampon 10 X	5 µl
MgCl ₂ à 50 mM	6 µl
dNTP à 10 mM	4 µl
Taq Polymerase 5U/µL (<u>Invitrogen</u>)	0,25 µl
H ₂ O stérile	42 µl

LISTE DE PUBLICATIONS

IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology.

Kwan Tat Steeve, Padrines Marc, Théoleyre Sandrine, Heymann Dominique, Fortun Yannick

Cytokine & Growth Factor Reviews, Février 2004. 15:49-60.

The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodelling.

Theoleyre S, Wittrant Y, **Kwan Tat S**, Fortun Y, Redini F, Heymann D.

Cytokine & Growth Factor Reviews, Décembre 2004. 15:457-75.

OPG/membranous-RANKL complex is internalized via the clathrin pathway before a lysosomal and a proteasomal degradation.

S. Kwan Tat, M. Padrines, S. Theoleyre, S. Couillaud-Battaglia, D. Heymann, F. Redini and Y. Fortun

Bone, Octobre 2006. 39:706-15.

Characterization of osteoprotegerin binding to glycosaminoglycans by surface plasmon resonance: role in the interactions with Receptor Activator of Nuclear Factor κ B Ligand (RANKL) and RANK

Theoleyre S., **Kwan Tat S.**, Vusio P., Blanchard F., Gallagher J., Ricard-Blum S., Fortun Y., Padrines M., Rédini F., Heymann D.

Biochemical and Biophysical Research Communications, Août 2006. 347:460-7.

LA MODULATION DE LA BIODISPONIBILITÉ DE L'OSTÉOPROTÉGÉRINE PAR LES ISOFORMES MEMBRANAIRES DE RANKL ET PAR LA RECHERCHE DE PROTÉASES IMPLIQUÉES DANS LEUR CLIVAGE.

OPG, RANK, RANKL, TACE, MT3-MMP, Métallosecrétase, Ostéoclastes

L'interaction entre RANKL (Receptor Activator of NF- κ B Ligand), exprimé par les ostéoblastes, et RANK, présent à la surface des ostéoclastes, stimule l'activité ostéoclastique. L'OPG (ostéoprotégérine), en se fixant à RANKL, exerce un rôle d'inhibiteur sur cette activité ostéoclastique. Le travail réalisé a montré que l'OPG après s'être fixée à RANKL membranaire est internalisée via la voie des clathrines pour être dégradée par les lysosomes et les protéasomes. Nous montrons que RANKL membranaire est clivé par des métallosecrétases. Dans cette optique, la participation de TACE (TNF α Converting Enzyme) ainsi que de MT3-MMP (Membrane type-3 MatrixMetalloproteinase) a été étudiée dans le shedding de RANKL. Enfin, l'activité biologique des cellules 293 exprimant les isoformes de RANKL a été étudiée sur la différenciation ostéoclastique. Les travaux permettent de mieux comprendre la triade OPG/RANK/RANKL pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques

OSTEOPROTEGERIN BIODISPONIBILITY MODULATION BY THE MEMBRANOUS RANKL ISOFORMS AND THE SEARCH OF PROTEASES INVOLVED IN ITS PROTEOLYTIC CLIVAGE.

OPG, RANK, RANKL, TACE, MT3-MMP, Metallosecretase, Osteoclasts

The interaction between RANKL (Receptor Activator of NF-KB Ligand), expressed by the osteoblasts, and RANK, present at the cell surface of osteoclastic cells, stimulates osteoclast activity. OPG (osteoprotegerin) inhibits this osteoclastogenesis by acting as a soluble RANKL receptor competitor. The work carried out has shown that OPG after binding to membranous RANKL is internalised via the clathrines pathway before a lysosomal and a proteasomal degradation. We have also demonstrated that membranous RANKL was cleaved by metallosecretases. In this way, the involvement of TACE (TNF α Converting Enzyme) and MT3-MMP (Membrane type-3 MatrixMetalloproteinase) was studied in the shedding of membranous RANKL. Lastly, the biological activity of 293 cells expressing RANKL isoformes was studied on osteoclastic differentiation. Thus, the overall study allows us to better understand the molecular triad OPG/RANK/RANKL for the development of new therapeutic approaches.

LABORATOIRE DE PHYSIOPATHOLOGIE OSSEUSE ET THERAPIE DES TUMEURS OSSEUSES PRIMITIVES - EA 3822 - INSERM ER17
Faculté de Médecine - 1 rue Gaston Veil 44 035 NANTES cedex 1, France