

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DE MÉDECINE ET PHARMACIE

**MÉCANISMES D'ACTION DE
L'OSTÉOPROTÉGÉRINE ET ÉTUDE DE SES
INTERACTIONS AVEC LES PROTÉOGLYCANES.
NOUVELLE APPROCHE THERAPEUTIQUE DES
OSTEOSARCOMES**

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale de CHIMIE BIOLOGIE
Discipline Biologie – Médecine – Santé
Spécialité Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

*présentée
et soutenue publiquement par*

THÉOLEYRE Sandrine

le 12 Décembre 2005, devant le jury ci-dessous

Président du jury

Mr BREATHNACH Richard Professeur, INSERM U601

Rapporteurs

Mme RICARD-BLUM Sylvie Professeur, Institut de Biologie et Chimie des protéines, Lyon
Mr BRAZIER Michel Professeur, Faculté de Pharmacie, Amiens

Examineur

Mme RÉDINI Françoise Chargée de Recherche INSERM, Faculté de Médecine, Nantes

Directeur de thèse

Mr HEYMANN Dominique Maître de Conférence Universitaire, Faculté de Médecine, Nantes

SOMMAIRE

Publications.....	8
Liste des abréviations.....	9
<i>INTRODUCTION</i>	12
<u>I. L'OSTEOCLASTE</u>	14
I.1. Cytologie	14
I.2. Origine et différenciation	17
I.3. Rôle des ostéoblastes dans l'ostéoclastogenèse et dans l'initiation de la résorption	19
I.4. Fonction : la résorption osseuse	21
<u>II. LE REMODELAGE OSSEUX</u>	23
<u>III. LA TRIADE OPG / RANK-L / RANK</u>	26
III.1. Ostéoprotégérine (OPG)	26
III.1.1 Structure.....	26
III.1.2 Expression.....	28
III.1.3. Régulation.....	28
III.1.4. Effets biologiques.....	30
III.2. RANK-L	32
III.2.1. Structure.....	32
III.2.2. Expression.....	33
III. 2. 3. Régulation.....	34
III.2.4. Effets biologiques.....	34
III.3. RANK	35
III.3.1. Structure.....	35
III.3.2. Expression.....	35
III.3.3. Régulation.....	36
III.3.4. Effets biologiques.....	36

III.4. Signalisation dépendante de RANK dans les ostéoclastes	37
III.4.1. Signalisation initiée par le motif PFQEP ³⁶⁹⁻³⁷³ (motif 1) de RANK	39
III.4.2. Signalisation initiée par les motifs PVQEET ⁵⁵⁹⁻⁵⁶⁴ (motif 2) et PVQEQG ⁶⁰⁴⁻⁶⁰⁹ (motif 3) de RANK	40
III.4.3. Signalisation impliquant des protéines adaptatrices porteuses d'un motif ITAM.....	40
III.4.4. Rôle des différentes voies de signalisation activées par RANK dans la formation, la fonction et la survie des ostéoclastes	42
<u>IV. LES PROTEOGLYCANES</u>	44
IV.1. Les glycosaminoglycanes (GAG)	44
IV.1.1. Chondroïtine sulfate et dermatane sulfate.....	45
IV.1.2. Kérotane sulfate.....	45
IV.1.3. Héparane sulfate et héparine	45
IV.1.4. Acide hyaluronique	47
IV.2. Les protéoglycanes majeurs de l'os	47
IV.2.1. La décorine et le biglycan	47
IV.2.2. Les syndecans	50
<u>V. LES PATHOLOGIES OSTEOARTICULAIRES</u>	54
V.1. Pathologies non tumorales	54
V.2. Pathologies tumorales	55
V.2.1. Tumeurs primitives.....	55
a) <i>Tumeur à cellules géantes</i>	56
b) <i>Ostéosarcome</i>	56
c) <i>Sarcome d'Ewing</i>	57
d) <i>Chondrosarcome</i>	58
V.2.2. Tumeurs secondaires	59
V.3. Nouvelles approches thérapeutiques	60
V.3.1. Potentiel thérapeutique de la triade OPG / RANK-L / RANK.....	60
V.3.2. Immunothérapies	61
<u>VI. OBJECTIFS DU TRAVAIL</u>	64

MATÉRIELS ET MÉTHODES	66
<u>I. ÉTUDE DE L'ACTION DE L'OPG SUR LES OSTEOCLASTES PURIFIÉS DE LAPIN</u>	67
I.1. Obtention des ostéoclastes purifiés de lapin	67
I.1.1. Obtention des cellules osseuses totales.....	67
I.1.2. Purification des ostéoclastes	68
I.2. Détermination de l'expression des transcrits MMP2 et MMP9 par RT-PCR ... 68	
I.2.1. Extraction des ARN totaux	68
I.2.2. Vérification de l'intégrité des ARN	69
I.2.3. Reverse transcription (RT).....	69
I.2.4. Polymerase Chain Reaction (PCR).....	70
I.3. Détermination de l'activité des métalloprotéases par zymographie	72
I.3.1. Préparation des cellules et récupération des surnageants	72
I.3.2. Zymographie	73
I.3.3. Analyse statistique	74
I.4. Dosage protéique	74
<u>II. ÉTUDE DE L'ACTION DE L'OPG SUR LA LIGNÉE RAW 264.7</u>	75
II.1. Culture cellulaire	75
II.1.1. Lignée cellulaire RAW 264.7	75
II.1.2. Lignée cellulaire 2.93 RANK-L	75
II.2. Détermination de l'expression des transcrits RANK et RANK-L par PCR 76	
II.3. Étude des voies de signalisation dépendantes de l'OPG par western blot 76	
II.3.1. Préparation des lysats cellulaires	76
II.3.2. Migration et transfert	77
II.3.3. Marquage et révélation	77
II.4. Cytométrie en flux	78
<u>III. ÉTUDE DES INTERACTIONS MOLÉCULAIRES ENTRE OPG, RANK-L, RANK ET LES GLYCOSAMINOGLYCANES</u>	79
III.1. Expériences de résonance plasmonique de surface (BIAcore)	79

III.1.1. Immobilisation	79
III.1.2. Injection des analytes et analyses des résultats	80
III.2. Oligosaccharides et héparines sélectivement désulfatées.....	81
<u>IV. ÉTUDE DE LA FIXATION D'OPG RADIOMARQUÉE</u>	82
IV.1. Culture cellulaire	82
IV.2. Radiomarquage de l'OPG à l'iode 125	82
IV.2.1. Principe	82
IV.2.2. Préparation du matériel et iodation de la cytokine.....	83
IV.2.3. Séparation de l'iode libre et de la cytokine radiomarquée.....	84
IV.2.4. Rendement de l'iodation	84
IV.2.5. Calcul de la radioactivité spécifique (RAS) et de la concentration de la molécule radiomarquée	85
IV.3. Etude de la fixation d'OPG radiomarquée sur les cellules 2.93 RANK-L ou 2.93 RANK	86
IV.3.1. Technique.....	87
IV.3.2. Analyse mathématique de la liaison.....	88
<u>V. INFLUENCE DE L'OPG SUR LA DEMIE VIE DE RANK-L</u>.....	92
V.1. Étude du devenir de l'OPG liée aux cellules 2.93 RANK-L par microscopie confocale.....	92
V.2. Étude de l'influence de l'OPG sur l'expression de RANK-L par western blot	92
<u>VI. SOUS-CLONAGE ET TRANSFECTION DU SYNDECAN-1</u>.....	94
VI.1. Sous-clonage du syndecan-1.....	94
VI.1.1. Digestion par les enzymes de restriction et action de la phosphatase alcaline	94
VI.1.2. Ligation	94
VI.2. Transformation bactérienne par choc thermique.....	96
VI.3. Mini préparation d'ADN plasmidique.....	96
VI.4. Analyse du contenu des plasmides	97
VI.5. Transfection des cellules 2.93 RANK par le plasmide pcDNA₃- hygromycine/syndecan-1	98

<u>VII. ANALYSE PHÉNOTYPIQUE ET FONCTIONNELLE DE LYMPHOCYTES INFILTRANT LES TUMEURS</u>	99
VII.1. Patients	99
VII.2. Modèle d'ostéosarcome de rat	99
VII.3. Culture cellulaire	101
VII.3.1. Préparation des lymphocytes du sang périphérique (PBL) et extraction des lymphocytes infiltrant les tumeurs (TIL)	101
VII.3.2. Obtention de cellules primaires d'ostéosarcome de rat	102
VII.3.3. Culture de différentes lignées tumorales	102
VII.4. Test de cytotoxicité au ⁵¹Cr	103
VII.5. Phénotypage par cytométrie en flux	103
VII.6. Analyse statistique	104
 RÉSULTATS	105
 <u>I. ÉTUDE DE L'ACTION DE L'OPG SUR LES OSTEOCLASTES PURIFIÉS DE LAPIN</u>	106
I.1. Analyse des effets de l'OPG sur l'expression et l'activité des métalloprotéases dans les ostéoclastes purifiés de lapin	106
I.2. Étude de l'effet d'inhibiteurs de voies de transduction sur l'activité de la pro-MMP9 induite par l'OPG	108
 <u>II. ÉTUDE DE L'ACTION DE L'OPG SUR LA LIGNÉE RAW 264.7</u>	111
II.1. Analyse de l'expression de RANK et RANK-L par les cellules RAW 264.7 différenciées	111
II.2. Analyse des effets de l'OPG sur la phosphorylation de ERK1/2 et p38 – Implication de RANK-L	113
 <u>III. ÉTUDE DES INTERACTIONS MOLÉCULAIRES ENTRE OPG, RANK-L, RANK ET LES GLYCOSAMINOGLYCANES</u>	116
III.1. Étude des interactions moléculaires entre OPG, RANK-L et RANK	116

III.2. Étude des interactions moléculaires entre le complexe RANK / RANK-L / OPG et différents glycosaminoglycanes	118
III.2.1. Étude de la fixation de l'OPG sur l'héparine immobilisée	118
III.2.2. Effet de l'héparine sur la fixation de l'OPG au complexe RANK / RANK-L.....	120
III.2.3. Importance de la sulfatation dans l'inhibition de la fixation d'OPG sur RANK / RANK-L par l'héparine	122
III.2.4. Détermination de la taille minimale de la chaîne saccharidique présentant une activité inhibitrice.....	123
III.2.5. Effet de différents GAG sur la fixation de l'OPG au complexe RANK / RANK-L.....	124
<u>IV. ÉTUDE DE LA FIXATION D'OPG RADIOMARQUÉE</u>	126
IV.1. Étude de la fixation de l'OPG radiomarquée sur les cellules 2.93 RANK-L	126
IV.2. Étude de la fixation de l'OPG radiomarquée sur les cellules 2.93 RANK ...	130
<u>V. INFLUENCE DE L'OPG SUR LA DEMI-VIE DE RANK-L</u>	132
V.1. Étude du devenir de l'OPG liée aux cellules 2.93 RANK-L par microscopie confocale.....	132
V.2. Étude de l'influence de l'OPG sur la demi-vie de RANK-L par western blot	132
<u>VI. SOUS-CLONAGE ET TRANSFECTION DU SYNDECAN-1</u>	136
VI.1. Sous-clonage du syndecan-1.....	136
VI.2. Transfection des cellules 2.93 RANK par le plasmide pcDNA ₃ -hygromycine/syndecan-1	140
<u>VII. ANALYSE PHÉNOTYPIQUE ET FONCTIONNELLE DE LYMPHOCYTES INFILTRANT LES TUMEURS</u>	142
VII.1. Analyse phénotypique des TIL provenant de biopsies de tumeurs humaines	142
VII.2. Analyse de la cytotoxicité des TIL humains	144
VII.3. Analyse phénotypique et cytotoxique des TIL issus d'ostéosarcome de rat	146

DISCUSSION	150
CONCLUSION GÉNÉRALE	168
BIBLIOGRAPHIE	170
ANNEXES	201
Solutions utilisées pour la zymographie.....	202
Solutions utilisées pour la biologie moléculaire	203
Solutions utilisées pour le western blot.....	204

PUBLICATIONS

Wittrant Y, Couillaud S, **Théoleyre S**, Dunstan C, Heymann D, Rédini F. *Osteoprotegerin differentially regulates protease expression in osteoclasts cultures.*
Biochem Biophys Res Commun, 2002, 293 : 38-44.

Wittrant Y, **Théoleyre S**, Couillaud S, Dunstan C, Heymann D, Rédini F. *Regulation of osteoclast protease expression by RANKL.*
Biochem Biophys Res Commun, 2003, 310 : 774-778.

Wittrant Y, **Théoleyre S**, Couillaud S, Dunstan C, Heymann D, Rédini F. *Relevance of an in vitro osteoclastogenesis system to study receptor activator of NF- κ B ligand and osteoprotegerin biological activities.*
Exp Cell Res, 2004, 293 : 292-301.

Théoleyre S, Wittrant Y, Couillaud S, Vusio P, Berreur M, Dunstan C, Blanchard F, Rédini 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, 2004, 1644 : 1-7.

Kwan Tat S, Padrines M, **Théoleyre 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.

Wittrant Y, **Théoleyre S**, Chipoy C, Padrines M, Blanchard F, Heymann D, Rédini F. *RANKL/RANK/OPG: new therapeutic targets in bone tumours and associated osteolysis.*
Biochim Biophys Acta, 2004, 1704 : 49-57.

Théoleyre S, Wittrant Y, Kwan Tat S, Fortun Y, Rédini F, Heymann D. *The molecular triad OPG/RANK/RANKL : involvement in the orchestration of physiopathological bone remodeling.*
Cytokine Growth Factor Rev, 2004, 15 : 457-75.

Théoleyre S, Mori K, Cherrier B, Passuti N, Gouin F, Rédini F, Heymann D. *Phenotypic and functional analysis of lymphocytes infiltrating osteolytic tumors: use as a possible therapeutic approach.*
BMC Cancer, 2005, 5 :123.

Théoleyre S, Kwan Tat S, Vusio P, Blanchard F, Gallagher J, Ricard-Blum S, Fortun Y, Padrines M, Redini F, Heymann D. *Characterization of osteoprotegerin binding to glycosaminoglycans by surface plasmon resonance: role in the interactions with Receptor Activator of Nuclear Factor kappa B Ligand (RANKL) and RANK.*
Soumis.

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique
AMPc : Adénosine Mono-Phosphate cyclique
APC : Allophycocyanin
ARN : Acide Ribonucléique
BMP : Bone Morphogenetic Protein
BSA : Bovine Serum Albumin
CHX : cycloheximide
CTR : Récepteur à la calcitonine
DEPC : Diéthylpyrocarbonate
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium
dNTP : désoxyribo-Nucléotide TriPhosphate
DTT : Dithiothréitol
ECL : Electrochemiluminescence
EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétate
ERK : Extracellular signal-Regulated protein Kinase
FGF : Fibroblast Growth Factor
FITC : Fluoresceine Iso Thio Cyanate
GAG : Glycosaminoglycane
HBS : HEPES buffered saline
HSPG : Heparan Sulfate Proteoglycans
I κ B : Inhibitor of nuclear factor- κ B
IL : Interleukine
ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-based Activatio Motif
JNK : c-Jun NH₂-terminal kinase
MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase
M-CSF : Macrophage-Colony Stimulating Factor
MEM : minimum essential medium
MMLV-RT : Murine Moloney Leukemia Virus-Reverse Transcriptase
MMP : Matrix Metallo-Proteinase
NAFT : Nuclear Factor of Activated T-cells
NF- κ B : Nuclear Factor kappa B

OPG : Ostéoprotégérine
PBL : Peripheral Blood Lymphocyte
PBS : Phosphate Buffered Saline
PCR : Polymerase Chain Reaction
PE : Phycoerythrine
PEG2 : Prostaglandin E2
PG : Protéoglycane
PI₃ Kinase : Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase
PKC : Protein Kinase C
PMSF : Phenylmethylsulfonylfluoride
PTH : hormone parathyroïdienne
PVDF : Polyfluorure De Vinylidène
RANK : Receptor Activator of Nuclear factor κ B
RANK-L : RANK Ligand
RAS : Radioactivité Spécifique
RT : Reverse Transcription
RU : resonance unit ou unité de résonance
SART : Squamous cell carcinoma Antigen Recognized by T cells
SDS : Sodium Dodecyl Sulfate
SVF : Sérum de Veau Foetal
TACE : TNF alpha Converting Enzyme
TCA : acide trichloracétique
TCG : Tumeur à Cellules Géantes
TGF : Transforming Growth Factor
TIL : Tumor Infiltrating T Lymphocytes
TIMP : Tissue Inhibitors of Matrix Metallo-Proteinase
TNF : Tumor Necrosis Factor
TNFR : TNF Receptor
TRAF : Tumor necrosis factor Receptor Associated Factor
TRAIL : TNF Related Apoptosis Inducing Ligand
TRAP : Phosphatase Acide Résistante au Tartrate
UV : Ultra-Violet

INTRODUCTION

Le tissu osseux est un tissu conjonctif spécialisé composé d'une fraction organique et d'une fraction minérale qui lui confèrent 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.

La fraction organique du tissu osseux est constituée de cellules spécialisées, d'une matrice extracellulaire contenant une substance fondamentale glycoprotéique (protéoglycane, 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.

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.

I. L'OSTEOCLASTE

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

I.1. Cytologie

Les ostéoclastes sont des cellules géantes multinucléées contenant le plus souvent de 10 à 20 noyaux (figure 1). Ces cellules sont visibles au fond des lacunes de résorption appelées lacunes de Howship, au contact de la matrice osseuse calcifiée. Une des caractéristiques propres à l'ostéoclaste actif est sa bordure en brosse constituée d'une succession d'expansions et d'invaginations de la membrane cytoplasmique apicale adjacente à la surface osseuse (Suda et al, 1992) (figure 2). Ce domaine membranaire spécifique est formé par la fusion de vésicules intracellulaires acides avec la région de la membrane plasmique qui fait face à la surface calcifiée.

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

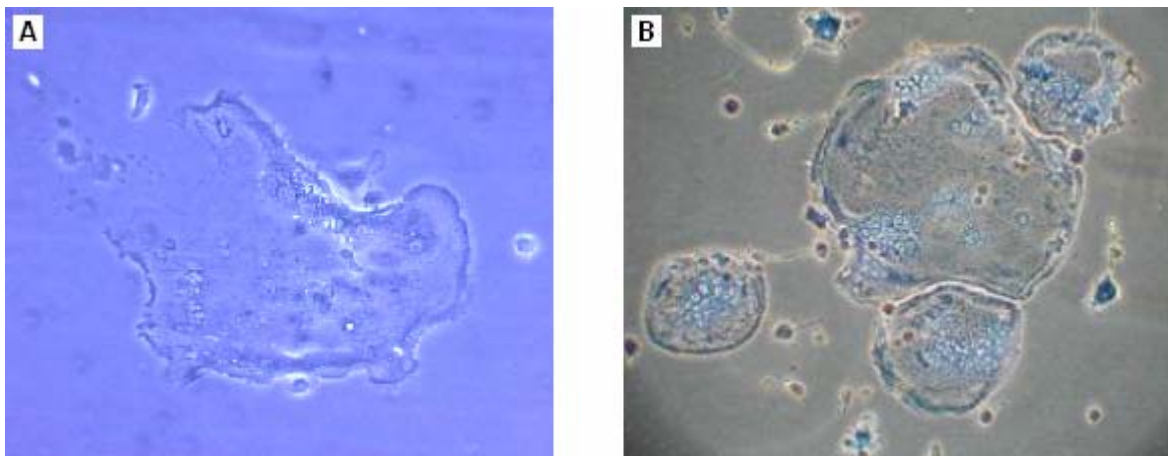


Figure 1 : Ostéoclastes observés en microscopie optique à contraste de phase.

(A) Ostéoclaste purifié de lapin (grossissement original : x200).

(B) Ostéoclastes obtenus par différenciation de cellules RAW 264.7 en présence de RANKL ; coloration au May-Grünwald-Giemsa (grossissement original : x100).

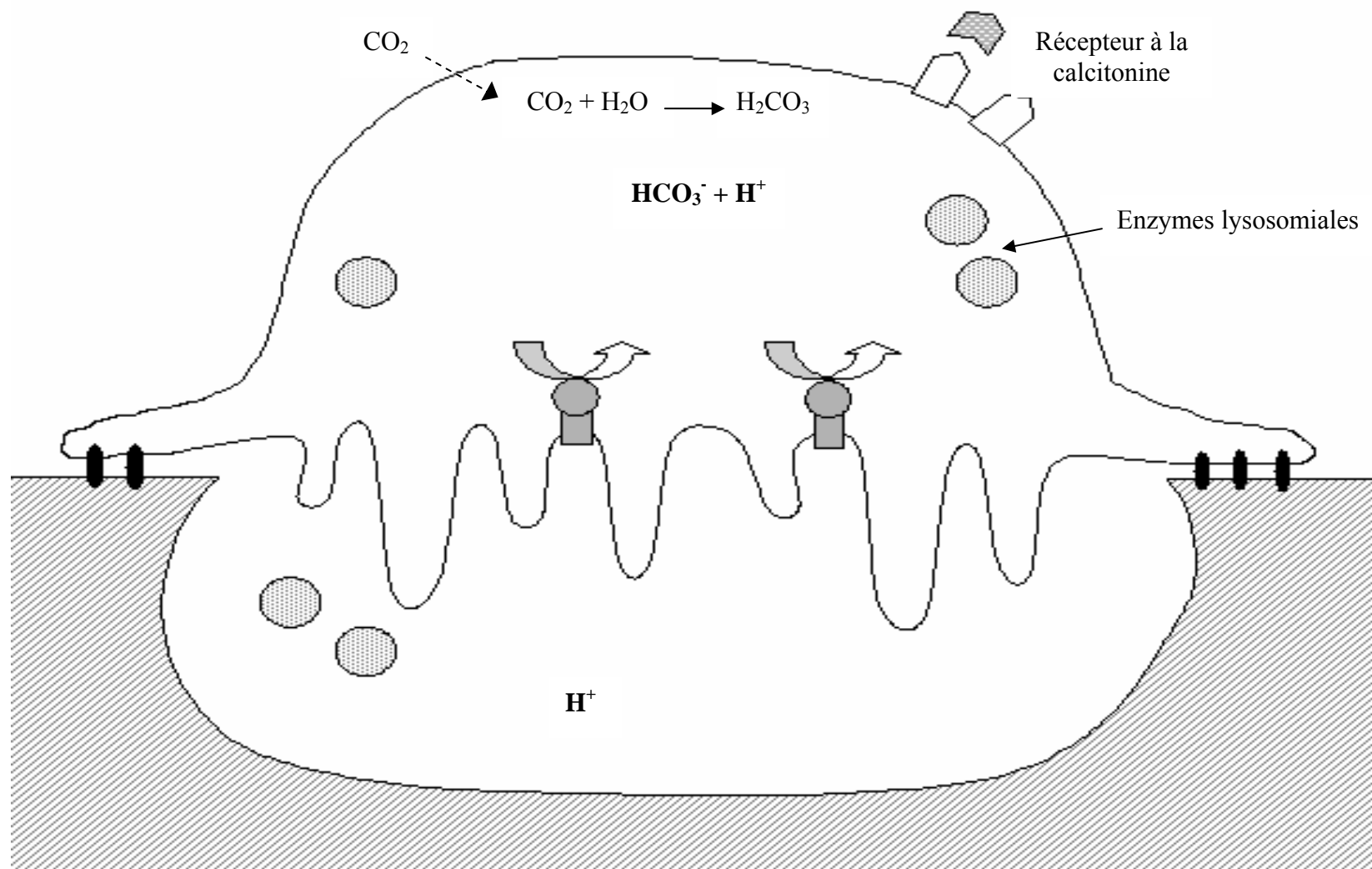


Figure 2 : Schéma d'un ostéoclaste actif (d'après Rousselle et Heymann, 2002).

L'ostéoclaste actif, adhérant à la matrice osseuse, libère dans la chambre de résorption des protons ainsi que des enzymes protéolytiques qui vont permettre la solubilisation de la fraction minérale et la digestion de la matrice organique.

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

I.2. Origine et différenciation

Les ostéoclastes se différencient à partir de cellules hématopoïétiques (Hattersley et al, 1989 ; Suda et al, 1992). Cette différenciation comporte plusieurs étapes qui sont illustrées dans la figure 3. Les cellules souches hématopoïétiques donnent naissance aux cellules mononucléées circulantes appelées CFU-GM (Colony Forming Unit Granulocyte-Macrophage). Le M-CSF (Macrophage-monocyte Colony Stimulating Factor) stimule la prolifération de ces CFU-GM afin de maintenir un pool de cellules mononucléées appartenant à la lignée monocyte/macrophage, ces cellules étant considérées comme les précurseurs des ostéoclastes et caractérisées par l'absence de deux marqueurs ostéoclastiques, TRAP et le récepteur à la calcitonine (CTR).

Les précurseurs mononucléés sont ensuite attirés vers un site de résorption, par chimiotactisme [intervention notamment des molécules SDF-1 (Stromal cell-Derived Factor-1), MIP-1alpha (Macrophage Inflammatory Protein-1alpha) et RANTES (Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted)] (Yu et al, 2003 et 2004), puis se fixent à la matrice osseuse pour se différencier, sous l'action de M-CSF et RANK-L (Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand), en ostéoclastes mononucléés exprimant le CTR et TRAP. Ces cellules, toujours sous l'effet de M-CSF et RANK-L, fusionnent pour former des cellules multinucléées qui ne sont pas encore actives et ne développent pas de

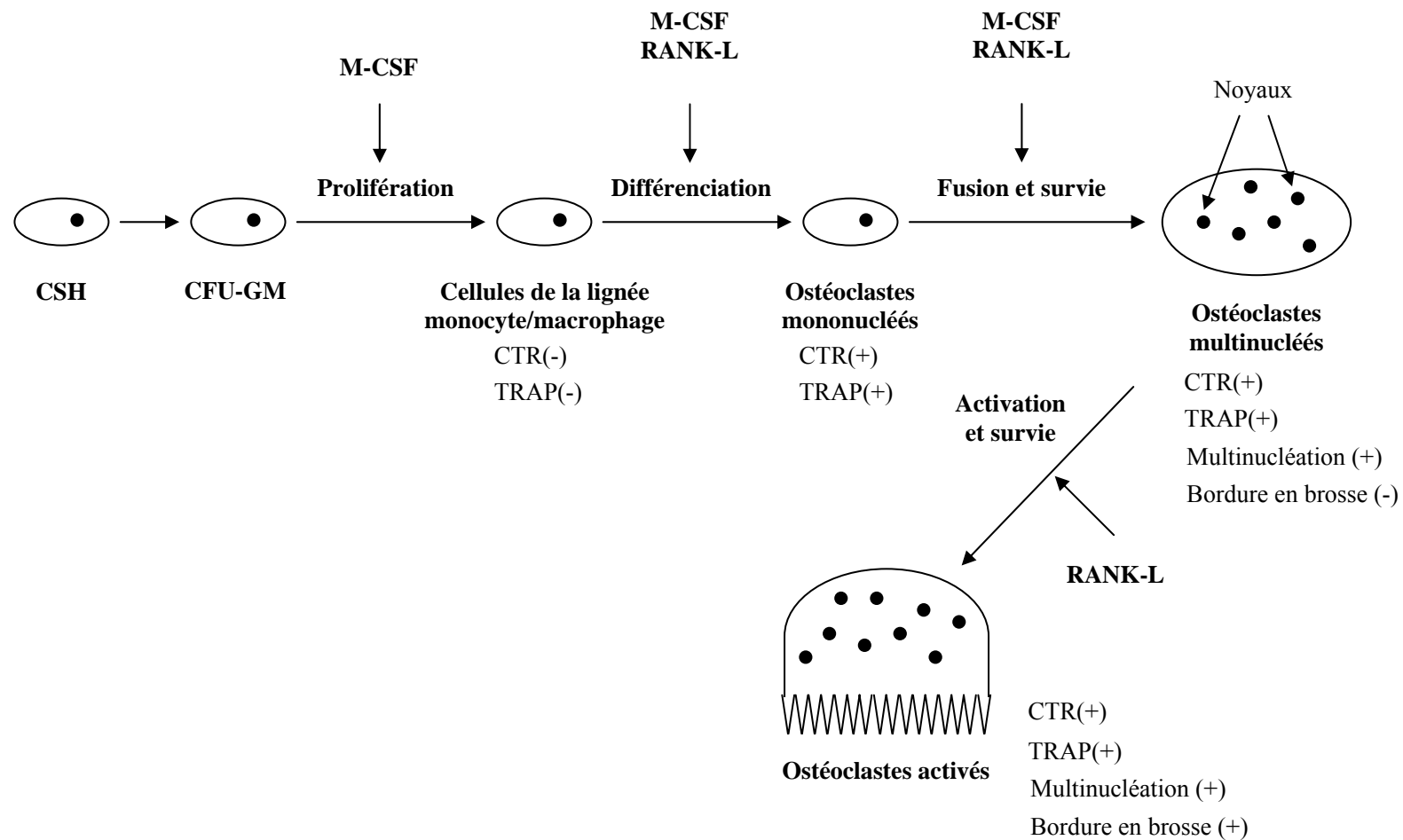


Figure 3 : Voie de différenciation des ostéoclastes (d'après Feng, 2005).

CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques ; CFU-GM : Colony Forming Unit Granulocyte-Macrophage ; M-CSF : Macrophage-monocyte Colony Stimulating Factor ; TRAP : Tartrate Résistant Acide Phosphatase ; CTR : récepteur à la calcitonine ; RANK-L : Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand.

bordure en brosse. L'activation des ostéoclastes est due à RANK-L qui va stimuler la formation de la bordure en brosse (Lacey et al, 1998 ; Suda et al, 1999).

Certaines molécules peuvent également induire la différenciation ostéoclastique et ce de manière indépendante de RANK-L, c'est le cas du TNF α (Tumor Necrosis Factor alpha). En effet, cette molécule peut, en présence de M-CSF, stimuler la formation d'ostéoclastes *via* un mécanisme impliquant les deux récepteurs spécifiques du TNF, TNFR1 et TNFR2, mais ne faisant pas intervenir RANK-L (Azuma et al, 2000 ; Kobayashi et al, 2000). Les ostéoclastes ainsi formés sont capables de résorber l'os et ce en présence d'interleukine-1 (IL1). L'IL-1 peut elle aussi avoir un rôle indépendant de RANK-L dans l'ostéoclastogenèse en induisant directement la multinucléation de pré-ostéoclastes *via* son récepteur spécifique IL-1R1 (Jimi et al, 1999). Enfin, l'IL-6 et l'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 RANK-L (Kudo et al, 2003).

I.3. Rôle des ostéoblastes dans l'ostéoclastogenèse et dans l'initiation de la résorption

En 1981, Rodan et Martin ont émis l'hypothèse selon laquelle la régulation de la résorption osseuse par les hormones ostéotropiques serait médiée par les ostéoblastes. Ils se basaient sur le fait que les ostéoclastes ne semblaient pas avoir de récepteurs à la PTH (hormone parathyroïdienne), à la calcitonine, ni aux autres hormones ostéotropiques alors que les ostéoblastes possédaient de tels récepteurs. Cette hypothèse a cependant été récemment invalidée puisqu'il a été démontré que les ostéoclastes expriment un récepteur à la PTH (Dempster et al, 2005). Des expériences de co-culture de cellules stromales/ostéoblastes et de cellules spléniques/cellules de moelle osseuse ont par ailleurs permis de mettre en évidence

que les ostéoblastes sont nécessaires au développement des ostéoclastes et que les contacts cellule-cellule sont indispensables à leur différenciation et activation (Chambers, 1988 ; Takahashi et al, 1988). Ceci est dû au fait que les ostéoblastes produisent deux facteurs nécessaires et suffisants pour l'ostéoclastogenèse : M-CSF et RANK-L (Yasuda et al, 1998 ; Lacey et al, 1998). Ce contact cellule-cellule est également très important pour la fonction des ostéoclastes matures. En effet, si les cellules ostéoblastiques et les ostéoclastes sont cultivés dans des chambres de culture séparées par une membrane, et que les contacts entre ces cellules sont ainsi bloqués, la formation des lacunes de résorption par les ostéoclastes est fortement diminuée (Jimi et al, 1996).

Les ostéoblastes/cellules stromales sont les cellules cibles des hormones ostéotropiques et cytokines [PTH, vitamine D3 (1 alpha, 25(OH)₂-D3), IL-1, IL-6, ...], et contrôlent les processus de différenciation/activation ostéoclastiques (Collin et al, 1992 ; Suda et al, 1995). Lorsque des cellules spléniques de souris déficientes en récepteurs à la PTH ou à la vitamine D3 sont co-cultivées, respectivement en présence de PTH ou de vitamine D3, avec des ostéoblastes normaux, un grand nombre d'ostéoclastes est observé (Liu et al, 1998 ; Takeda et al, 1999). Ces expériences de co-culture démontrent donc clairement l'effet indirect des hormones *via* les ostéoblastes. Ces hormones agissent sur les ostéoblastes en induisant l'expression de RANK-L (Horwood et al, 1998) qui va alors interagir avec son récepteur RANK présent à la surface des précurseurs et des ostéoclastes matures et ainsi stimuler la différenciation et l'activation des ostéoclastes (Nakagawa et al, 1998 ; Hsu et al, 1999). Les ostéoblastes jouent donc un rôle fondamental dans le recrutement et l'activité de résorption des ostéoclastes.

I.4. Fonction : la résorption osseuse

La fonction essentielle des ostéoclastes est la résorption osseuse. Durant la première phase de ce processus une réorganisation du cytosquelette des ostéoclastes est observée : les microfilaments d'actine, de vinculine et de taline s'organisent en anneaux ce qui est indispensable à la formation de la zone claire (Lakkakorpi et Vaananen, 1996). L'activité de résorption dépend alors de la capacité des ostéoclastes à générer, dans la chambre de résorption et grâce à une pompe à protons, un microenvironnement acide nécessaire à la solubilisation de la fraction minérale (figure 2). La digestion de la trame organique s'effectue ensuite sous l'action des enzymes protéolytiques contenues dans les lysosomes.

L'activité de résorption de la matrice osseuse organique par les ostéoclastes fait intervenir des protéinases. Parmi celles-ci, les Matrix Metallo-Proteinases 2 et 9 (MMP2 et MMP9) et la cystéine protéinase cathepsine K sont les plus impliquées (Delaisse et al, 2000 ; Blair et al, 2000). En effet, chargées de dégrader la matrice osseuse organique composée à plus de 90 % de collagène de type I, elles représentent les protéinases clés du remodelage osseux.

La MMP9 est connue pour être la gélatinase la plus abondamment exprimée par l'ostéoclaste mais les résultats divergent quant à son implication directe dans le processus de résorption osseuse (Delaisse et al, 2000). Cependant des études réalisées sur des souris déficientes en MMP9 ou en présence d'inhibiteurs des MMP ont montré que, dans ces conditions, les ostéoclastes sont incapables d'envahir le cœur de la diaphyse suggérant l'implication de la MMP9 dans la migration ostéoclastique (Blavier et al, 1995 ; Engsig et al, 2000).

La cathepsine K, synthétisée par les ostéoclastes, est une cystéine protéinase critique pour la solubilisation de la matrice osseuse au sein de la chambre de résorption (Drake et al, 1996). Son implication directe a été mise en évidence par des variations de son niveau

d'expression qui peuvent être associées à différentes pathologies dont la pycnodysostose (défaut d'expression conduisant à l'ostéopétrose) (Motyckova et al, 2001) ou au contraire la maladie de Gaucher, dans laquelle une surexpression de la cathepsine K est liée à l'apparition de lésions ostéolytiques (Moran et al, 2000). En outre, des ostéopétroses sévères sont observées dans des modèles animaux invalidés pour le gène de cette enzyme (Saftig et al, 1998).

L'équipe d'Everts a montré que les inhibiteurs des MMP semblent agir après ceux des cystéines protéinases suggérant une action séquentielle de ces enzymes (Everts et al, 1998). Les cystéines protéinases sont plus efficaces que les MMP vis-à-vis de la dégradation des protéoglycanes qui précède la digestion des composants collagéniques, elles sont donc nécessaires à l'attaque initiale de la matrice. Cette activité enzymatique séquentielle semble coïncider avec le pH dans la lacune de résorption : durant la phase initiale, l'environnement acide permet aux cystéines protéinases d'être actives (pH optimal autour de 5), puis, lorsque le pH est augmenté par un fort taux d'ions phosphate et calcium, les MMP peuvent être activées (pH optimal entre 6 et 7) et ainsi digérer la matrice organique restante.

L'activité de ces protéases est contrebalancée par la présence, au sein de l'environnement osseux, de leurs inhibiteurs naturels. En effet, l'activité des MMP est inhibée par les Tissue Inhibitors of Matrix Metallo-Proteinase (TIMP), synthétisés par de nombreuses cellules dont les ostéoblastes et les ostéoclastes (Hill et al, 1994 ; Rifas et al, 1994). La cathepsine K est quant à elle inhibée par la cystatine C qui est une protéine ubiquitaire présente en particulier dans les ostéoblastes (Lerner et al, 1997 ; Yamaza et al, 2001).

II. 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 hormonale comme c'est le cas dans l'ostéoporose où une diminution du taux d'estrogène 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 4).

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, prostaglandine E2,...), les ostéoblastes se rétractent et laissent la place aux précurseurs mononucléés des ostéoclastes, ou pré-ostéoclastes, qui peuvent adhérer à la matrice. Des travaux récents ont également montré que les ostéoclastes matures sont capables de migrer au travers de couches de cellules incluant des lignées de pré-ostéoblastes, de cellules endothéliales ou d'adipocytes (Saltel et al, 2005). Cette transmigration n'a pas encore été observée *in vivo* mais elle pourrait constituer, dans le cadre du remodelage osseux, un mécanisme utilisé par les pré-ostéoclastes pour atteindre la surface osseuse. Les ostéoblastes situés à proximité des pré-ostéoclastes vont alors favoriser leur

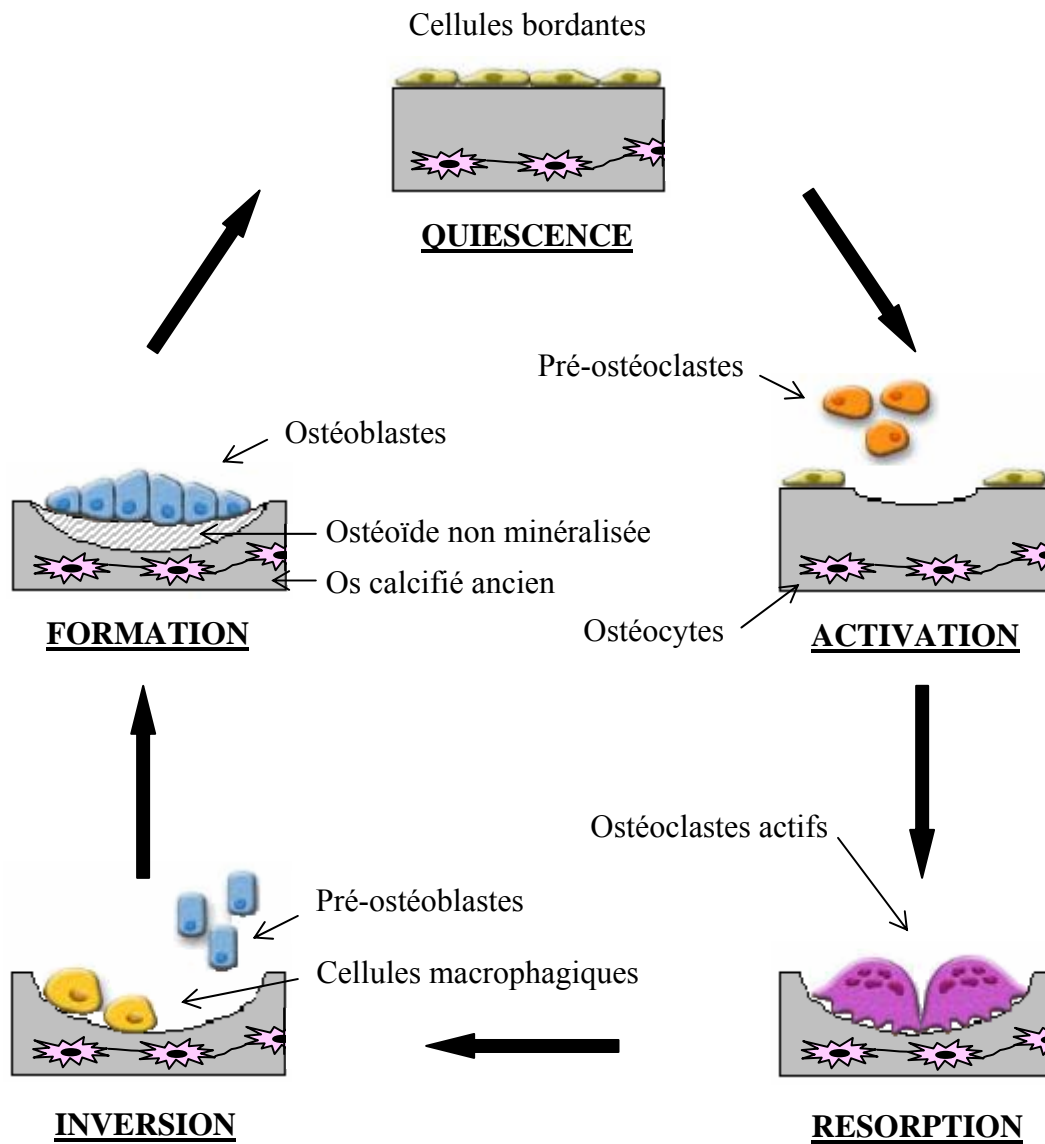


Figure 4 : Les différentes étapes du remodelage osseux.

différenciation en ostéoclastes matures *via* la production de différentes cytokines dont RANK-L qui va interagir avec son récepteur RANK présent à la surface des pré-ostéoclastes.

Débutent alors la phase de résorption. Les pré-ostéoclastes adhèrent à la surface osseuse au niveau de la zone claire puis il y a formation d'une zone de scellement conduisant à la polarisation de la cellule et à la formation de la bordure en brosse. Cette adhérence est assurée par l'interaction entre la matrice organique (notamment la vitronectine) et les intégrines de la membrane ostéoclastique ($\alpha_2\beta_1$ et $\alpha_v\beta_3$). Ces intégrines sont elles-mêmes associées au cytosquelette de l'ostéoclaste (Lakkakorpi et al, 1993). La zone claire délimite ainsi la chambre de résorption dont le pH acide est favorable à la dissolution de la phase minérale de l'os. La matrice organique est ensuite détruite par les enzymes protéolytiques lysosomales déversées dans la chambre de résorption.

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

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

III. LA TRIADE OPG / RANK-L / RANK

Le système de régulation du remodelage osseux a été très étudié, notamment les interactions existant entre les cellules impliquées et les différents facteurs environnementaux, ceci afin de mieux comprendre les perturbations pouvant conduire aux situations pathologiques. La découverte récente, en 1997, de l'ostéoprotégérine (OPG) et l'identification consécutive de son ligand RANK-L (Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand) et de RANK ont révolutionné les connaissances sur les mécanismes moléculaires de régulation du remodelage osseux. Cette triade moléculaire OPG / RANK-L / RANK participe activement à l'équilibre entre apposition et résorption en étant l'effecteur final des différents paramètres (cellulaires, hormonaux, moléculaires et mécaniques) qui agissent sur le tissu osseux (figure 5).

III.1. Ostéoprotégérine (OPG)

III.1.1 Structure

L'OPG encore appelée Osteoclastogenesis Inhibitory Factor (OCIF), Follicular Dendritic 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 de 380 acides aminés. L'OPG ne possédant pas de domaine cytoplasmique ni transmembranaire, est sécrétée sous forme de protéine soluble. Sa partie N-terminale possède 4 motifs riches en cystéine impliqués dans l'inhibition de l'ostéoclastogénèse. Son extrémité C-terminale contient quant à elle deux « death domain

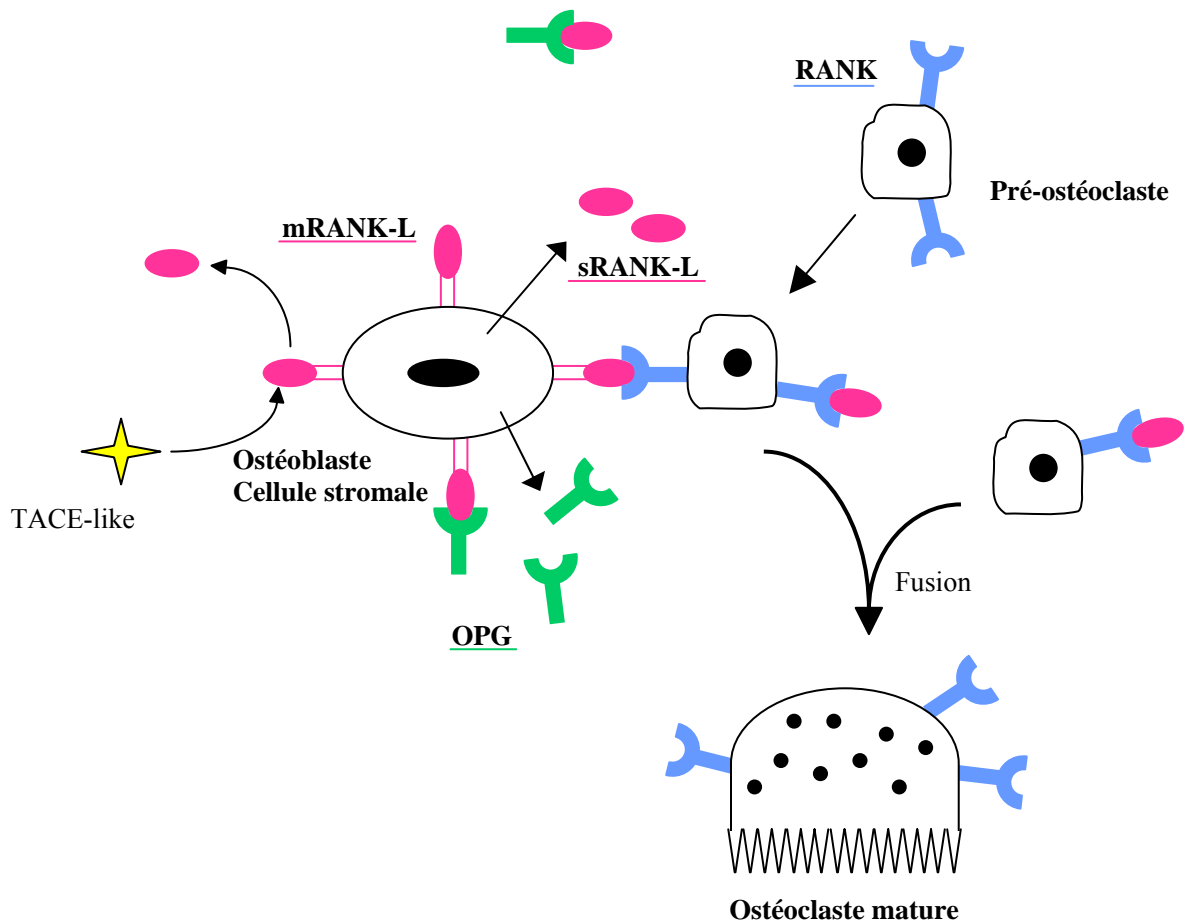


Figure 5 : Implication de la triade OPG / RANK-L / RANK dans la différenciation ostéoclastique.

RANK-L : Receptor Activator of Nuclear Factor kappa B ; m : membranaire ; s : soluble ;
 OPG : ostéoprotégérine ; TACE-like : TNF alpha Converting Enzyme-like.

homologous », dont la fonction est actuellement inconnue, et un domaine avec un site de liaison à l'héparine (figure 6). En C-terminal se trouve également 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 (Hofbauer et al, 2000).

III.1.2 Expression

L'OPG est une molécule ubiquitaire dont l'ARNm est détecté dans le tissu osseux, la peau, le foie, les poumons, le cœur, les reins, le placenta, les glandes mammaires et le cerveau (Simonet et al, 1998 ; 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 peut également être induite par le CD40 (Yun et al, 1998). Enfin, les cellules endothéliales, les fibroblastes, les monocytes, les ostéoblastes humains en culture primaire et les lignées ostéosarcomateuses telles MG-63 et SaOS2 expriment fortement l'OPG (Hofbauer et al, 2000).

III.1.3. Régulation

La production de l'OPG est modulée par un très grand nombre de facteurs (tableau 1). Parmi eux, on peut citer l'effet stimulateur de la vitamine D3, des estrogènes, du TNF α , du TGF β (Transforming Growth Factor 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 ;

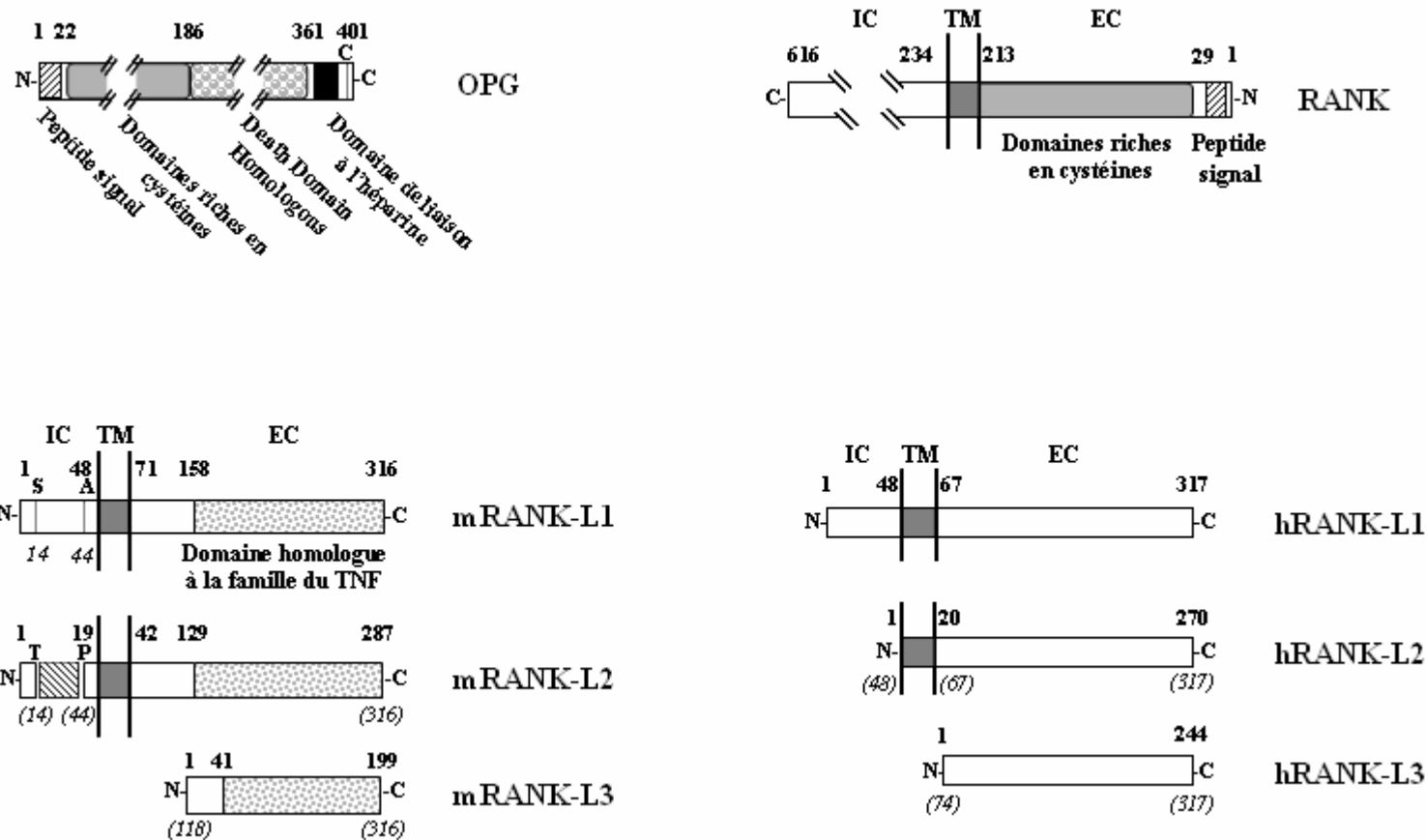


Figure 6 : Caractéristiques structurales des molécules OPG, RANK, RANK-L de souris (mRANK-L) et RANK-L humain (hRANK-L) (d'après Theoleyre et al, 2004a ; Suzuki et al, 2004).
 IC : domaine intracellulaire ; TM : domaine transmembranaire ; EC : domaine extracellulaire ; N : extrémité N-terminale ; C : extrémité C-terminale.

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).

III.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 due à une hématopoïèse compensatoire extramédullaire et à un défaut de développement thymique. Une augmentation de l'os trabéculaire minéralisé associée à une diminution du nombre d'ostéoclastes est également observée (Simonet et al, 1997).

Au contraire, les souris invalidées pour l'OPG présentent une ostéoporose et une diminution de la densité minérale osseuse accompagnée de multiples fractures et d'une stimulation du renouvellement osseux (Bucay et al, 1998). Ces phénomènes sont réversibles par l'injection intraveineuse d'OPG recombinante (Min et al, 2000). La présence d'OPG est donc absolument indispensable au maintien de la masse osseuse. Ces souris possèdent également des calcifications de l'aorte et des artères rénales. Des travaux très récents ont en effet mis en évidence le rôle préventif de l'OPG dans la calcification artérielle ainsi que sa présence, associée au facteur de von Willebrand, dans les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales (Zannettino et al, 2005).

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

	OPG	RANK-L
Vitamine D3	+	+
PTH	-	+
Estrogène	+	=
IL-1	+	+
IL-6	+	+
IL-11	+	+
IL-13	+	-
IL-17	-	+
TNF	+	+
Interferon γ	+	+
Leukemia inhibitory factor	+	+
Oncostatine M	+	+
BMP-2	+	
TGF β	+	-
Glucocorticoïdes	-	+
Dexaméthasone	-	+
Prostaglandine E2	-	+
Calcium	+	+
IGF-1	-	+
Rapamycine	-	+
Cyclosporine A	-	+
Tacrolimus	-	+
Ionomycine	-	+
Vasoactive Intestinal Peptide	+	-
Indian Hedgehog	-	+
LPS	+	=

Tableau 1 : Facteurs influençant l'expression d'OPG et de RANK-L.
 (+) expression augmentée ; (-) expression diminuée ; (=) pas de modulation.

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

III.2. RANK-L

III.2.1. Structure

RANK-L a été identifié et cloné par deux groupes de recherche différents, l'un à partir d'une lignée de cellules stromales de la moelle osseuse murine ST2 (Yasuda et al, 1998a), et l'autre à partir de cellules myélomonocytaires murine 32D (Lacey et al, 1998). RANK-L 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 et CD40, et d'environ 20% avec Fas-Ligand (Wong et al, 1997a) (figure 6).

Que ce soit chez la souris ou chez l'homme, RANK-L existe sous trois isoformes résultant de l'épissage alternatif d'un même gène (Ikeda et al, 2001 ; Suzuki et al, 2004).

L'isoforme RANK-L1 correspond à une protéine transmembranaire de 317 acides aminés chez la souris et 316 chez l'homme, possédant un domaine intra-cytoplasmique complet lui permettant d'interagir avec des molécules intracellulaires. A l'inverse, RANK-L3 est une protéine soluble de 199 acides aminés chez la souris et 244 chez l'homme, déléetée en N-terminal pour les acides aminés correspondant aux domaines intra-cytoplasmique et transmembranaire de RANK-L1. La différence de structure majeure entre les deux espèces concerne l'isoforme RANK-L2. En effet, RANK-L2 de souris (287 acides aminés) possède un court domaine intra-cytoplasmique alors que RANK-L2 humain (244 acides aminés) en est dépourvu.

La forme soluble de RANK-L peut également être libérée de la membrane plasmique après clivage par des protéases comme TACE (TNF alpha Converting Enzyme) (Lum et al, 1999), la MT1-MMP (Membrane-Type 1 Matrix Metalloproteinase) (Schlondorff et al, 2001) ou la MMP-7 (Lynch et al, 2005).

III.2.2. Expression

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

évidence dans le cerveau, le cœur, les poumons, les reins et le placenta (Kartsogiannis et al, 1999).

III. 2. 3. Régulation

De la même manière que l'OPG, l'expression de RANK-L est régulée par de très nombreux facteurs (tableau 1). Notamment, le taux d'ARNm de RANK-L est 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 et l'IL-13 (Nakashima et al, 2000).

III.2.4. Effets biologiques

Pour mieux comprendre les effets biologiques de RANK-L, 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, 1999a). Ces résultats mettent en évidence le rôle clé de RANK-L dans la résorption osseuse. En effet, *in vitro*, RANK-L en se fixant à son récepteur RANK présent à la surface des pré-ostéoclastes (Nakagawa et al, 1998) induit, en présence de M-CSF, leur différenciation en ostéoclastes (Lacey et al, 1998). RANK-L est en outre un facteur de survie des ostéoclastes matures (Fuller et al, 1998 ; Wong et al, 1999).

Ces souris invalidées pour le gène codant RANK-L présentent également un important défaut de développement des glandes mammaires engendrant la mort des nouveaux-nés, ce processus pouvant être contrebalancé par l'injection de RANK-L (Fata et al, 2000).

Enfin RANK-L 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, 1999a). En effet, les souris déficientes en RANK-L 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 RANK-L 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).

III.3. RANK

III.3.1. Structure

RANK appartient à la famille des récepteurs au TNF et possède environ 40% d'homologie avec 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 (Anderson et al, 1997) et qui est présentée à la membrane sous forme de trimère. Le domaine extracellulaire de RANK contient 4 motifs riches en cystéine et deux sites de N-glycosylation (Hofbauer et al, 2000) (figure 6). RANK est le récepteur de RANK-L présent à la surface des précurseurs ostéoclastiques ou des ostéoclastes matures, des lymphocytes T et des cellules dendritiques.

III.3.2. Expression

L'expression des ARNm de RANK a été détectée dans différents tissus comme le muscle squelettique, la peau, le cerveau, les poumons, le foie (Anderson et al, 1997 ; 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.

III.3.3. Régulation

L'expression de RANK peut-être stimulée par le CD40-Ligand sur les cellules dendritiques et par l'engagement du TCR associée au TGF β et à l'IL-4 sur les lymphocytes T. Par contre, son expression sur les pré-ostéoclastes et les ostéoclastes matures ne semble pas régulée par les principaux agents ostéotropiques.

III.3.4. Effets biologiques

Pour mettre en évidence les effets biologiques de RANK, des souris ont été invalidées pour ce gène (souris RANK^{-/-}). Elles présentent une ostéopétrose sévère associée à un manque d'ostéoclastes matures tout comme les souris délétées pour le gène de RANK-L (Li et al, 2000). Différentes études ont montré que RANK-L 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). Ces 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 RANK-L^{-/-} (Li et al, 2000).

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

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

III.4. 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, PFQEP³⁶⁹⁻³⁷³, PVQEET⁵⁵⁹⁻⁵⁶⁴ et PVQEQG⁶⁰⁴⁻⁶⁰⁹, capables de médier indépendamment la formation et les fonctions ostéoclastiques (Liu et al, 2004) (figure 7).

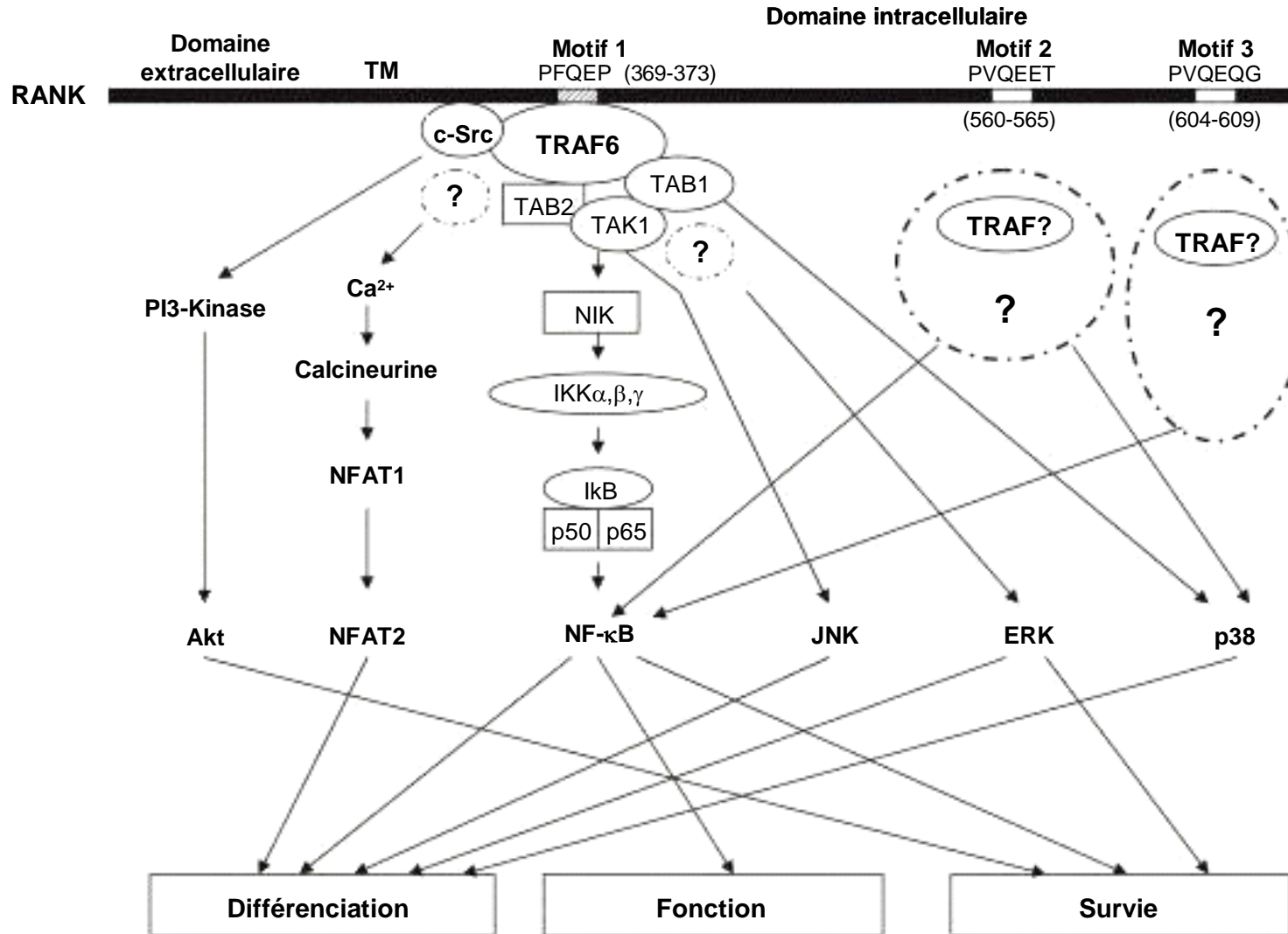


Figure 7 : Signalisation dépendante de RANK et impliquant les protéines TRAF dans les ostéoclastes (d'après Feng, 2005).
 TM : domaine transmembranaire.

III.4.1. Signalisation initiée par le motif PFQEP³⁶⁹⁻³⁷³ (motif 1) de RANK

Le motif 1 a été décrit comme un site de liaison pour TRAF6 (Ye et al, 2002). Or des souris invalidées pour TRAF6 présentent un défaut de différenciation et d'activation des ostéoclastes suggérant un rôle prépondérant de ce motif et de TRAF6 dans la signalisation dépendante de RANK (Lomaga et al, 1999).

Le motif 1 active des voies de transduction impliquant NF- κ B ainsi que trois MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase), JNK, ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase) et p38, en réponse à une stimulation par RANK-L (Liu et al, 2004). L'activation de ces trois voies par le motif 1 fait intervenir la formation d'un complexe protéique comprenant TRAF6, TAK1 (TGF β -Activated Kinase 1) et une protéine adaptatrice TAB2 (TAK1 Binding protein 2) (figure 7). Dans la signalisation dépendante de RANK / RANK-L, il a été démontré que la formation de ce complexe TRAF6 / TAK1 / TAB2 conduit à l'activation de TAK1 (Mizukami et al, 2002). TAB2 quant à elle, permet de faciliter la formation du complexe en fixant TAK1 à TRAF6 (Mizukami et al, 2002). TAK1, une fois activée, phosphoryle NIK (NF- κ B-Inducing Kinase) ce qui active le complexe I κ B Kinase (IKK) $\alpha\beta\gamma$ (Ninomiya-Tsuji et al, 1999) conduisant à l'activation de la voie NF- κ B (figure 7). TAK1 activée stimule également la voie JNK (Lee et al, 2002a). L'activation de p38 est, quant à elle, médiée par TAB1 qui a la capacité de recruter et de fixer p38 au complexe TRAF6 / TAK1 (Ge et al, 2002). L'activation de la voie ERK par le motif 1 n'est pas encore parfaitement élucidée mais il paraît fort probable que TRAF6 soit impliquée.

RANK-L stimule également la voie Akt / PKB (Protein Kinase B) par l'intermédiaire de TRAF6 (Wong et al, 1999). Or, le motif 1 est un site de liaison pour TRAF6 il semble donc, bien que cela n'est pas été démontré, que ce motif puisse initier la voie de signalisation impliquant la PI3-Kinase (phosphatidylinositol 3-kinase) et conduisant à l'activation d'Akt / PKB (Wong et al, 1999).

Enfin, des études récentes ont montré que RANK-L est capable d'activer, *via* TRAF6, le facteur de transcription Nuclear Factor of Activated T-cells 2 (NFAT2) (NFATc1/NFATc) qui joue un rôle important dans l'ostéoclastogenèse (Takayanagi et al, 2002 ; Gohda et al, 2005).

III.4.2. Signalisation initiée par les motifs PVQEET⁵⁵⁹⁻⁵⁶⁴ (motif 2) et PVQEQG⁶⁰⁴⁻⁶⁰⁹ (motif 3) de RANK

Alors que la signalisation initiée par le motif 1 a été largement étudiée, celles impliquant les motifs 2 et 3 demeurent mal connues. En effet, les protéines TRAF capables de se lier à ces motifs n'ont pas encore été clairement identifiées. Certaines études ont montré que le motif 2 se liait à TRAF3 et que le motif 3 interagissait avec TRAF1, 2 et 5 (Galibert et al, 1998), alors que d'autres travaux ont mis en évidence que ni TRAF1 ni TRAF3 n'étaient capables de se lier à RANK (Hsu et al, 1999). Cependant, il a pu être démontré que le motif 2 active les voies de signalisation NF-kB et p38 alors que le motif 3 ne stimule que la voie NF-kB (Liu et al, 2004) (figure 7).

III.4.3. Signalisation impliquant des protéines adaptatrices porteuses d'un motif ITAM

Des études récentes ont montré que des souris ne possédant pas les protéines DAP12 (DNAX-activating protein 12) et FcR γ (Fc Receptor common γ subunit) présentaient une ostéopétrose sévère due à un défaut de différenciation des ostéoclastes (Koga et al, 2004). Ces molécules, qui sont des protéines adaptatrices comportant un motif ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif), peuvent être associées à de multiples immuno-récepteurs. Dans les ostéoclastes DAP12 est associée à TREM-2 (Triggering receptor Expressed by Myeloid cells-2) et SIRP β 1 (Signal-Regulatory Protein β 1) (Paloneva et al, 2003 ; Koga et al,

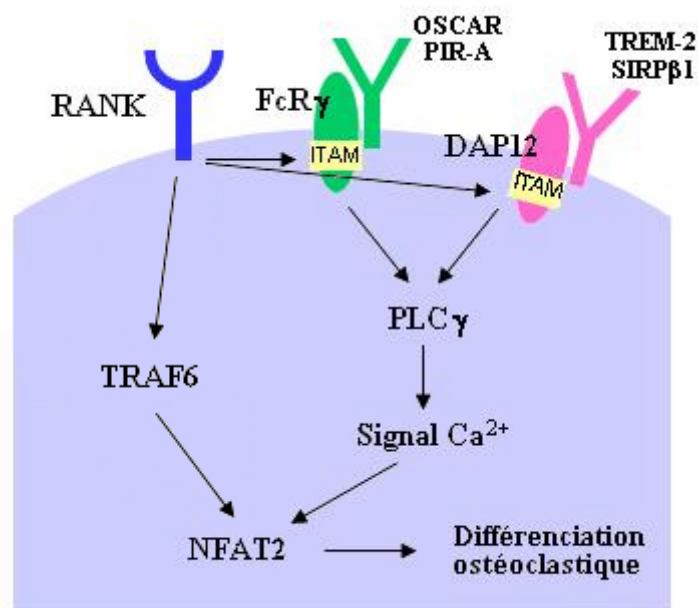


Figure 8 : Signalisation dépendante de RANK impliquant des protéines adaptatrices porteuses d'un motif ITAM dans les ostéoclastes (d'après Koga et al., 2004).

2004) alors que FcR γ est principalement associé à OSCAR (Osteoclast-Associated Receptor) et PIR-A (Paired Immunoglobulin-like Receptor-A) (Ishikawa et al, 2004 ; Koga et al, 2004) (figure 8). La phosphorylation des motifs ITAM induite à la fois par les immuno-récepteurs et par l'interaction RANK-L / RANK conduit au recrutement de la tyrosine-kinase Syk (Mocsai et al, 2004). Cette kinase stimule ensuite la PLC γ (Phospholipase C γ) ce qui aboutit à l'activation du signal dépendant du calcium, évènement critique pour l'induction de NFAT2 (Koga et al, 2004).

III.4.4. Rôle des différentes voies de signalisation activées par RANK dans la formation, la fonction et la survie des ostéoclastes

RANK stimule six voies de transduction majeures par l'intermédiaire de différentes cascades de signalisation en réponse à RANK-L. Ces voies jouent des rôles différents dans la différenciation, l'activation et la survie des ostéoclastes.

Les voies NF-kB et JNK, conduisant à l'activation d'AP-1 (Activator protein 1), sont essentielles pour la différenciation ostéoclastique (Grigoriadis et al, 1994 ; Franzoso et al, 1997) (figure 7). En effet, des souris déficientes pour p50 et p52 (constituants de NF-kB) développent une ostéopétrose due à une absence totale d'ostéoclastes (Franzoso et al, 1997). De la même manière, des souris déficientes pour c-Fos, un composant d'AP-1, ne possèdent pas d'ostéoclastes, ce qui conduit à une ostéopétrose (Grigoriadis et al, 1994). La voie NF-kB joue également un rôle critique dans la résorption osseuse (Miyazaki et al, 2000) et la survie des ostéoclastes (Jimi et al, 1998).

Akt agit principalement sur la survie des ostéoclastes (Wong et al 1999) alors que NFAT2 a été récemment identifié comme un facteur de transcription critique pour la différenciation des ostéoclastes (Ishida et al, 2002 ; Takayanagi et al, 2002 ; Ikeda et al, 2004). ERK, quant à elle, joue un rôle dans la différenciation et la survie des ostéoclastes (Lee

et al, 2001, 2002b) au contraire de p38 qui, *via* MITF (Microphthalmia Transcription Factor), ne semble intervenir que dans l'ostéoclastogenèse (Matsumoto et al, 2000 ; Lee et al 2002b ; Mansky et al, 2002) (figure 7).

IV. LES PROTEOGLYCANES

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 faibles quantités dans le tissu osseux, mais ils y 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 ; Kjéllen 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.

IV.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. Ces chaînes glucidiques sont fixées sur l'axe protéique par l'intermédiaire d'un tétrasaccharide composé d'un xylose, de deux galactoses et d'un acide glucuronique.

IV.1.1. Chondroïtine sulfate et dermatane sulfate

Le chondroïtine sulfate est constitué de la répétition d'un acide glucuronique et d'une N-acétylgalactosamine, le nombre total de répétition étant compris entre 25 et 40 pour un poids moléculaire de 12 à 20 kDa (tableau 2). Les disaccharides sont fréquemment sulfatés en position 4 ou 6 de la N-acétylgalactosamine mais des formes di- ou tri- sulfatées peuvent également exister (Kjéllen et Lindahl, 1991 ; Prydz et Dalen, 2000).

Dans le dermatane sulfate, l'unité disaccharidique est composée d'acide glucuronique ou d'acide iduronique (respectivement 60 et 40% dans le cartilage articulaire) et de N-acétylgalactosamine (Choi et al, 1989) (tableau 2). La molécule est souvent sulfatée en position 2 de l'acide iduronique ou en position 4 de la N-acétylgalactosamine. Le poids moléculaire du dermatane sulfate varie entre 15 et 40 kDa.

IV.1.2. Kératane sulfate

Le kératane est le seul GAG à ne pas être lié à l'axe protéique par l'intermédiaire d'un tétrasaccharide, il y est directement fixé grâce à une liaison glycosidique. Il est constitué par la répétition d'un galactose et d'une N-acétylglucosamine (tableau 2). La taille des chaînes osidiques ainsi que le nombre et la position des groupements sulfate sont très variables, et le poids moléculaire est compris entre 4 et 20 kDa.

IV.1.3. Héparane sulfate et héparine

L'héparine et l'héparane sulfate ont la même structure de base consistant en la répétition d'un acide glucuronique ou iduronique et d'une N-acétylglucosamine mais l'héparine est plus sulfatée que l'héparane sulfate (tableau 2). En effet, la proportion de N-sulfatations est inférieure à 50% pour l'héparane sulfate alors qu'elle est supérieure à 70%

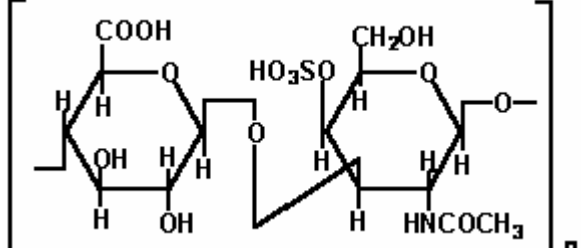
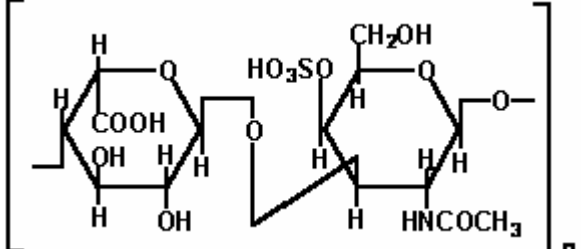
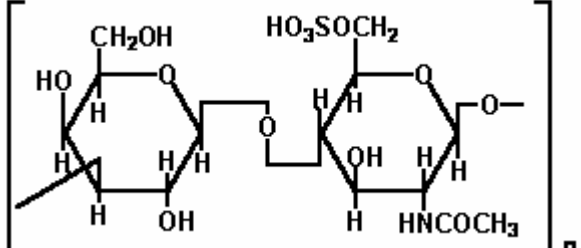
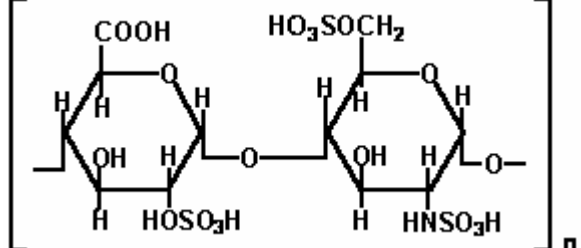
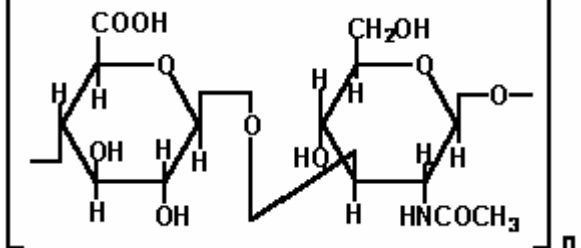
<p style="text-align: center;">Chondroïtine sulfate</p> <p>(acide glucuronique + N-acétylgalactosamine)</p>	
<p style="text-align: center;">Dermatane sulfate</p> <p>(acide glucuronique ou acide iduronique + N-acétylgalactosamine)</p>	
<p style="text-align: center;">Kératane sulfate</p> <p>(galactose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

Tableau 2 : Structure des différents glycosaminoglycanes.

pour l'héparine (Fransson et al, 1986 ; Roden et al, 1992). La taille d'une chaîne peut atteindre 100 kDa mais elle est généralement inférieure à 50 kDa.

IV.1.4. Acide hyaluronique

La structure de l'acide hyaluronique est la plus simple de tous les GAG : il s'agit de la répétition d'un disaccharide non sulfaté composé d'acide glucuronique et de N-acétylglucosamine (tableau 2). Son poids moléculaire varie de 300 à 2000 kDa selon les tissus (Holmes et al, 1988). L'acide hyaluronique a également la particularité de n'exister que sous la forme de GAG, jamais de protéoglycane.

IV.2. Les protéoglycanes majeurs de l'os

IV.2.1. La décorine et le biglycan

La décorine et le biglycan appartiennent au groupe des petits PG riches en leucine et 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 9). 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.

Lors du processus d'ossification, le biglycan est localisé au niveau des parois des lacunes ostéocytaires et à la surface des cellules osseuses alors que la décorine est présente dans toute la matrice ostéoïde (Bianco et al, 1990). Cependant, dans l'os mature, la décorine est située en périphérie des lacunes et des canalicules des ostéocytes, tandis que le biglycan est présent dans toute la matrice osseuse (Ingram et al, 1993).

DECORINE



BIGLYCAN

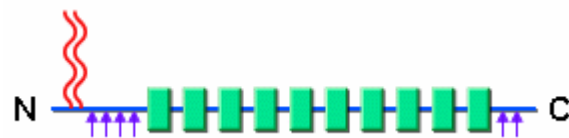


Figure 9 : Représentation schématique de la décorine et du biglycan.

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

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 a été mise en évidence. Lorsque les souris sont déficientes pour la décorine ou le biglycan, des altérations de la taille et de la forme des fibres de collagène sont par ailleurs observées, suggérant un rôle important de ces molécules dans la fibrillogenèse du collagène (Corsi et al, 2002). Des souris invalidées doublement pour le biglycan et la décorine ont également été générées ; dans ce cas, les animaux présentent une diminution de la masse osseuse plus sévère et survenant plus tôt que pour les souris déficientes pour une seule des deux molécules, révélant des effets synergiques de la décorine et du biglycan dans l'os (Corsi et al, 2002).

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 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 moelle 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.

Le biglycan et la décorine interagissent également avec les BMP (Bone Morphogenetic Protein). Des expériences ont montré que la différenciation ostéoblastique ainsi que la minéralisation de la matrice osseuse étaient fortement réduites dans des cellules

MC3T3-E1 sous-exprimant le biglycan (Parisuthiman et al, 2005). Or, ces cellules ont une réponse à la BMP-4 fortement diminuée ce qui suggèrent que le biglycan est capable de moduler la différenciation ostéoblastique, et par conséquent la minéralisation, en régulant la signalisation dépendante des BMP. La décorine, quant à elle, semble jouer un rôle important lors de la trans-différenciation des myoblastes en ostéoblastes induite par la BMP-2 (Gutierrez et al, 2005).

Des études réalisées par Grant et al, ont par ailleurs évaluées 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 VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor).

IV.2.2. Les syndecans

Les syndecans correspondent à des « heparan sulfate proteoglycans » (HSPG) transmembranaires et comportent 4 membres. Ces molécules sont des glycoprotéines membranaires de type I avec des domaines transmembranaire et cytoplasmique homologues et fortement conservés (Bernfield et al, 1992) (figure 10). 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 10). 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

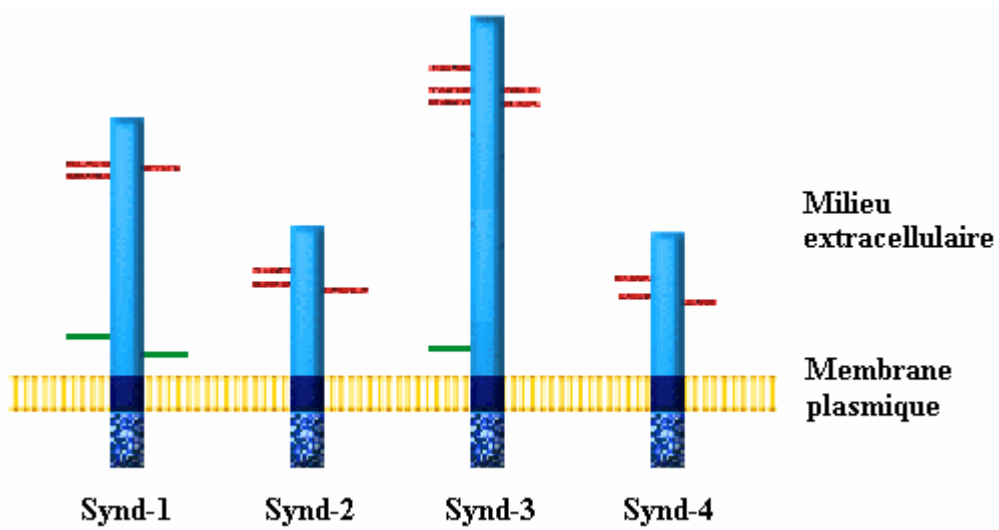


Figure 10 : Représentation schématique des syndecans.

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

protéines de la matrice extracellulaire telles que la fibronectine ou la vitronectine (Woods et Couchman, 1998). Ceci permet l'adhésion de la cellule à la matrice, et entraîne une réorganisation des microfilaments d'actine liés au domaine intra-cytoplasmique du syndecan.

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). Ces protéines sont des facteurs de croissance monomériques pouvant se lier aux molécules porteuses de chaînes d'héparane sulfate. La présence d'héparane sulfate n'est pas indispensable pour la fixation des FGF à leurs récepteurs, mais elle permet la formation de complexes de haute affinité ce qui facilite l'activation des récepteurs par de faibles concentrations de FGF (Nugent et Edelman, 1992 ; Roghani et al, 1994). 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 RANK-L 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 moelle 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 que cette molécule est capable d'inhiber la croissance et d'induire l'apoptose des cellules tumorales de myélome ; de même elle peut stimuler la croissance des ostéoblastes et inhiber celle des ostéoclastes (Dhodapkar et al, 1998). Le syndecan-1 a également un effet inhibiteur sur la dissémination des cellules tumorales et ce par l'intermédiaire d'un domaine spécifique de son axe protéique (Langford et al, 2005). Au contraire, l'accumulation de syndecan-1 soluble dans la moelle

osseuse stimule la croissance et la dissémination des cellules tumorales vraisemblablement en séquestrant des facteurs de croissance et des cytokines [FGF, HGF (Hepatocyte Growth Factor), ...] et en modulant leur activité (Seidel et al, 2000 ; Yang et al, 2002).

Des travaux récents ont par ailleurs montré qu'une surexpression du syndecan-2, par la lignée d'ostéosarcome humain MG63, est capable d'induire l'apoptose de ces cellules (Modrowski et al, 2005). En effet, le domaine intra-cytoplasmique du syndecan-2 est impliqué dans l'activation de JNK, elle-même responsable de l'augmentation de l'expression de la molécule pro-apoptotique Bax.

V. LES PATHOLOGIES OSTEOARTICULAIRES

Comme tous les tissus, le système ostéoarticulaire est le siège de dérégulations conduisant à l'apparition de diverses pathologies. En effet, le maintien de l'architecture osseuse repose sur un équilibre entre deux mécanismes fondamentaux, la résorption osseuse et la formation osseuse, toute modification de cet équilibre étant à l'origine du développement de pathologies ostéo-condensantes, ostéolytiques, bénignes ou malignes. Dans cette partie, certaines pathologies seront mentionnées à titre indicatif et plusieurs pathologies tumorales, en relation avec ce travail, seront détaillées, cette liste étant loin d'être exhaustive.

V.1. Pathologies non tumorales

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

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

conduisant soit à une diminution de l'expression de l'OPG soit à une augmentation de l'expression de RANK-L (Grimaud et al, 2003). La plus fréquente de ces affections est l'ostéoporose. C'est une maladie systémique du squelette caractérisée par une masse osseuse basse et une détérioration de l'architecture osseuse ayant pour conséquence une fragilité accrue pouvant conduire à des fractures. Cette perte du capital osseux résulte de la diminution de l'expression de l'OPG, elle-même consécutive à une chute du taux d'estrogène. Une autre perturbation du métabolisme osseux est retrouvée dans la maladie de Paget qui est une ostéopathie disséminée caractérisée par un remodelage osseux intense et anarchique à l'origine d'un tissu osseux immature et par la présence d'ostéoclastes géants.

La présence d'événements inflammatoires ou de facteurs pro-inflammatoires contribue également à la création d'un contexte favorable à la résorption osseuse. Ainsi, les maladies inflammatoires du cartilage telles que les spondylarthropathies ou la polyarthrite rhumatoïde ont des répercussions sur le tissu osseux et entraînent une dégradation osseuse. La stimulation de l'activité ostéoclastique est majoritairement indirecte et s'effectue dans un contexte cytokinique pro-inflammatoire à l'origine de l'induction de l'expression de RANK-L (Kong et al, 1999b ; Nakashima et al, 2003).

V.2. Pathologies tumorales

V.2.1. Tumeurs primitives

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

a) Tumeur à cellules géantes

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

b) Ostéosarcome

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

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

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

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

c) Sarcome d'Ewing

Le sarcome d'Ewing se définit comme une tumeur primitive maligne du tissu osseux. avec un développement, souvent important dans les parties molles, d'amas de petites cellules rondes sans différenciation cellulaire (Encyclopédie Médico-Chirurgicale, 14-756). Il s'agit

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

d) Chondrosarcome

Le chondrosarcome est une tumeur maligne primitive de l'os produisant du cartilage tumoral (Encyclopédie Médico-Chirurgicale, 14-716). Il peut être secondaire dans 10% des cas se développant sur une lésion préexistante telle un chondrome (tumeur cartilagineuse bénigne) ou une exostose ostéogène (excroissance osseuse). En fréquence il représente la deuxième grande tumeur maligne primitive du squelette. Le chondrosarcome peut survenir à tout âge mais s'observe essentiellement à partir de trente ans. Si tout le squelette peut être atteint, les sites le plus fréquemment concernés sont le pelvis et le fémur proximal. Le chondrosarcome évolue toujours sans essaimage ganglionnaire mais, par voie hématogène, il peut donner des métastases, principalement pulmonaires. Concernant les traitements, la radiothérapie est inefficace sur les tumeurs cartilagineuses et la chimiothérapie n'a jusqu'à présent pas fait la preuve de son intérêt, tant sur la tumeur primitive que sur les métastases. La chirurgie reste donc la seule possibilité thérapeutique. Les interventions limitées sont à rejeter

en raison des nombreuses récurrences locales, seules doivent être envisagées la résection et l'amputation. Dépisté tôt, et bien traité, son pronostic est de 70% de survie.

V.2.2. Tumeurs secondaires

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

V.3. Nouvelles approches thérapeutiques

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

V.3.1. Potentiel thérapeutique de la triade OPG / RANK-L / RANK

L'invasion du tissu osseux par une tumeur bénigne ou maligne, primaire ou secondaire, affecte rapidement la balance entre l'apposition et la résorption osseuse. En effet, dans la plupart des cas, la manifestation de la malignité de la tumeur osseuse se caractérise par une ostéolyse associée au développement tumoral. Or, la balance apposition/résorption est essentiellement régulée par la triade moléculaire OPG / RANK-L / RANK. Ce système est décrit comme dérégulé dans plusieurs pathologies ostéolytiques d'origine tumorale dont le myélome multiple (Giuliani et al, 2001 ; Grimaud et al, 2003). En effet, l'augmentation de l'expression de RANK-L, directement par les cellules tumorales ou indirectement par les cellules stromales ou les lymphocytes T, joue un rôle prépondérant dans la destruction osseuse consécutive à cette affection. A l'inverse, la production endogène d'OPG est soit inhibée soit trop faible pour compenser l'augmentation de l'expression de RANK-L. Le rapport RANK-L / OPG est ainsi considéré comme un index pronostic potentiel pour le myélome (Terpos et al, 2003). Par conséquent, la triade OPG / RANK-L / RANK pourrait devenir une cible moléculaire privilégiée pour le développement de nouvelles approches

thérapeutiques dans le cas d'ostéolyses d'origine tumorale mais également non tumorale. Dans certains modèles animaux de tumeurs malignes, l'utilisation thérapeutique d'OPG a permis à la fois de contrôler l'hypercalcémie maligne et l'apparition ou la progression de métastases osseuses (Capparelli et al, 2000 ; Luger et al, 2001). Actuellement, une seule étude de phase I utilisant de l'OPG recombinante a été publiée dans le cas d'ostéolyses tumorales et a confirmé l'inhibition de la résorption osseuse chez des patients atteints de myélome multiple ou de cancer mammaire présentant des lésions osseuses (Body et al, 2003). L'utilisation de la construction recombinante RANK-Fc offre également des possibilités thérapeutiques prometteuses compte tenu des résultats obtenus dans des modèles animaux de carcinome prostatique et de myélome multiple (Zhang et al, 2003 ; Sordillo et Pearse, 2003). Enfin, des essais cliniques portant sur l'utilisation d'un anticorps anti-RANK-L humain (AMG 162), dans le cadre du traitement de l'ostéoporose chez la femme post-ménopausée, sont en cours (Bekker et al, 2004). Les résultats obtenus montrent qu'une seule injection (intraveineuse ou sous-cutanée) de cet anticorps permet de diminuer durablement le taux des marqueurs du remodelage osseux. L'utilisation de ces molécules (constructions recombinantes de RANK-Fc et OPG, anticorps anti-RANK-L) pourrait devenir un champ d'applications présentant des potentiels thérapeutiques nouveaux dans le suivi de patients atteints de tumeurs osseuses pour lesquels les traitements conventionnels ont échoué.

V.3.2. Immunothérapies

L'utilité du système immunitaire dans la défense anti-tumorale a été mise en évidence à la fin du XIXème siècle par un chirurgien W.B. Coley (Armstrong et al, 2001). Celui-ci avait observé une régression tumorale chez certains patients atteints d'infections cutanées par *Streptococcus pyogenes*. En effet, la cellule tumorale représente une cible potentielle pour les mécanismes de défense et, bien que dérivant du soi, elle peut devenir immunogène. Lors de la

tumorigenèse, la cellule est généralement exposée à une instabilité génétique et peut, dans certaines conditions, présenter à sa surface des antigènes-cibles, reconnus comme étrangers par le système immunitaire (Renkvist et al, 2001 ; Davis et al, 2003).

Le mélanome et le carcinome rénal sont deux pathologies présentant une malignité et une résistance importantes aux agents de chimiothérapie. Cependant, l'expression d'antigènes tumoraux à la surface des cellules de ces carcinomes en fait des candidats intéressants pour l'élaboration de protocoles d'immunothérapie (Hsueh et al, 1998 ; Elhilali et al, 2000). Lors de la carcinogénèse, les mélanocytes tumoraux acquièrent l'expression d'antigènes tels que Melan-A/MART-1 ou la gp100/Pmel17 et cependant le taux de survie à long terme est très faible en l'absence de prise en charge du malade (Panelli et al, 2000). Ces antigènes, absents des mélanocytes normaux, présentent alors un fort potentiel pour l'élaboration de protocoles d'immunothérapie. L'ostéosarcome présente des propriétés similaires. Les cellules transformées, dérivant de cellules osseuses normales, acquièrent l'expression d'antigènes tumoraux tels que MAGE-1 (melanoma-associated antigen 1), 2, 3, 6 (Sudo et al, 1997), SART-1 (squamous cell carcinoma antigen recognized by T cells 1) et SART3 (Ishida et al, 2000 ; Tsuda et al, 2001). Ces antigènes sont normalement absents de l'environnement cellulaire osseux dans les conditions physiologiques et représentent ainsi une cible pour les effecteurs de la réponse immunitaire.

A l'heure actuelle, les protocoles d'immunothérapie sont largement étudiés et représentent un potentiel considérable dans la lutte contre le cancer. Ces protocoles sont classés selon leur mode d'action. Ainsi on distingue d'une part, des protocoles d'immunothérapie passive, consistant à amplifier les effecteurs immunitaires déjà présents au niveau de la réponse anti-tumorale (Dudley et al, 2003) [Lymphocytes T Cytotoxiques (CTLs) dirigés contre des antigènes tumoraux, Lymphocytes Infiltrant les Tumeurs (TIL) ou anticorps dirigés contre les cellules tumorales], et d'autre part, des protocoles

d'immunothérapie active principalement ciblés sur l'utilisation de cytokines (Rosenberg et al, 1999 ; Elhilali et al, 2000 ; Lens et Dawes, 2002) ou de cellules présentatrices d'antigènes, telles que les cellules dendritiques, destinées à orienter et à stimuler les effecteurs de la réponse immunitaire contre les cellules tumorales (Panelli et al, 2000).

VI. OBJECTIFS DU TRAVAIL

La triade OPG / RANK-L / RANK est, comme nous l'avons vu précédemment, un élément clé pour le maintien de l'équilibre entre résorption et apposition au sein du tissu osseux. Dans ce système l'OPG est classiquement décrite comme un récepteur se liant à RANK-L, empêchant l'interaction ultérieure de ce dernier avec RANK, et ayant ainsi un effet inhibiteur indirect sur la différenciation ostéoclastique et la résorption osseuse. Cependant, des travaux réalisés par l'équipe d'Hakeda ont mis en évidence un effet inhibiteur direct de l'OPG sur l'activité de résorption des ostéoclastes (Hakeda et al, 1998). Cette équipe suggère alors la présence, à la surface de ces cellules, d'un ou plusieurs récepteurs spécifiques de l'OPG. Dans ce contexte, ce travail a porté sur l'étude des mécanismes impliqués dans l'activité biologique de l'OPG dans deux modèles d'ostéoclastogenèse : un modèle d'ostéoclastes purifiés de lapereaux et un modèle de précurseurs ostéoclastiques murins, la lignée RAW 264.7.

Des études récentes ont par ailleurs mis en évidence le rôle prépondérant des protéoglycanes, et en particulier de la famille des syndecans, dans la biologie de l'OPG. En effet, Standal et al ont montré que, sur des cellules de myélome, l'OPG pouvait se fixer, être internalisée puis dégradée et ce *via* le syndecan-1 (Standal et al 2002). L'implication des protéoglycanes dans le système OPG / RANK-L / RANK a donc été également étudiée.

La deuxième partie de ce travail porte sur l'élaboration d'une nouvelle approche thérapeutique des tumeurs osseuses primitives. Comme décrit précédemment, le traitement de ces pathologies est basé sur une exérèse de la tumeur associée à une chimiothérapie lourde et souvent mal tolérée. De plus, la survie est étroitement corrélée à la réponse des cellules tumorales aux drogues anti-mitotiques, atteignant 70% à 5 ans dans les meilleures séries. La réponse à ce traitement de référence est donc insuffisante dans le cadre des tumeurs osseuses primitives malignes. Nous nous sommes ici intéressés à une approche d'immunothérapie

adoptive visant à extraire puis amplifier des TIL, à partir de différentes tumeurs osseuses. Les TIL ainsi obtenus seront ensuite caractérisés afin de déterminer leur intérêt thérapeutique. Ces travaux sont réalisés à partir de biopsies humaines mais également de tumeurs provenant d'un modèle d'ostéosarcome chez le rat.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. ÉTUDE DE L'ACTION DE L'OPG SUR LES OSTEOCLASTES PURIFIÉS DE LAPIN

I.1. Obtention des ostéoclastes purifiés de lapin

I.1.1. Obtention des cellules osseuses totales

Prélèvement des os

Des lapereaux de 11 jours sont euthanasiés par rupture des vertèbres cervicales. Les os longs sont prélevés puis placés dans un tube contenant 20 ml de milieu α MEM (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) supplémenté avec 1% d'antibiotiques (100 UI/ml de pénicilline et 100 μ g/ml de streptomycine) et 2 mM de L-glutamine (Cambrex, Verviers, Belgique).

Obtention des cellules osseuses

Les os sont nettoyés avec des compresses et les extrémités cartilagineuses sont délicatement enlevées. Les os sont alors placés dans un tube (tube 1) de 50 ml contenant 5 ml de milieu α MEM puis broyés avec des ciseaux longs. Trente cinq ml de milieu sont alors ajoutés et le tube est agité fortement pendant 30 à 40 secondes. Après une sédimentation de 2 minutes (min), les 20 ml supérieurs contenant les cellules osseuses en suspension sont prélevés et déposés dans un nouveau tube (tube 2). Vingt ml de milieu sont rajoutés dans le tube 1 puis les étapes précédentes sont répétées : agitation au vortex, sédimentation et prélèvement des 20 ml supérieurs qui sont ajoutés au contenu du tube 2. Ce dernier est ensuite centrifugé 3 min à 50 g à température ambiante (24°C). La totalité du surnageant obtenu est transférée dans un troisième tube qui est centrifugé 10 min à 550 g. Le surnageant est éliminé et le culot de cellules osseuses est remis en suspension dans 10 ml de milieu. Après avoir été numérees, les cellules sontensemencées en plaques 24 puits à raison de 10^7 cellules par puits, ou dans des flasques de 25 ou 75 cm² à une densité de $2,5 \times 10^6$ cellules/cm², dans du milieu α MEM contenant 10% de SVF (Dominique Dutscher, Brumath, France) et 1%

d'antibiotiques, puis cultivées pendant 3 jours dans une atmosphère humide avec 5% de CO₂ – 95% d'air à 37°C.

I.1.2. Purification des ostéoclastes

Les ostéoclastes sont purifiés grâce à une technique utilisant une solution de pronase-EDTA. Cette technique est basée sur le fait que les ostéoclastes adhèrent plus fortement au support de culture que les autres cellules osseuses, il est donc possible d'effectuer un décollement séquentiel des cellules, les ostéoclastes se décollant en dernier.

Après avoir éliminé le milieu de culture et rincé les puits avec du milieu sans sérum, 500 µl d'une solution de PBS / pronase 0,001% / EDTA 0,02% sont ajoutés dans chaque puits et le détachement des cellules est suivi au microscope. Quand la majorité des petites cellules mononucléées est décollée (environ 2 min après le début de l'incubation), l'enzyme est enlevée et un rinçage avec du milieu est effectué. Les puits contiennent alors des précurseurs ostéoclastiques et des ostéoclastes matures purifiés qui sont maintenus en culture pendant 24 heures en milieu α MEM sans sérum, en présence des facteurs à étudier. Cette technique permet d'obtenir une pureté en ostéoclastes matures de 95%.

I.2. Détermination de l'expression des transcrits MMP2 et MMP9 par RT-PCR

I.2.1. Extraction des ARN totaux

Les ostéoclastes de lapin sont incubés 24 heures en présence d'OPG (Amgen Inc., Thousand Oaks, USA) à différentes concentrations (10, 50 et 100 ng/ml), puis sont lysés avec le réactif TRIzol (Invitrogen). Un grattage du tapis cellulaire est également effectué afin de récupérer le maximum de matériel. Après 10 min d'incubation à température ambiante, 0,2 volume de chloroforme sont ajoutés, afin d'éliminer le phénol contenu dans le TRIzol, suivi

d'une agitation de 15 secondes. Le mélange est incubé 3 min à température ambiante, puis une centrifugation de 15 min à 4°C à 11500 g est ensuite réalisée. Dans ces conditions, les ARN sont présents dans la phase aqueuse, la plupart des protéines et les petits fragments d'ADN dans la phase organique et les protéines et les gros fragments d'ADN demeurent au niveau de l'interface. Après avoir prélevé la phase aqueuse, 0,5 volumes d'isopropanol sont ajoutés afin de précipiter les ARN. Après 10 min d'incubation à température ambiante, une centrifugation est effectuée à 11500 g à 4°C pendant 10 min. Le culot d'ARN est repris dans un volume d'éthanol 75% puis incubé 10 min à température ambiante et centrifugé 10 min à 7500 g à 4°C. Le culot d'ARN est ensuite séché à température ambiante puis dissout dans 20 µl d'eau DEPC [diéthylpyrocarbonate, inhibiteur des RNAses (Ribonucléases)] et incubé 10 min à 60°C pour dissoudre les ARN. La quantité d'ARN est estimée en mesurant la densité optique (DO) à 260 nm et le degré de pureté est vérifié par le rapport DO_{260}/DO_{280} .

I.2.2. Vérification de l'intégrité des ARN

Une électrophorèse en gel d'agarose/formaldéhyde est réalisée pour vérifier l'intégrité des ARN et pour confirmer l'exactitude de la mesure de la concentration d'ARN. Un microgramme d'ARN est mélangé à 5 µl de tampon de charge puis chauffé 5 min à 80°C. Les échantillons sont ensuite déposés dans le gel. Des PCR sont également réalisées directement sur l'ARN afin de vérifier que les extractions ne contiennent pas d'ADN génomique qui pourrait interférer avec les résultats obtenus.

I.2.3. Reverse transcription (RT)

Dans un tube PCR le volume nécessaire pour 5µg d'ARN totaux extraits est ajouté à 1µl de random primers (amorces aléatoires). Le volume de cette solution est ajusté à 30 µl

avec de l'eau DEPC. Cette solution subit une dénaturation à 95°C pendant 5 min suivie d'une hybridation des oligo-dT aux queues poly-adiénylées à 65°C pendant 10 min. Après cette étape, 20 µl du mélange réactionnel suivant sont ajoutés :

- 10 µl de tampon 5X (Invitrogen)
- 5µl de dithiothréitol (DTT) à 100mM (Invitrogen)
- 2,5 µl de désoxyribonucléotides tri-phosphate (dNTP) à 10mM (Eurobio, Courtaboeuf, France)
- 0.5 µl de Rnasine (Invitrogen)- inhibiteur des RNases
- 2 µl de MMLV-RT : Murine Moloney Virus-Reverse Transcriptase 200 U/µl (Invitrogen)

Cette solution subit une polymérisation à 37°C pendant une heure et les complexes ARNm/ADNc ainsi que la reverse transcriptase sont dénaturés à 95°C pendant 5 min. Les produits issus de la reverse transcription sont conservés à -20°C.

I.2.4. Polymerase Chain Reaction (PCR)

a) Réaction de PCR

La réaction de PCR est effectuée dans un mélange réactionnel contenant :

- 2 µl de produit de RT
- 5 µl de tampon PCR 10X (Roche, Meylan, France)
- 3 µl de MgCl₂ (25 mM) (Roche)
- 2 µl de dNTP (10 mM) (Eurobio)

Molécule	Séquences	Taille (pb)	Conditions (T_m ; nombre de cycles)
18S	S : 5'- TCAAGAACGAAAGTCGGAGGTTTCG - 3' AS : 5'- TTATTGCTCAATCTCGGGTGGCTG - 3'	462	62 °C 26 cycles
MMP2 de lapin	S : 5'- AAGGCCAAGTGGTCCGTGTGAA - 3' AS : 5'- AACAGTGGACATGGCGGTCTCAG - 3'	370	49 °C 28 cycles
MMP9 de lapin	S : 5'- TGGCCGGCCACTGTGCGCCCCTCCGAG - 3' AS : 5'- CACTAGGTTACCTCGTTCCGGGTACT - 3'	662	49 °C 28 cycles
RANK de souris	S : 5'- AAGATGGTTCCAGAAGACGGT - 3' AS : 5'- CATAGAGTCAGTTCTGCTCGGA - 3'	350	68 °C 35 cycles
RANK-L de souris	S : 5'- CAGCATCGCTCTGTTCCCTGTA - 3' AS : 5'- TCTCAGTCTATGCCTGAACTTTGAAAGC - 3'	736	61 °C 40 cycles
Syndecan-1 humain	S : 5'- AGCCAAGCTGACCTTCACAC - 3' AS : 5'- GTTTGGTGGGCTTCTGGTAG - 3'	403	60 °C 40 cycles

Tableau 3 : Séquences oligonucléotidiques des différents primers utilisés en RT-PCR, conditions d'utilisation et taille des fragments amplifiés.

- 0,25 µl de Taq polymérase (5 U/µl) (Roche)
- 30 pmoles de chaque amorce sens et anti-sens (tableau 3)

Les conditions de réaction et le nombre de cycles de PCR sont déterminés pour chaque couple d'amorces (tableau 3). Ainsi, pour chaque gène, des nombres de cycles croissants sont réalisés afin de déterminer le nombre de cycles permettant de se situer dans la partie linéaire de la courbe d'amplification. Le gène du 18S est utilisé comme gène de référence. Chaque PCR est réalisée à partir de trois produits de RT différents.

b) Analyse des produits de PCR

Les produits de PCR sont analysés sur un gel d'agarose 1% contenant du bromure d'éthidium. Après migration, les produits de PCR sont visualisés sous UV puis enregistrés. L'intensité des bandes est mesurée à l'aide d'un logiciel d'analyse d'image (ImageQuant, Molecular Dynamics). L'expression relative des différents gènes est calculée en fonction de l'intensité du signal du 18S.

I.3. Détermination de l'activité des métalloprotéases par zymographie

I.3.1. Préparation des cellules et récupération des surnageants

Les ostéoclastes sont cultivés comme décrit précédemment puis, après 24 heures d'incubation en présence des facteurs à tester, les surnageants sont récupérés et congelés à -20°C jusqu'à analyse. Un dosage protéique est également effectué (cf. § I.3.) pour déterminer la quantité globale de protéine contenue dans chaque surnageant de façon à déposer une quantité identique dans chaque puits.

Le facteur testé ici est l'OPG à différentes concentrations : 10, 50 et 100 ng/ml. Dans certaines expériences, avant l'ajout d'OPG à 50 ng/ml, les cellules sont pré-incubées pendant

1 heure en présence ou non d'inhibiteurs de différentes voies de transduction : inhibiteur de la PI₃ Kinase (Wortmannin à 500 nM, SIGMA, Saint Quentin Falavier, France), inhibiteur des tyrosines kinases (Génistéine à 200 µM, SIGMA), inhibiteur de la protéine kinase A (PKI 5-24 à 100 nM, Calbiochem, La Jolla, USA), inhibiteur de la PKC et des kinases AMPc dépendantes (H7 dihydrochloride à 100 µM, SIGMA), inhibiteur de ERK1 et ERK2 (PD98059 à 40 µM, Calbiochem), inhibiteur de Ras (FPT inhibitor II à 40 µM, Calbiochem) et inhibiteur de p38 (SB203580 à 0,1 et 10 µM, Calbiochem).

I.3.2. Zymographie

Un gel de polyacrylamide à 10% contenant 0,2% de gélatine est réalisé. Les échantillons sont dilués au quart dans le tampon d'échantillon et puis chargés en ajustant le volume de façon à avoir la même quantité de protéine dans chaque puits. La migration s'effectue à 100 V jusqu'à la sortie du bleu du gel.

Le gel est ensuite lavé deux fois pendant 30 min dans une solution composée de Tris HCl 50 mM pH 7,6, CaCl₂ 5 mM, Triton X100 à 2,5% permettant la renaturation des protéines. Après deux rinçages à l'eau distillée, le gel est lavé deux fois dans une solution composée de Tris HCl 50 mM pH 7,6, CaCl₂ 5 mM. Une incubation de 24 à 48 heures à 37°C est alors réalisée dans le tampon de digestion (Tris HCl 50 mM pH 7,6, CaCl₂ 5 mM, d'azide 0,02%). La révélation s'effectue en colorant le gel au bleu de Coomassie puis en réalisant des lavages dans la solution de décoloration. Il est possible d'observer, à l'endroit où la protéine a migré, une bande blanche correspondant à la dégradation de la gélatine.

L'analyse des résultats est réalisée grâce au logiciel de traitement d'image ImageQuant (Molecular Dynamics).

I.3.3. Analyse statistique

L'écart-type est calculé pour chacune des conditions et comparé grâce au test ANOVA. Les résultats sont considérés comme significatifs lorsque $P < 0,05$.

I.4. Dosage protéique

Les protéines contenues dans les surnageants de culture sont dosées par la méthode BCA. Ce dosage a pour objectif la détermination de la quantité de protéine contenue dans chaque échantillon de façon à ce que les dépôts effectués par la suite contiennent une quantité identique de protéine.

Dans une plaque 96 puits à fond rond, 10 μ l de surnageant de culture sont mis en présence de 200 μ l de réactif BCA (sulfate de cuivre dilué au 1/50 dans une solution d'acide bicinchoninique, SIGMA). Une gamme contenant 10 μ l d'albumine bovine sérique (BSA) à différentes concentrations et 200 μ l de réactif BCA est réalisée en parallèle. La plaque est ensuite incubée pendant 30 min à 37°C puis les densités optiques sont lues à 570 nm.

II. ÉTUDE DE L'ACTION DE L'OPG SUR LA LIGNÉE RAW 264.7

II.1. Culture cellulaire

II.1.1. Lignée cellulaire RAW 264.7

La lignée 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 RANK-L.

Les cellules sont cultivées en milieu α MEM 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 incuber pendant 2/3 min à 37°C afin d'éliminer les macrophages qui ré-adhèrent au plastique. Les cellules surnageantes sont ensuite collectées, centrifugées puis remises en culture dans une atmosphère humide avec 5% de CO₂ – 95% d'air à 37°C.

La différenciation des RAW 264.7 en cellules ostéoclastiques est obtenue en les cultivant 10 jours en présence de RANK-L à 50 ng/ml (Amgen Inc.) avec changement de milieu tous les deux jours.

II.1.2. Lignée cellulaire 2.93 RANK-L

Il s'agit d'une lignée de cellules de rein fœtal humain transfectées par l'ADNc codant pour RANK-L de souris, obtenue grâce au Dr R. Josien (Inserm U643, Nantes, France). Elles sont cultivées en milieu DMEM (Cambrex) supplémenté avec 10% de SVF dans une atmosphère humide avec 5% de CO₂ – 95% d'air à 37°C. A confluence, leur décollement

s'effectue par une trypsination (solution de trypsine EDTA-PBS, Cambrex) quelques minutes à 37°C.

II.2. Détermination de l'expression des transcrits RANK et RANK-L par PCR

Les ARN totaux de cellules 2.93 RANK-L et de cellules RAW 264.7 différenciées ont été extraits comme décrit précédemment. Après reverse transcription, l'expression de RANK et de RANK-L a été déterminée par PCR, en comparaison au 18S, en utilisant les conditions et amorces répertoriées dans le tableau 3.

II.3. Étude des voies de signalisation dépendantes de l'OPG par western blot

II.3.1. Préparation des lysats cellulaires

Les cellules RAW 264.7 différenciées en cellules ostéoclastiques sont cultivées sans sérum pendant 24 heures puis mises en présence ou non d'OPG à 50 ng/ml pendant 2, 5, 10, 15 ou 30 min. Dans une autre série d'expériences les cellules sont incubées pendant 5 min en présence ou non d'OPG ou de RANK-L à 50 ng/ml, avec ou sans anticorps anti-RANK-L à 4 µg/ml (R&D System, Abington, GB). Dans certains cas, après la période de culture sans sérum, les cellules sont mises en présence de RANK-L à 50 ng/ml pendant 2 heures puis lavées ou non avant leur incubation avec les facteurs décrits précédemment.

Après ces différentes incubations les plaques de culture sont placées sur de la glace et les puits sont rincés avec du PBS froid. Le tampon de lyse est alors ajouté dans chaque puits (50 µl pour les puits d'une plaque 24 puits et 200 µl pour ceux d'une plaque 6 puits) et les plaques sont placées à 4°C sous agitation pendant 30 min. Les lysats cellulaires sont ensuite récupérés dans des tubes Eppendorf puis centrifugés à 10000 g pendant 15 min à 4°C. Ces lysats sont alors conservés à -20°C jusqu'à analyse.

II.3.2. Migration et transfert

Les lysats cellulaires sont dilués au demi dans le tampon de charge et portés à ébullition pendant 5 min. Ces dilutions sont ensuite chargées dans les puits d'un gel dénaturant à 10% d'acrylamide. Le volume chargé est ajusté de façon à avoir la même quantité de protéine dans chaque puits (cf. dosage protéique § I.3.). La migration est réalisée dans un tampon dénaturant (Tris 25 mM, glycine 192 mM, SDS 0,1%) avec un courant de 20 mA par gel et est stoppée dès la sortie du gel du tampon de charge.

Les protéines qui ont préalablement été séparées par électrophorèse sont transférées sur une membrane de PVDF (polyfluorure de vinylidène ; Immobilon™-P, Millipore, Watford, G.B.). Le transfert est réalisé dans une cuve spéciale (Transphor Tank Transfer Unit, Amersham Biosciences, Piscataway, USA) contenant du tampon composé de Tris 25 mM, glycine 192 mM, méthanol 20% sur une période de 16 heures avec un courant de 40 mA.

II.3.3. Marquage et révélation

Après le transfert, la membrane est rincée deux fois dans une solution de PBS / Tween-20 0,05% puis une étape de saturation est réalisée en incubant la membrane 30 min à température ambiante sous agitation dans la solution de saturation 1 (PBS / Tween-20 0,05% / BSA 3%). La membrane est ensuite incubée en présence d'anticorps anti-phospho-ERK1/2, anti-phospho-p38 (Ozyme, Saint-Quentin en Yvelines, France), anti-ERK1/2 ou anti-p38 (R&D System) dilués au 1/1000^{ème} dans la solution de saturation 1 (concentration finale de 1 µg/ml) et incubée 2 heures sous agitation à température ambiante.

Cinq lavages de 10 min chacun dans une solution de PBS / Tween-20 0,05% sont réalisés, puis une nouvelle étape de saturation de 15 min avec la solution 2 (PBS / Tween-20 0,05% / lait en poudre sans lipides 5%) est effectuée. La membrane est alors incubée, pendant

45 min sous agitation à température ambiante, avec un anticorps anti-IgG de souris ou anti-IgG de lapin couplés à la peroxydase (Chemicon International Inc., Temecula, USA) dilué dans la solution de saturation 2 de façon à obtenir une concentration finale de 50 mU/ml, puis 5 lavages de 10 min dans la solution de PBS / Tween-20 0,05% sont effectués.

La révélation est réalisée en incubant la membrane 1 min dans une solution ECL (BM Chemiluminescence Blotting substrate, Roche) contenant le substrat de l'enzyme peroxydase, le luminol.

II.4. Cytométrie en flux

Les cellules RAW 264.7 sont cultivées 10 jours en présence de RANK-L comme décrit précédemment. Au terme de cette période de culture, la présence de RANK-L sur la surface cellulaire est déterminée par cytométrie en flux.

Les cellules décollées grâce à une solution de PBS/EDTA 0,5 mM (Invitrogen) sont lavées deux fois dans une solution de PBS puis réparties dans une plaque 96 puits à fond conique à raison de $2 \cdot 10^5$ cellules par puits. Elles sont ensuite incubées 15 min à température ambiante dans une solution de PBS/BSA 1% puis marquées pendant 1 heure à 4°C avec 0,2 µg d'un anticorps anti-RANK-L humain biotinylé (Peprotech, Londres, GB), dilué dans du PBS/BSA 1%. Trois lavages dans du PBS sont alors réalisés puis les cellules sont incubées 45 min avec de la streptavidine couplée à la phycoérythrine (SIGMA). Après trois lavages dans du PBS les cellules sont analysées par cytométrie en flux (FACs calibur, BD Biosciences, San José, USA).

III. ÉTUDE DES INTERACTIONS MOLÉCULAIRES ENTRE OPG, RANK-L, RANK ET LES GLYCOSAMINOGLYCANES

III.1. Expériences de résonance plasmonique de surface (BIAcore)

Le fonctionnement de l'appareil BIAcore est basé sur le phénomène optique de résonance plasmonique de surface. Cet appareil permet l'analyse d'interactions biospécifiques en temps réel dans un débit continu de tampon. Les molécules étudiées sont immobilisées par couplage amine sur des *sensor chips* de dextran carboxylé puis différentes molécules susceptibles d'interagir avec ce support (analytes) sont injectées en solution. L'intensité des fixations est quantifiée en unité de résonance (RU).

Les expériences ont ici été réalisées avec un BIAcore 2000 (BIAcore, Uppsala, Sweden) présent au sein de l'IFR 26 de Nantes.

III.1.1. Immobilisation

L'immobilisation d'une molécule sur le support de dextran s'effectue en trois phases :

- activation des groupements carboxyles du dextran par une solution de EDC-NHS (carbo-diimide, N-hydroxysuccinimide).
- passage de la molécule à immobiliser diluée dans un tampon dont le pH est inférieur au point isoélectrique de la molécule. Il y a alors association entre les groupements amines de la protéine et les groupements carboxyles activés du dextran.
- inactivation des sites n'ayant pas été utilisés pour la fixation de la protéine, par une solution d'éthanolamine.

L'OPG (à 2 ou 71 µg/ml dans du maléate de sodium 5 mM, pH 6,0), RANK-L (à 5 µg/ml dans du maléate de sodium 5 mM, pH 5,75) et RANK (à 1 ou 10 µg/ml dans de

l'acétate de sodium 10 mM, pH 5,0) sont immobilisés de manière covalente sur la matrice de dextran d'une *sensor chip* CM5 (BIAcore) à un débit de 5 µl/min.

L'héparine biotinylée de la muqueuse intestinale de porc, obtenue grâce au Pr S. Ricard-Blum (Institut de biologie structurale - CEA-CNRS-UJF, Grenoble, France) est injectée sur une *sensor chip*-SA (streptavidine) (BIAcore) dans une solution d'Hepes 10 mM, pH 7,4, NaCl 0,3 M, surfactant P20 0,005%, à un débit de 10 µl/min.

III.1.2. Injection des analytes et analyses des résultats

Les molécules étudiées sont diluées à la concentration souhaitée puis injectées en flux constant à la surface de la *sensor chip*. L'intensité de la fixation (ou réponse) s'exprime en unité de résonance (RU) et 1000 RU correspondent à la fixation de 1 ng de protéine par mm² de surface. Une réponse est considérée comme significative à partir de 50 RU.

Pour les expériences avec OPG, RANK-L ou RANK immobilisés, les molécules à tester sont diluées puis injectées à la surface de la *sensor chip* dans du tampon Hepes 10 mM, pH 7.4 contenant du NaCl 0,15 M, de l'EDTA 3 mM et du surfactant P20 0,005% (tampon HBS-EP, BIAcore) à un débit de 5 µl/min.

Pour les expériences avec l'héparine immobilisée, les molécules à tester sont diluées puis injectées dans du tampon Hepes 10 mM, pH 7.4 contenant du NaCl 0,15 M et du surfactant P20 0,005% (tampon HBS-P, BIAcore) à un débit de 10 µl/min.

Un sensorgramme « contrôle » correspondant à l'injection des molécules à tester sur la matrice de dextran seule est toujours réalisé en parallèle, ainsi, par soustraction avec les sensorgrammes « essai », la fixation réelle de la molécule testée peut être déterminée. Les sensorgrammes obtenus sont analysés grâce au logiciel BIAevaluation.

III.2. Oligosaccharides et héparines sélectivement désulfatées

Parmi les molécules testées dans les expériences de résonance plasmonique de surface, se trouvent des oligosaccharides et des molécules d'héparines sélectivement désulfatées. Ces molécules nous ont généreusement été données par le Pr J. Gallagher (Département d'Oncologie Médicale, Christie Hospital NHS Trust, Manchester, GB).

Les molécules d'héparine sélectivement désulfatées sont produites suivant les protocoles décrits dans l'article de 2000 de Lyon et al. La molécule d'héparine initiale contient 97,7% de groupes *N*-sulfate, 89,3% de groupes 2-*O*-sulfate et 92,4% de groupes 6-*O*-sulfate. L'héparine *N*-désulfatée ou *N*-désulfatée/*N*-ré-acétylée contient 90,5% de groupes 2-*O*-sulfate, 85,3% de groupes 6-*O*-sulfate et un faible pourcentage de groupes *N*-sulfate résiduels (2,4%). L'héparine 2-*O*-désulfatée contient 80,2% de groupes 6-*O*-sulfate, 91,4% de groupes *N*-sulfate et 2,2% de groupes 2-*O*-sulfate résiduels. L'héparine 6-*O*-désulfatée contient 98,2% de groupes *N*-sulfate, 54,7% de groupes 2-*O*-sulfate et 4,2% de groupes 6-*O*-sulfate résiduels.

Les oligosaccharides sont produits suivant le protocole décrit dans l'article de 2002 de Goger et al. L'héparine est digérée par de l'héparinase (SIGMA) et les oligosaccharides obtenus sont séparés par chromatographie grâce à une colonne Bio-Gel P-10.

IV. ÉTUDE DE LA FIXATION D'OPG RADIOMARQUÉE

IV.1. Culture cellulaire

Les cellules 2.93 RANK correspondent à une lignée de cellules de rein fœtal humain transfectées par l'ADNc codant pour RANK humain, obtenue grâce au Dr N. Sakurai (Tanabe Research Laboratories, San Diego, USA). Elles sont cultivées en milieu DMEM (Cambrex) supplémenté avec 10% de SVF dans une atmosphère humide avec 5% de CO₂ – 95% d'air à 37°C. A confluence, leur décollement s'effectue par une trypsination (solution de trypsine EDTA-PBS, Cambrex) quelques minutes à 37°C. Les cellules 2.93 non transfectées sont cultivées dans les mêmes conditions.

IV.2. Radiomarquage de l'OPG à l'iode 125

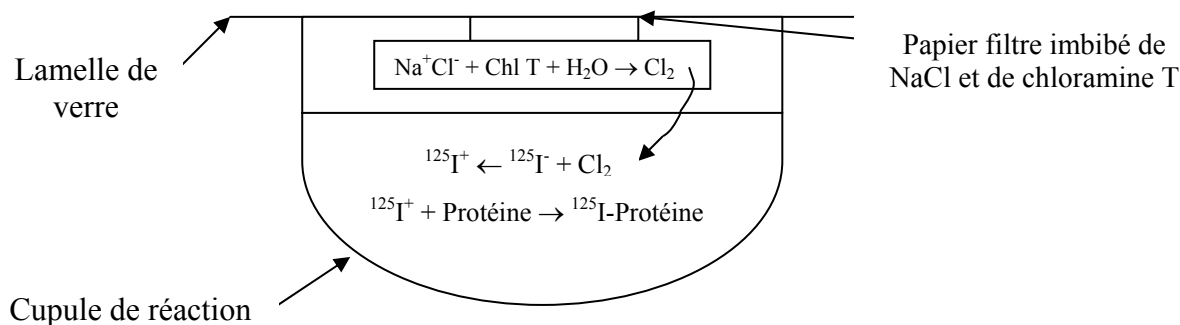
IV.2.1. Principe

L'OPG est iodinée suivant la méthode décrite par Tejedor et Ballesta en 1982. Cette technique consiste à fixer de l'iode 125 (¹²⁵I) sur les noyaux aromatiques de la protéine à marquer (essentiellement sur les tyrosines et sur quelques histidines), par la substitution d'atomes d'hydrogène. L'iode ne peut réagir sur les cycles aromatiques que sous la forme cationique I⁺. Ce cation est obtenu par oxydation d'ions ¹²⁵I⁻ grâce à divers agents chimiques tels que l'iodogène ou la chloramine T. Deux atomes d'¹²⁵I peuvent se fixer par molécule de tyrosine.

Pour le radiomarquage de l'OPG, la chloramine T est utilisée comme agent oxydant, mais contrairement à la technique standard qui met en contact direct l'oxydant et le substrat, nous utilisons un système à deux phases. Par cette méthode nous diminuons les risques de dénaturation de la protéine.

Les deux phases de la réaction sont les suivantes :

- une phase liquide contenant la cytokine et $I^{125}Na$
- une phase solide génératrice de chlore gazeux à partir de la chloramine T.



IV.2.2. Préparation du matériel et iodation de la cytokine

Une pastille de papier filtre de 1 cm de diamètre imbibée de NaCl 1 M et séchée à température ambiante est déposée sur une lamelle de verre. Une cupule en polypropylène (environ 1 cm de diamètre et 1 cm de profondeur) est fixée sur un support. Un tube en verre contenant 16 mg de chloramine T est préparé (SIGMA).

Dans la cupule de réaction 5 μ g de cytokine et 5 μ l d' $I^{125}Na$ soit 0,5 μ Ci (Amersham) sont ajoutés à du tampon phosphate 100 mM, Tween 20 0,02%, pH 7,4 pour un volume final de 50 μ l (phase liquide de la réaction). Les bords de la cupule sont enduits de graisse de silicone afin d'assurer une bonne étanchéité.

La chloramine T est dissoute dans 1 ml de tampon borate 25 mM, pH 8,5 puis 30 μ l de cette solution sont déposés sur la pastille de papier filtre posée sur la lamelle de verre (phase solide). La réaction est initialisée en renversant la lamelle sur la cupule.

Une incubation de 10 min à température ambiante est réalisée puis l'opération est renouvelée avec une nouvelle pastille de papier filtre et une nouvelle solution de chloramine T. Après ces deux étapes de 10 min la réaction est stoppée en ajoutant dans la cupule 20 μ l de

KI 100 mM : le chlore gazeux se fixe au potassium pour former du KCl est des ions I⁻. Deux microlitres de ce mélange sont prélevés pour une précipitation à l'acide trichloracétique.

IV.2.3. Séparation de l'iode libre et de la cytokine radiomarquée

La séparation de l'iode libre et de la cytokine radiomarquée s'effectue par chromatographie d'exclusion-diffusion sur une colonne de Sephadex G25 medium (Pharmacia, Suède). L'¹²⁵I libre de faible poids moléculaire sera éluée plus tardivement que les cytokines radiomarquées.

Le gel est mis à gonfler dans du tampon phosphate 100 mM, Tween 20 0,02%, pH 7,4 puis coulé dans une pipette de 5 ml dont l'extrémité est bouchée par une bille de verre. Le milieu réactionnel est déposé à la surface de la colonne et élué avec du tampon phosphate. L'éluat est recueilli dans une série de tubes en verre par fractions de cinq gouttes. Après comptage de la radioactivité présente dans le premier pic d'éluat, les deux tubes présentant la radioactivité la plus élevée sont conservés et réunis. Deux microlitres de cette solution sont prélevés pour un comptage de la radioactivité au compteur gamma LKB (détermination de la radioactivité de la protéine en cpm/μl) et 2 μl sont également prélevés pour une précipitation à l'acide trichloracétique.

IV.2.4. Rendement de l'iodation

Le calcul du rendement de l'iodation repose sur la précipitation de la protéine radiomarquée par l'acide trichloracétique (TCA) 30% (SIGMA).

Les 2 μl prélevés avant et après passage sur la colonne sont mélangés à 500 μl de PBS-BSA 0,5% et 200 μl de TCA 30%. Les tubes sont agités au vortex et placés 20 min à 4°C. Après cette incubation 100 μl sont prélevés pour un comptage de la radioactivité totale

avant et après passage sur la colonne. Le reste est centrifugé 2 min à 10000g et 100 µl du surnageant sont prélevés puis comptés dans un compteur gamma LKB.

Interprétation :

- la radioactivité totale (T) correspond à la radioactivité de ^{125}I et de la cytokine marquée.
- la radioactivité du surnageant (S) correspond à la radioactivité de ^{125}I libre (la protéine marquée ayant été précipitée par le TCA).

Il est alors possible de calculer le pourcentage de TCA précipitable qui correspond au pourcentage de ^{125}I initial ayant servi à marquer la cytokine :

$$\% \text{ de TCA précipitable} = [1 - (S/T)] * 100$$

IV.2.5. Calcul de la radioactivité spécifique (RAS) et de la concentration de la molécule radiomarquée

Calcul de la RAS

Sachant que :

- T_{AC} = radioactivité totale avant colonne, en cpm
- S_{AC} = radioactivité du surnageant avant colonne, en cpm
- Q = quantité de protéine initiale, en gramme
- PM = poids moléculaire de la protéine en g/mol

il est possible de définir :

$$\text{RAS (cpm/fmol)} = \frac{(T_{AC} - S_{AC}) * 7 * 35}{(Q / PM) / 10^{-15}}$$

Calcul de la concentration de la molécule radiomarquée

Connaissant la radioactivité de la protéine radiomarquée en cpm/ μ l et la RAS, il est possible de déterminer la concentration de la protéine :

$$\text{Concentration de la protéine radiomarquée (mol/L)} = \frac{\text{radioactivité de la protéine (cpm}/\mu\text{L)} * 10^6}{\text{RAS (cpm/fmol)} * 10^{15}}$$

IV.3. Etude de la fixation d'OPG radiomarquée sur les cellules 2.93 RANK-L ou 2.93 RANK

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 min 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.

IV.3.1. Technique

Préparation des cellules

Après avoir été lavées deux fois dans leur milieu de culture et numérotées, les cellules 2.93 et 2.93 RANK-L sont centrifugées pendant 5 min à 550 g puis remises en suspension dans du PBS-BSA 0.5% à une concentration de 40×10^6 cellules par ml. Après avoir été décollées puis lavées dans leur milieu de culture, les cellules 2.93 RANK sont incubées en présence ou non de RANK-L à 500 ng/ml pendant 45 min à 4°C ou à température ambiante. Les cellules sont alors lavées deux fois puis remises en suspension dans du PBS-BSA 0.5% à une concentration de 40×10^6 cellules par ml.

Dilutions de l'OPG radiomarquée

Dans une plaque 96 puits fonds ronds une première dilution est effectuée dans un volume final de 75 μ l 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 μ l. 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 »).

Incubation de l'OPG avec différents facteurs

Afin de tester l'effet de différents facteurs sur la fixation de l'OPG radiomarquée, plusieurs pré-incubations sont effectuées. Des gammes d'héparine, de tétrasaccharide, de décasaccharide (0,02 à 5 μ M) ou de RANK-L soluble (0,49 nM à 1 μ M) dans du PBS-BSA 0,5% sont réalisées dans une plaque 96 puits fonds ronds puis l'OPG est ajoutée à une concentration fixe (1 nM) pour un volume final de 25 μ l. Après une incubation d'une heure à température ambiante, ces gammes sont traitées comme celle de l'OPG seule.

Réaction de liaison

Les cellules 2.93 ou 2.93 RANK-L sont déposées dans les puits contenant l'OPG radiomarquée seule ou pré-incubée avec les facteurs précédemment cités (uniquement pour les cellules 2.93 RANK-L), dans un volume de 25 μ l (soit 10^6 cellules par puits). Les cellules 2.93 RANK pré-incubées ou non avec RANK-L sont ajoutées dans les puits contenant la gamme d'OPG radiomarquée, dans un volume de 25 μ l (soit 10^6 cellules par puits). Le volume total de chaque puits est alors de 50 μ l. La plaque est ensuite incubée 90 min 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 min à 10000 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.

IV.3.2. 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

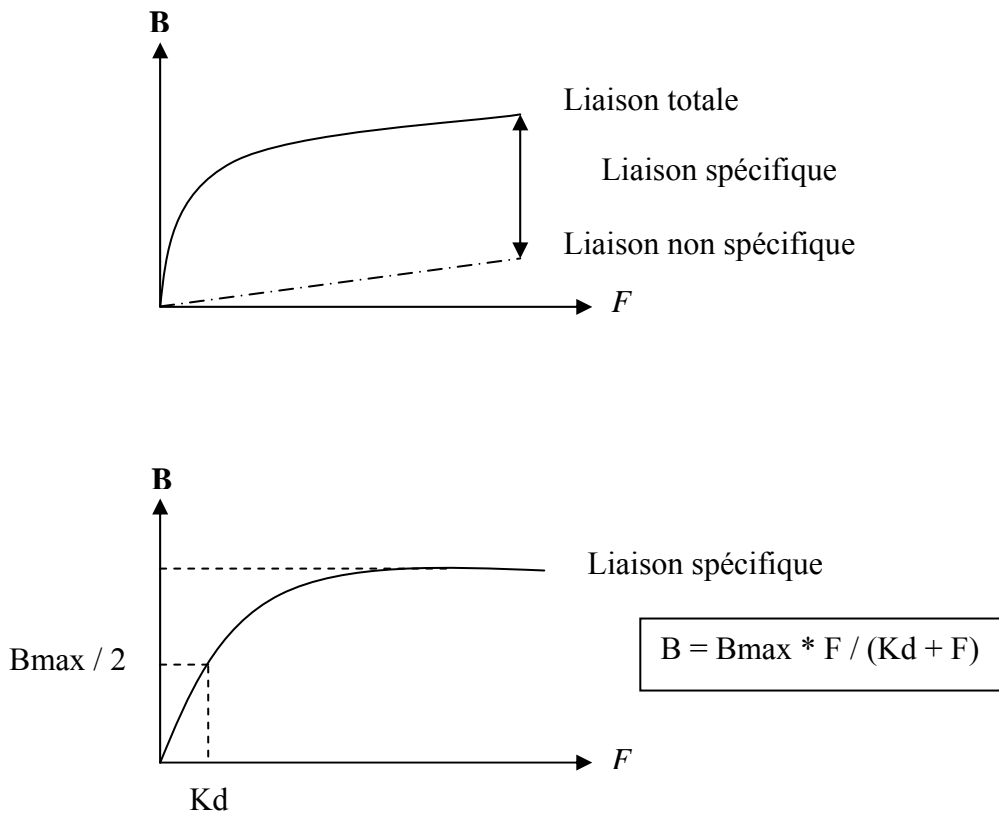
Alors : $B_{max} = R + B$ et $Kd = (F * R) / B$

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 :

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

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 11). La courbe de Scatchard donne, après soustraction de la composante non spécifique, le Kd déterminé par la pente de la droite et le nombre de récepteurs par cellules 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

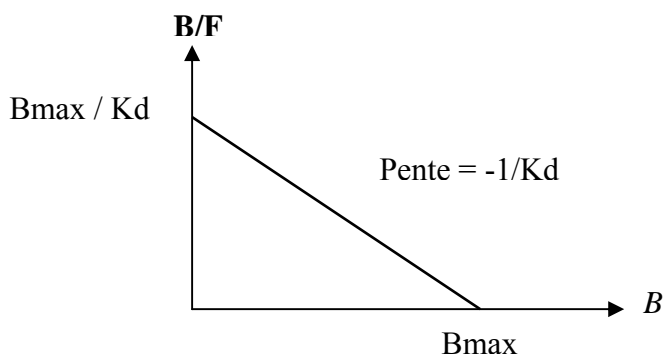


Figure 11 : Représentations théoriques des courbes de saturation (A) et représentation de Scatchard correspondante (B).

Calcul du nombre moyen de récepteurs par cellules

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 :

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

V. INFLUENCE DE L'OPG SUR LA DEMIE VIE DE RANK-L

V.1. Étude du devenir de l'OPG liée aux cellules 2.93 RANK-L par microscopie confocale

Les cellules 2.93 RANK-L sont incubées en présence ou non d'OPG à 100 ng/ml pendant 1 heure à 4°C puis lavées 2 fois avec du milieu frais. Le milieu est ensuite remplacé par du milieu frais sans OPG et les cellules sont incubées à 37°C pendant 30 min, 1 heure ou 3 heures. Après cette incubation les cellules sont replacées à 4°C puis déposées sur des lames de verre à l'aide d'un cytopspin. Les lames sont alors placées dans de l'acétone pendant 5 min à température ambiante, lavées 3 fois dans du PBS, incubées pendant 5 min dans du PBS-0,1% Triton 100X et de nouveau lavées 3 fois dans du PBS. Les cellules sont ensuite incubées avec du PBS/BSA 4% pendant 15 min afin de saturer les sites de liaison non spécifiques, et mises en présence d'un anticorps anti-OPG biotinylé (R&D Systems) à 15 µg/ml à température ambiante pendant 1 heure. Après 2 lavages avec du PBS/BSA 1% une nouvelle incubation de 30 min est réalisée avec une solution de streptavidine-FITC diluée au 1/200^{ème} (R&D Systems). Après 2 lavages les cellules sont analysées à l'aide d'un microscope confocal (LEICA TCS-SP1). Les images sont analysées grâce au logiciel Zeiss LSM.

V.2. Étude de l'influence de l'OPG sur l'expression de RANK-L par western blot

Les cellules 2.93 RANK-L sont cultivées jusqu'à atteindre 80% de confluence puis incubées en présence d'un inhibiteur de la synthèse protéique, le cycloheximide (SIGMA), à 4 µg/ml, avec ou sans OPG à 100 ng/ml (0,91 nM) pendant 2, 3, 4 ou 6 heures. Dans d'autres expériences l'OPG est pré-incubée pendant 30 min à température ambiante avec 91 nM d'héparine, de tétrasaccharide, de décasaccharide, d'héparane sulfate, de dermatane sulfate ou de chondroïtine sulfate (SIGMA) avant d'être ajoutée sur les cellules.

Les cellules 2.93 RANK-L sont alors lysées puis un western blot est réalisé selon un protocole similaire à celui décrit précédemment. Brièvement, des quantités équivalentes de protéines sont séparées par électrophorèse dans un gel dénaturant à 10% d'acrylamide puis transférées sur une membrane de PVDF. Après une incubation de 30 min dans une solution de saturation (PBS / Tween-20 0,05% / BSA 3%) la membrane est incubée avec un anticorps anti-RANK-L (Active Motif) pendant une nuit à 4°C. Trois lavages de 5 min dans du PBS / Tween-20 0,05% sont alors effectués puis une saturation de 15 min dans une solution de PBS / Tween-20 0,05% / lait en poudre sans lipides 5% est réalisée suivie d'une incubation de 45 min avec un anticorps anti-IgG de souris couplé à la peroxydase (Chemicon International Inc.). La membrane est ensuite lavée plusieurs fois puis révélée après incubation dans une solution ECL.

VI. SOUS-CLONAGE ET TRANSFECTION DU SYNDECAN-1

VI.1. Sous-clonage du syndecan-1

VI.1.1. Digestion par les enzymes de restriction et action de la phosphatase alcaline

Le plasmide pcDNA₃-néomycine contenant l'ADNc codant pour le syndecan-1 (« plasmide de départ ») ainsi que le plasmide pcDNA₃-hygromycine (« plasmide d'arrivée ») (figure 12) sont digérés par les enzymes de restriction Not I et Hind III (New England BioLabs, Ipswich, USA) pendant une heure à 37°C suivi de 20 min à 65°C ce qui permet l'inactivation des enzymes. Afin de limiter la re-circularisation du plasmide pcDNA₃-néomycine avec l'insert syndecan-1, une digestion par une troisième enzyme de restriction, Spe I, est réalisée. Les différentes endonucléases de restriction ont été utilisées à raison de 5-10 unités par µg d'ADN, conformément aux indications du fournisseur, en utilisant à chaque fois le tampon d'activité optimale délivré avec l'enzyme.

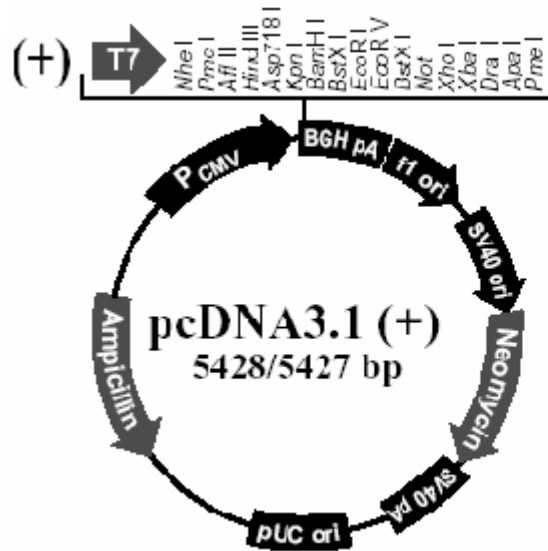
Afin de limiter le repliement du pcDNA₃-hygromycine une déphosphorylation par la phosphatase alcaline des extrémités 5' est effectuée. La solution plasmidique est incubée pendant 30 min à 37°C avec 1 U de phosphatase alcaline, puis l'enzyme est inactivée par une incubation de 20 min à 65°C.

VI.1.2. Ligation

La ligation se déroule dans un volume de 20 µl. Différentes conditions sont testées :

- la solution plasmidique contenant le pcDNA₃-néomycine/syndecan-1 digéré par Not I, Hind III et Spe I (*solution plasmidique 1*)

A



B

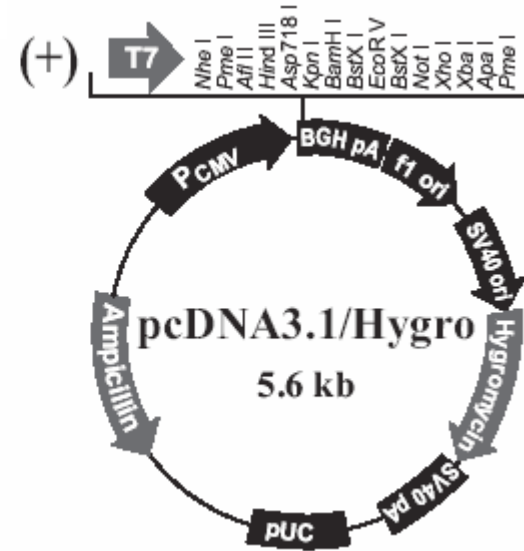


Figure 12 : Cartes des plasmides pcDNA₃-neomycine (A) et pcDNA₃-hygromycine (B).

L'ADNc codant pour le syndecan-1 est inséré dans le pcDNA₃-neomycine entre les sites de restriction Kpn I et Not I.

- la solution plasmidique contenant le pcDNA₃-hygromycine digéré par Not I, Hind III et ayant subi l'action de la phosphatase alcaline (*solution plasmidique 2*)
- les deux solutions plasmidiques précédentes ensemble

Ces différents mélanges sont placés 5 min à 42°C de façon à faciliter le rapprochement des extrémités cohésives et à favoriser l'action de la T4-DNA ligase (Invitrogen). Une unité de T4-DNA ligase est ensuite ajoutée dans chaque solution et la ligation s'effectue pendant 1 heure à 24,5°C suivi de 9 heures à 16°C. Un témoin sans T4-DNA ligase est réalisé pour chaque condition.

VI.2. Transformation bactérienne par choc thermique

A 100 µl d'une solution d'*Escherichia coli* DH5α préalablement rendues compétentes et sensibles à l'ampicilline, sont ajoutés au 10 µl d'ADN issu de chaque condition de ligation. Ces mélanges sont maintenus 30 min sur de la glace puis placés 45 secondes à 42°C ce qui accentue la déstabilisation des couches lipidiques et stimule la pénétration de l'ADN. Suite à ce choc thermique, les bactéries sont incubées une heure sous agitation orbitale à 37°C dans du milieu LB (milieu nutritif non sélectif). Les bactéries sont ensuite étalées sur du milieu LB solidifié et supplémenté avec de l'ampicilline à la concentration finale de 100 µg/ml puis incubées une nuit à 37°C.

VI.3. Mini préparation d'ADN plasmidique

Environ 20 colonies bactériennes obtenues précédemment sont prélevées, solubilisées dans 2 ml de milieu LB supplémenté avec 100 µg/ml d'ampicilline puis placé sous agitation

orbitale à 37°C pour la nuit. Les cultures bactériennes ainsi obtenues sont centrifugées environ 15 secondes à 10000 g puis le culot est solubilisé dans 150 µl de solution I (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNaseA). 150 µl de solution II (200 mM NaOH, SDS 1%) sont alors ajoutés, le contenu du tube est mélangé par inversion 4-5 fois et une incubation de 3 min est réalisée à température ambiante. Afin d'arrêter la lyse, 150 µl de solution III froide (3,0 M d'acétate de potassium, pH 5,5) sont ajoutés suivi d'une incubation de 5 min dans la glace.

Après une centrifugation de 3 min à 10000 g, le surnageant est prélevé et mélangé à une solution contenant 300 µl de phénol et 150 µl de chloroforme. Une seconde centrifugation d'une minute est réalisée. La phase supérieure est récupérée puis 2,5 volumes d'éthanol à -20°C sont ajoutés. Après une incubation de 10 min à -20°C une centrifugation de 5 min est effectuée. L'éthanol est éliminé puis le culot est séché et solubilisé dans 20 µl d'eau pure.

VI.4. Analyse du contenu des plasmides

L'ADN obtenu grâce aux mini-préparations est digéré par Hind III et Not I comme décrit précédemment afin de vérifier la présence de l'insert syndecan-1. Les produits de ces digestions sont ensuite analysés par migration électrophorétique sur gel d'agarose à 1%. Les clones ayant intégré le plasmide muni de l'insert syndecan-1 sont de nouveau digérés par une autre enzyme de restriction, Sac II, ayant un site de reconnaissance uniquement sur le vecteur pcDNA₃-hygromycine. Une seconde électrophorèse permettra de visualiser les clones positifs pour l'insert dans le plasmide désiré, pcDNA₃-hygromycine. La présence de l'insert syndecan-1 dans les clones est également vérifiée par PCR, en comparaison au pcDNA₃-néomycine/syndecan-1, en utilisant les conditions et amorces répertoriées dans le tableau 3.

VI.5. Transfection des cellules 2.93 RANK par le plasmide pcDNA₃-hygromycine/syndecan-1

Les cellules 2.93 RANK sontensemencées en plaques 6 puits et cultivées en milieu DMEM supplémenté avec 10% de SVF jusqu'à ce qu'elles atteignent 70% de confluence. Dans un tube Eppendorf, une solution de FuGENE (Roche) est mélangée à du milieu DMEM sans sérum ni antibiotique. L'ADN plasmidique est ensuite ajouté pour un volume final de 100 µl et un rapport entre la solution de FuGENE et l'ADN respectivement de 3 :1. Le mélange FuGENE-ADN est alors incubé pendant 30 min à température ambiante avant d'être ajouté sur les cellules. Après une nuit à 37°C, le milieu de culture est changé et remplacé par du milieu DMEM supplémenté avec 10% de SVF et de l'hygromycine B (InvivoGen, San Diego, USA) à une concentration de 125 µg/ml. Le milieu de culture avec antibiotique est alors changé tous les deux jours jusqu'à sélection de cellules résistantes c'est à dire ayant incorporé de plasmide pcDNA₃-hygromycine/syndecan-1.

VII. ANALYSE PHÉNOTYPIQUE ET FONCTIONNELLE DE LYMPHOCYTES INFILTRANT LES TUMEURS

VII.1. Patients

Vingt-sept patients atteints de tumeurs osseuses [6 ostéosarcomes, 2 sarcomes d'Ewing, 2 chondrosarcomes, 7 tumeurs à cellules géantes (TCG), 2 plasmocytomes, 4 métastases osseuses (2 d'origine rénale et 2 d'origine inconnue) et 4 autres pathologies (1 fibrome chondromyxoïde, 1 dysplasie fibreuse, 1 chondrome, 1 sarcome indifférencié)] ont été inclus dans cette étude. Ces patients, douze femmes ($38 \pm 17,8$ ans, de 17 à 75 ans) et quinze hommes ($46,9 \pm 18,8$ ans, de 16 à 75 ans) et ont tous été traités dans le service de chirurgie orthopédique du Centre Hospitalier Universitaire de Nantes (France) entre septembre 2003 et juin 2005. Les caractéristiques de ces patients sont regroupées dans le tableau 4. Un consentement écrit de chaque patient a été obtenu avant leur entrée dans l'étude.

VII.2. Modèle d'ostéosarcome de rat

Le modèle d'ostéosarcome de rat a été obtenu par collaboration avec le Dr. J.P Thiéry (Institut Gustave Roussy, Villejuif, France). La souche de rats Sprague Dawley OFA (Elevage Charles River, Arbresle, France) a été utilisée pour le développement tumoral *in vivo*. Ce modèle dérive d'un ostéosarcome transplantable de rat initialement induit par injection d'une solution colloïdale de $^{144}\text{Cerium}$ (Klein et al, 1977 ; Jasmin et al, 1982). L'évolution des tumeurs est comparable au niveau temporel (rapport 100 entre rat et l'homme) et physiologique au développement d'un ostéosarcome chez l'homme. Les animaux âgés de quatre semaines reçoivent par greffe para-tibiale, un fragment tumoral non nécrotique (10 mm^3) issu d'une tumeur parentale. Après excision de la peau, les plans musculaires sont écartés et la pièce tumorale est placée au contact du tissu osseux après avivement du périoste.

Patients	Sexe	Age	Diagnostic	Localisation	Obtention de TIL
1	F	29	ostéosarcome	fémur	+
2	M	68	ostéosarcome	humérus	+
3	F	57	ostéosarcome	sacrum	+
4	F	17	ostéosarcome	tibia	+
5	M	28	ostéosarcome	fémur	+
6	M	24	ostéosarcome	pelvis	+
7	M	16	sarcome d'Ewing	omoplate	+
8	F	19	sarcome d'Ewing	fémur	+
9	M	40	chondrosarcome	sacrum	-
10	M	37	chondrosarcome	humérus	-
11	M	59	TCG	tibia	+
12	F	39	TCG	fémur	+
13	M	45	TCG	humérus	+
14	F	29	TCG	genou	+
15	F	29	TCG	fémur	+
16	M	22	TCG	fémur	+
17	F	21	TCG	tibia	+
18	F	44	fibrome	sternum	+
19	M	63	chondromyxoïde dysplasie fibreuse	pelvis	-
20	M	75	chondrome	colonne vertébrale	+
21	F	62	sarcome indifférencié	cuisse	+
22	M	59	plasmocytome	côte	+
23	F	59	plasmocytome	côte	+
24	M	49	métastase osseuse (origine rénale)	sacrum	+
25	M	67	métastase osseuse (origine rénale)	humérus	-
26	M	66	métastase osseuse (origine inconnue)	clavicule	-
27	F	75	métastase osseuse (origine inconnue)	pubis	+

Tableau 4 : Caractéristiques des patients inclus dans l'étude.

TCG : tumeur à cellules géantes.

Le fragment tumoral est maintenu en place par la masse musculaire. L'évolution tumorale est suivie sur une période maximale de 5 semaines. L'apparition de métastases pulmonaires est observée dans 75 à 90% des rats présentant un développement tumoral avancé.

VII.3. Culture cellulaire

VII.3.1. Préparation des lymphocytes du sang périphérique (PBL) et extraction des lymphocytes infiltrant les tumeurs (TIL)

Les PBL humains et de rat sont isolés, à partir de sang hépariné, par séparation par gradient de densité (Ficoll-Hypaque, Eurobio). Les PBL de rat et humains sont respectivement cultivés dans du milieu X-VIVO 15 (Cambrex) supplémenté avec de l'IL-2 à 900 UI/ml (Eurocetus, France) et un mélange d'antibiotiques (100 UI/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine), et du milieu RPMI 1640 (Cambrex) supplémenté avec 10% de SVF, 300 UI/ml d'IL-2 et un mélange d'antibiotiques, pendant 14 ou 21 jours dans une atmosphère humide avec 5% de CO₂ – 95% d'air à 37°C.

Les biopsies de tumeurs humaines, provenant directement du bloc opératoire, sont coupées en fragments d'un mm³ et mises en culture immédiatement dans du RPMI 1640 supplémenté avec 10% de SVF, 300 UI/ml d'IL-2 et un mélange d'antibiotiques (100 UI/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine). La moitié du milieu est changée deux fois par semaine et les TIL sont cultivés pendant 21 jours dans une atmosphère humide avec 5% de CO₂ – 95% d'air à 37°C.

Les tumeurs de rat, provenant du modèle décrit précédemment, sont coupées en fragments de 9 mm³ et digérées par une solution contenant de la collagenase A (Boehringer, Mannheim, Allemagne) à 2 mg/ml et de la hyaluronidase à 50 UI/ml (SIGMA) pendant 2 heures. La suspension cellulaire obtenue est alors filtrée en utilisant un filtre de 70 µm, puis les cellules sont cultivées dans du milieu X-VIVO 15 supplémenté avec de l'IL-2 à 900 UI/ml

et un mélange d'antibiotiques (100 UI/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine) dans une atmosphère humide avec 5% de CO₂ – 95% d'air à 37°C. La moitié du milieu est changée deux fois par semaine et les TIL sont cultivés pendant 14 jours.

VII.3.2. Obtention de cellules primaires d'ostéosarcome de rat

Des cellules primaires autologues d'ostéosarcome sont obtenues à partir du modèle d'ostéosarcome de rat décrit précédemment. Ces cellules sont isolées à partir de petits fragments de tumeur digérés pendant 2 heures avec de la collagenase A à 1 mg/ml. La suspension cellulaire est alors lavée 3 fois avec du PBS, puis les cellules sont mises en culture dans du DMEM supplémenté avec 10% de SVF dans une atmosphère humide avec 5% de CO₂ – 95% d'air à 37°C. A confluence, leur décollement s'effectue par une trypsination (solution de trypsine EDTA-PBS) quelques minutes à 37°C.

VII.3.3. Culture de différentes lignées tumorales

Les cellules UMR106 (lignée d'ostéosarcome de rat), MG63 et SaOS2 (lignées d'ostéosarcome humain), Daudi (lignée de lymphome B humain) et K562 (lignée érythroleucocytaire humaine), provenant de l'American Tissue Cell Collection, sont cultivées en milieu RPMI 1640 supplémenté avec 10% de SVF dans une atmosphère humide avec 5% de CO₂ – 95% d'air à 37°C. La lignée d'ostéosarcome de rat ROS 17/2.8, obtenue grâce au Dr H.J. Donahue (Penn State University, USA), est cultivée en DMEM supplémenté avec 10% de SVF dans une atmosphère humide avec 5% de CO₂ – 95% d'air à 37°C.

VII.4. Test de cytotoxicité au ^{51}Cr

Environ 200×10^3 cellules de chaque lignée cible (cellules UMR106, MG62, SaOS2, Daudi, K562, ROS 17/2.8 ou cellules primaires d'ostéosarcome de rat) sont incubées avec 10 μl de $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (Amersham), soit 10 μCi , pendant 1 heure à 37°C . Les cellules cibles sont ensuite lavées trois fois dans leur milieu de culture, puis préparées de manière à avoir une concentration de 1000 cellules dans 50 μl de milieu. Les lymphocytes (PBL ou TIL) sont ajoutés aux cellules tumorales de façon à avoir différents rapports cible/effecteur (1/12,5, 1/25, 1/50) dans un volume final de 100 μl . La plaque est alors mise à incuber 4 heures à 37°C , puis 25 μl de surnageant de chaque condition sont mélangés à 100 μl de liquide de scintillation (Optiphase Supermix, Wallak, GB) avant une mesure de la radioactivité par un compteur gamma permettant de déterminer le relargage expérimental (ER). Les relargages maximal et spontané de ^{51}Cr sont déterminés en incubant les cellules cibles avec respectivement 100 μl de détergent (solution de Triton à 2,5% dans du milieu de culture) ou 100 μl de milieu de culture. Le relargage spontané (SR) n'excède jamais 10% du relargage maximal (MR).

Le pourcentage de cytotoxicité est calculé grâce à la formule suivante :

$$\% \text{ de cytotoxicité} = [(\text{ER}-\text{SR}) / (\text{MR}-\text{SR})] * 100$$

VII.5. Phénotypage par cytométrie en flux

Afin d'être phénotypés, les lymphocytes (PBL ou TIL) sont marqués à l'aide de différents anticorps monoclonaux couplés à un fluorochrome. Il s'agit des anticorps anti-CD3-(PE), anti-CD4-(APC), anti-CD8- (perPC), anti-CD20-(FITC) (BD Biosciences),

anti-CD45RA-(FITC) et anti-CD161-(PE) (Serotec, Cergy Saint-Christophe, France). Brièvement les lymphocytes sont lavés deux fois dans une solution de PBS puis répartis dans une plaque 96 puits à fond conique à raison de 2×10^5 cellules par puits. Les cellules sont ensuite incubées 15 min à température ambiante dans une solution de PBS/BSA 1% puis marquées pendant 1 heure à 4°C avec 0,2 µg d'anticorps précédemment cités, dilué dans du PBS/BSA 1%. Après trois lavages dans du PBS les cellules sont analysées par cytométrie en flux (FACs calibur, BD Biosciences).

VII.6. Analyse statistique

Toutes les expériences ont été réalisées en trois fois. L'écart-type est calculé pour chacune des conditions et comparé grâce au test ANOVA. Les résultats sont considérés comme significatifs lorsque $P < 0,05$.

RÉSULTATS

I. ÉTUDE DE L'ACTION DE L'OPG SUR LES OSTEOCLASTES PURIFIÉS DE LAPIN

Articles de référence :

- *Wittrant Y, Couillaud S, Theoleyre S, Dunstan C, Heymann D, Redini F. **Osteoprotegerin differentially regulates protease expression in osteoclast cultures.** Biochem Biophys Res Commun. **2002.** 293:38-44.*
- *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. **2004.** 1644:1-7.*

I.1. Analyse des effets de l'OPG sur l'expression et l'activité des métalloprotéases dans les ostéoclastes purifiés de lapin

Afin d'étudier l'action de l'OPG sur les ostéoclastes purifiés de lapin, ces cellules sont incubées en présence de différentes concentrations d'OPG et les effets sur l'expression et l'activité des MMP sont analysés respectivement par RT-PCR et zymographie.

L'ARN messager (ARNm) de la MMP9 est exprimé à un taux élevé dans les ostéoclastes purifiés de lapin (figures 13A, 13B), alors que seul un très faible signal a pu être détecté pour le messager de la MMP2. Ceci est corrélé avec les résultats obtenus pour l'activité protéasique. En effet, les expériences de zymographie ont permis de mettre en évidence la présence d'une bande majoritaire à 92 kDa correspondant à la MMP9 (ou gélatinase B) sous sa forme latente, et d'une bande beaucoup plus faible à 62 kDa qui correspond à la forme active de la MMP2 (figures 13C, 13D). L'OPG stimule l'expression de la MMP9 et l'activité de la pro-MMP9 de manière « dose-dépendante ». Le taux d'ARNm de la MMP9 est augmenté de 25% avec la plus forte dose d'OPG (100 ng/ml) (figures 13A, 13B)

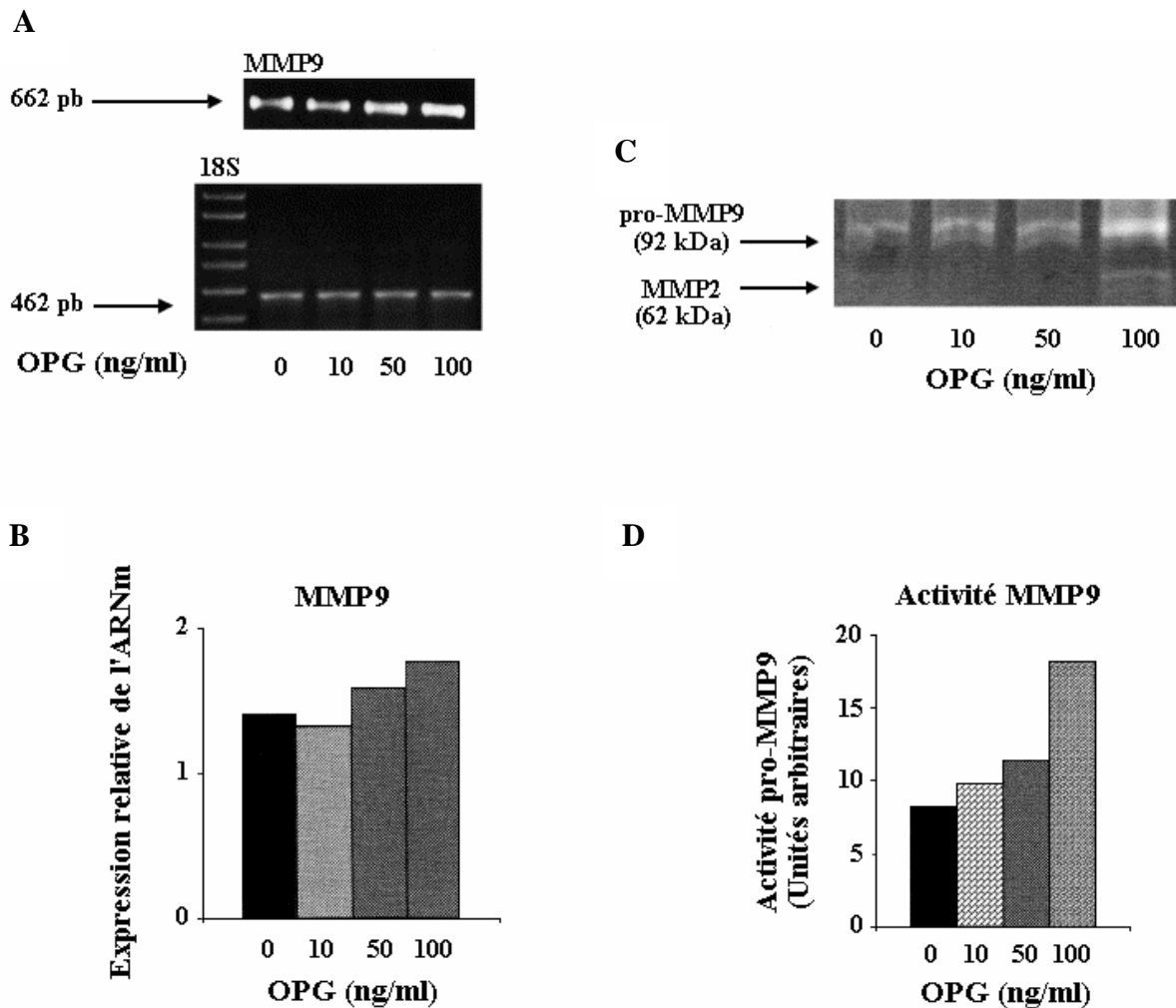


Figure 13 : L'OPG stimule l'expression de la MMP9 et l'activité de la MMP2 et de la pro-MMP9 dans les ostéoclastes purifiés de lapin.

(A) Analyse par RT-PCR de l'expression de l'ARNm de la MMP9 dans les ostéoclastes purifiés de lapin cultivés en présence ou non d'OPG à 10, 50 ou 100 ng/ml pendant 24 heures. Le taux d'ARNm de la MMP9 est déterminé à 28 cycles et normalisé par rapport à l'ARNm du 18S (6 cycles). (B) L'expression relative des ARNm MMP9 correspondant à un essai représentatif (parmi 3) est déterminée en scannant les bandes et normalisée par rapport au taux d'ARNm 18S. (C) Les activités des métalloprotéases est étudiée par zymographie. Les activités de la MMP2 et de la pro-MMP9 sont détectées respectivement à 62 et 92 kDa. Les bandes sont scannées puis l'intensité est représentée en unités arbitraires (D).

et l'activité correspondante de la pro-MMP9 est également fortement stimulée par cette concentration d'OPG (figure 13C, 13D). De plus, les expériences de zymographie montrent une faible augmentation de l'intensité de la bande à 62 kDa et ce pour une concentration d'OPG de 100 ng/ml (figure 13C).

Ces résultats démontrent donc un effet stimulateur de l'OPG sur l'expression de la MMP9 et l'activité de la pro-MMP9 dans les ostéoclastes.

I.2. Étude de l'effet d'inhibiteurs de voies de transduction sur l'activité de la pro-MMP9 induite par l'OPG

Afin de déterminer les voies de signalisation impliquées dans l'effet de l'OPG sur les ostéoclastes purifiés de lapin, l'activité de la pro-MMP9 induite par l'OPG est étudiée en présence d'inhibiteurs spécifiques de différentes voies de transduction intracellulaires. Plusieurs concentrations d'inhibiteurs ont été étudiées mais seuls les effets des doses optimales sont montrés ici.

Les résultats obtenus montrent tout d'abord que l'inhibiteur de la PI₃ Kinase (Wortmannin) et l'inhibiteur de la protéine kinase A (PKI 5-24) n'ont pas d'effet significatif sur l'induction par l'OPG de l'activité de la pro-MMP9 (figure 14A). Au contraire, l'inhibiteur des tyrosines kinases (Génistéine), l'inhibiteur de la PKC et des kinases AMPc dépendantes (H7) et l'inhibiteur de Ras (FPT inhibitor II) abolissent totalement l'action stimulatrice de l'OPG (figure 14B). Les effets de deux inhibiteurs des MAPK (SB203580 et PD98059 inhibiteurs respectifs de p38 et de ERK1/2) ont alors été étudiés (figure 14C). La pré-incubation des ostéoclastes purifiés avec SB203580 inhibe l'activité de la pro-MMP9 induite par l'OPG de manière « dose-dépendante ». De façon similaire, 40 µM de PD98059 inhibent totalement l'effet stimulateur de l'OPG.

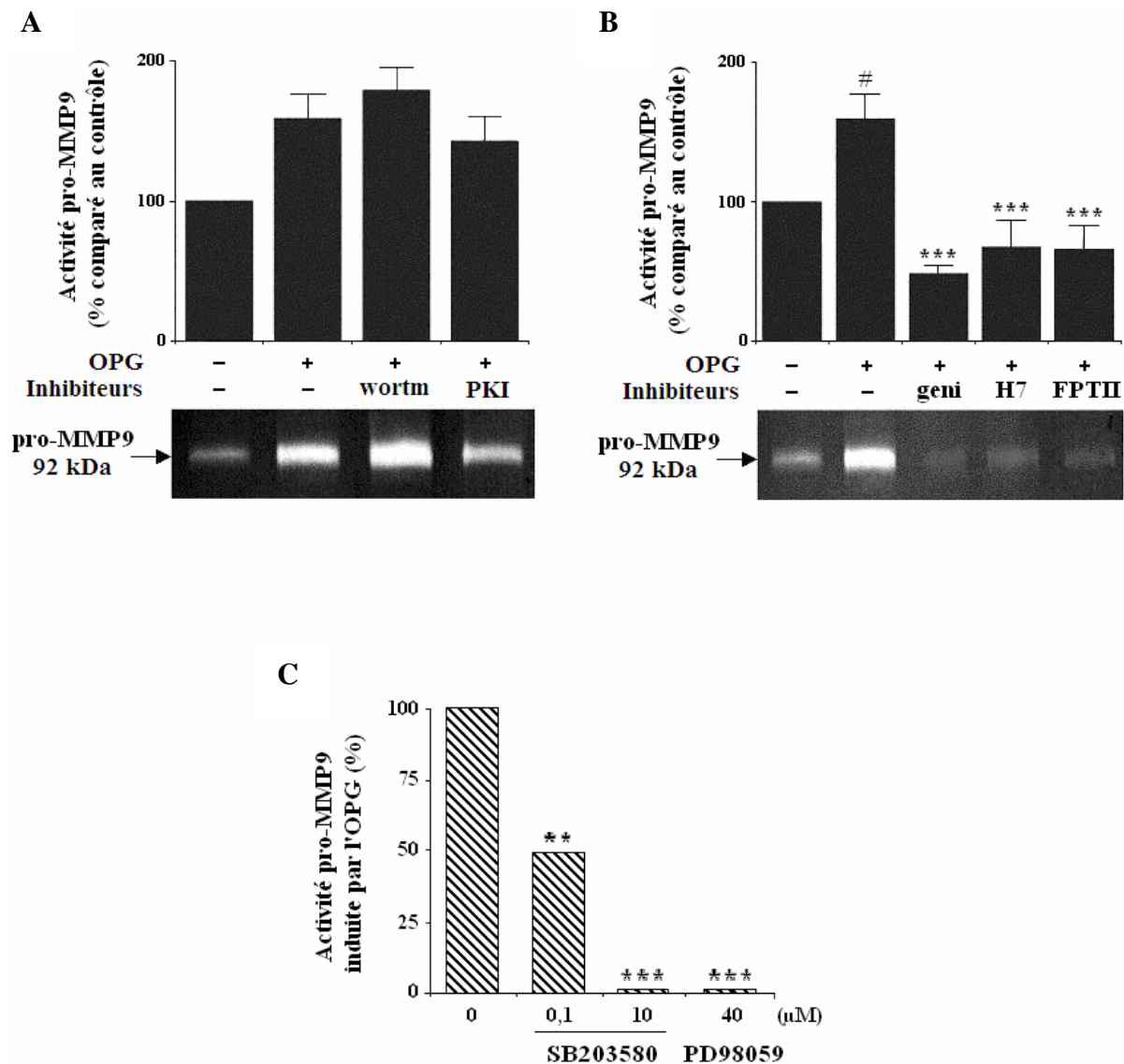


Figure 14 : Inhibition de l'activité de la pro-MMP9 induite par l'OPG par différents inhibiteurs de voies de transduction.

Les ostéoclastes purifiés de lapin sont cultivés en absence ou présence d'OPG à 50 ng/ml en association ou non avec des inhibiteurs de voies de transduction : Wortmannin à 500 nM (inhibiteur de la PI₃ Kinase), PKI 5-24 à 100 nM (inhibiteur de la protéine kinase A) (A), Génistéine à 200 µM (inhibiteur des tyrosines kinases), H7 à 100 µM (inhibiteur de la PKC et des kinases AMPc dépendantes), FPTII à 40 µM (inhibiteur de Ras) (B), SB203580 à 0,1 et 10 µM (inhibiteur de p38) et PD98059 à 40 µM (inhibiteur de ERK1 et ERK2) (C). L'activité métalloprotéasique est déterminée par zymographie. Les résultats correspondent à la moyenne \pm l'écart type de cinq essais différents. ** $P < 0,001$ *** $P < 0,0001$ comparé à l'OPG seule, # $P < 0,05$ comparé au control non traité. geni : génistéine ; wortm : wortmannin.

Ces expériences permettent donc de mettre en évidence l'implication de la voie ras/MAPK dans la stimulation de l'activité pro-MMP9 par l'OPG dans les ostéoclastes purifiés.

II. ÉTUDE DE L'ACTION DE L'OPG SUR LA LIGNÉE RAW 264.7

Article de référence :

- *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. 2004. 1644:1-7.*

Pour explorer plus en détails l'implication des MAPK dans l'action de l'OPG sur les ostéoclastes, la lignée RAW 264.7 est utilisée. Cette lignée exprime RANK et est capable de se différencier en cellules exprimant TRAP et le récepteur à la calcitonine quand elle est cultivée en présence de RANK-L (Matsumoto et al, 2000). De plus, la possibilité d'obtenir du matériel cellulaire en grande quantité permet de réaliser des expériences de western blot ce qui est plus difficile avec les ostéoclastes purifiés de lapin.

II.1. Analyse de l'expression de RANK et RANK-L par les cellules RAW 264.7 différenciées.

Nous avons tout d'abord voulu vérifier que les cellules RAW 264.7 différenciées expriment RANK mais pas RANK-L. Pour cela les cellules sont cultivées pendant 10 jours en présence de 50 ng/ml de RANK-L puis, après extraction des ARN totaux, l'expression des transcrits est analysée par RT-PCR. Les résultats présentés dans la figure 15A confirment que les cellules RAW 264.7 n'expriment pas RANK-L, contrairement aux cellules 2.93 RANK-L utilisées comme contrôle positif, mais expriment RANK.

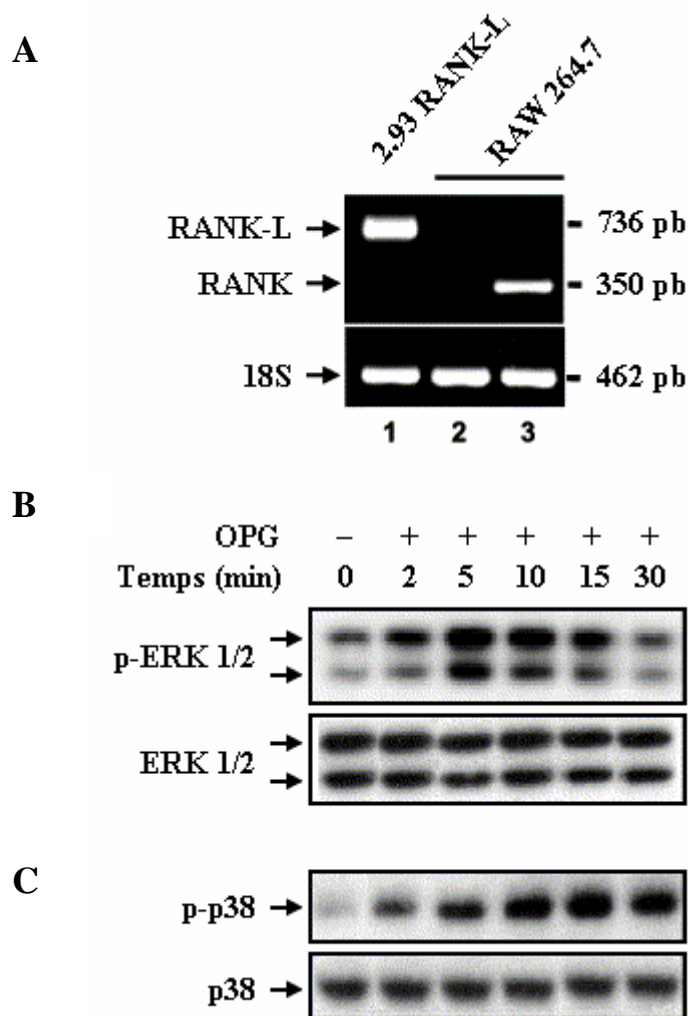


Figure 15 : L'OPG induit la phosphorylation de ERK1/2 et p38 dans les cellules RAW 264.7.

(A) Analyse par RT-PCR de l'expression de RANK, RANK-L et 18S dans les cellules 2.93 RANK-L et RAW 264.7 différenciées en présence de RANK-L à 50 ng/ml pendant 10 jours. Colonne 1 : expression de RANK-L dans les cellules 2.93 RANK-L (contrôle positif) ; Expression de RANK-L (colonne 2) et de RANK (colonne 3) dans les RAW 264.7.

(B) – (C) Les cellules RAW 264.7 sont cultivées pendant 10 jours en présence de RANK-L à 50 ng/ml puis incubées avec de l'OPG à 50 ng/ml pendant le temps indiqué. Un western blot est alors réalisé en utilisant des anticorps anti-phospho-ERK1/2(B) ou anti-phospho-p38 (C). L'expérience est également effectuée avec des anticorps anti-ERK1/2 ou anti-p38 afin de démontrer qu'une quantité égale de protéine a été chargée dans chaque puits.

II.2. Analyse des effets de l'OPG sur la phosphorylation de ERK1/2 et p38 – Implication de RANK-L

Les cellules RAW 264.7 sont différenciées en présence de RANK-L à 50 ng/ml pendant 10 jours puis cultivées sans sérum et sans RANK-L pendant 24 heures. Les signaux intracellulaires induits par l'OPG sont alors analysés par western blot en utilisant des anticorps spécifiques. Les résultats obtenus indiquent que l'OPG à 50 ng/ml est capable d'induire la phosphorylation des MAPK ERK1/2 (figure 15B) et p38 (figure 15C) dès deux min d'incubation, alors qu'il n'y a pas de modification du taux de ERK1/2 et p38 totales. La phosphorylation de ERK1/2 induite par l'OPG atteint un maximum après 5 min d'incubation puis décroît ensuite progressivement (figure 15B). La phosphorylation de p38 atteint quant à elle un maximum après 15 min d'incubation avec l'OPG (figure 15C). RANK-L étant connu pour activer des voies de transduction identiques dans les cellules ostéoclastiques (Matsumoto et al, 2000 ; Hotokezaka et al, 2002), les mêmes expériences sont réalisées avec RANK-L à 50 ng/ml ce qui permet de confirmer que ce dernier est capable d'activer ERK1/2 et p38 dans les cellules RAW 264.7 différenciées (figure 16A, colonne 3 comparée à la colonne 1).

Ensuite, sachant que l'OPG est classiquement décrite comme un des ligands de RANK-L et que les cellules RAW 264.7 ont été différenciées en présence de RANK-L, des expériences similaires aux précédentes sont effectuées en présence d'un anticorps anti-RANK-L bloquant. Ceci permet de tester l'hypothèse selon laquelle l'OPG pourrait agir sur les ostéoclastes *via* RANK-L. Les résultats obtenus montrent que l'anticorps anti-RANK-L inhibe totalement la phosphorylation de p38 induite par l'OPG alors qu'il n'a qu'un faible effet inhibiteur sur la phosphorylation de ERK1/2 (figure 16A, colonne 4 comparée à la colonne 2).

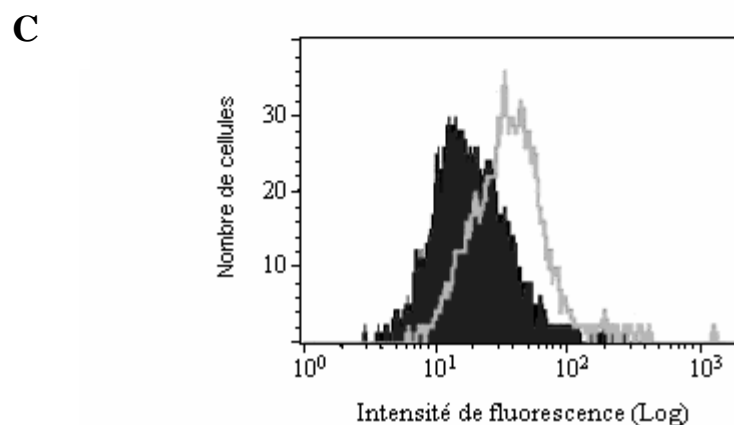
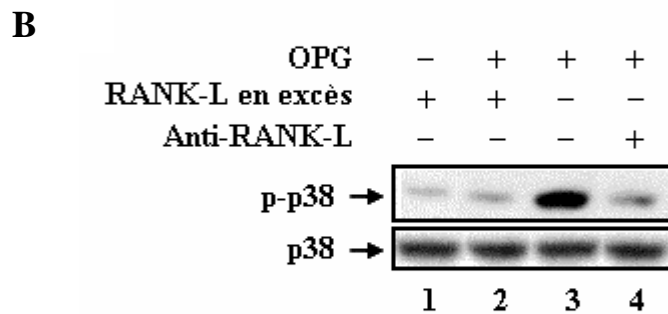
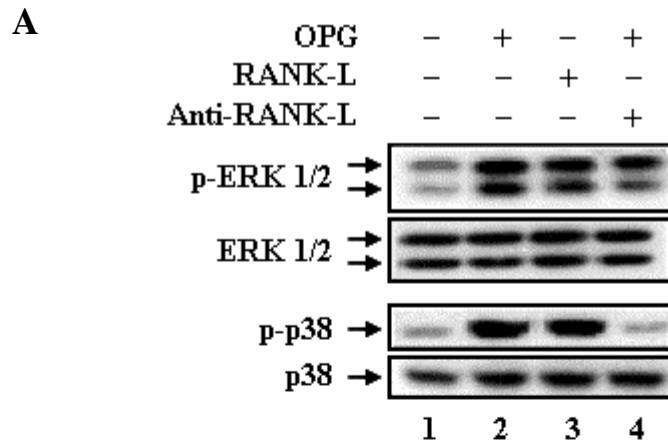


Figure 16 : La phosphorylation de p38 induite par l'OPG dans les RAW 264.7 différenciées est dépendante de RANK-L contrairement à celle de ERK1/2.

(A) La phosphorylation de ERK1/2 et p38 est analysée dans des cellules RAW 264.7 différenciées incubées pendant 10 min avec 50 ng/ml de RANK-L ou d'OPG en présence ou non d'un anticorps anti-RANK-L bloquant à 4 µg/ml.

(B) L'activation de p38 induite par l'OPG est analysée en présence ou absence d'un excès de RANK-L libre ou d'un anticorps anti-RANK-L bloquant.

Les expériences sont également effectuées avec des anticorps anti-ERK1/2 ou anti-p38 afin de démontrer qu'une quantité égale de protéine a été chargée dans chaque puits (A et B).

(C) Une analyse en cytométrie en flux réalisée sur les cellules RAW 264.7 différenciées démontre la présence de RANK-L à la surface des cellules (profil clair) en comparaison au contrôle isotypique (profil noir).

Pour élucider le rôle joué par RANK-L dans l'action de l'OPG, l'activation de p38 est étudiée sur les RAW 264.7 différenciées, privées de sérum et de RANK-L pendant 24 heures, puis incubées pendant 2 heures avec 50 ng/ml de RANK-L. Les cellules sont alors lavées plusieurs fois, dans le but d'éliminer l'excès de RANK-L libre, ou incubées directement avec l'OPG. Lorsque les cellules ne sont pas lavées, l'excès de RANK-L libre inhibe la phosphorylation de p38 induite par l'OPG (figure 16B, colonnes 1 et 2). Cette activation de p38 dépendante de l'OPG persiste au contraire lorsque l'excès de RANK-L libre a été éliminé par lavage (figure 16B, colonne 3 comparée à la colonne 1) et peut être inhibée par l'addition d'un anticorps anti-RANK-L bloquant (figure 16B, colonne 4 comparée à la colonne 3).

Par ailleurs, nous avons pu montrer, grâce à des expériences de cytométrie en flux réalisées sur des cellules RAW 264.7 cultivées 10 jours en présence de RANK-L, que cette molécule est toujours présente au niveau de la surface cellulaire et ce malgré le lavage des cellules (figure 16C).

Ces résultats, pris dans leur ensemble, mettent en évidence que l'OPG est capable d'exercer une activité biologique directe sur les ostéoclastes, dépendante ou non de la présence de RANK-L, et démontrent donc que l'OPG n'est pas uniquement un récepteur inhibiteur de la fixation de RANK-L sur RANK comme décrit dans la littérature.

III. ÉTUDE DES INTERACTIONS MOLÉCULAIRES ENTRE OPG, RANK-L, RANK ET LES GLYCOSAMINOGLYCANES

Article de référence :

- *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. 2004. 1644:1-7.*

III.1. Étude des interactions moléculaires entre OPG, RANK-L et RANK

Comme le démontrent les résultats précédents, l'OPG a un effet biologique direct et dépendant de la présence de RANK-L sur les ostéoclastes. Or RANK-L est le ligand naturel de RANK, dans ce contexte nous avons voulu savoir comment l'OPG pouvait se lier au complexe RANK-RANK-L. Pour cela, les interactions moléculaires entre OPG, RANK-L et RANK ont été analysées par résonance plasmonique de surface.

Nous avons tout d'abord pu confirmer que RANK-L se fixe à RANK immobilisé (figure 17A et 17B). Une cinétique a ensuite été réalisée en injectant RANK-L à différentes concentrations (5 à 125 nM) sur RANK immobilisé (figure 17C). L'analyse, effectuée grâce au logiciel BIAevaluation en utilisant le modèle « binding with mass transfert », a permis de déterminer que cette fixation de RANK-L sur RANK est de forte affinité puisque le K_D est de 2,05 nM.

L'OPG, alors qu'elle ne se fixe pas à RANK immobilisé (figure 17B), est capable de se lier au complexe RANK / RANK-L préformé et ce avec un K_D de 5,2 nM (figure 17A), constituant ainsi un complexe ternaire RANK / RANK-L / OPG. Cette fixation d'OPG au complexe RANK / RANK-L préformé peut être inhibée par l'injection, avant l'OPG, d'un

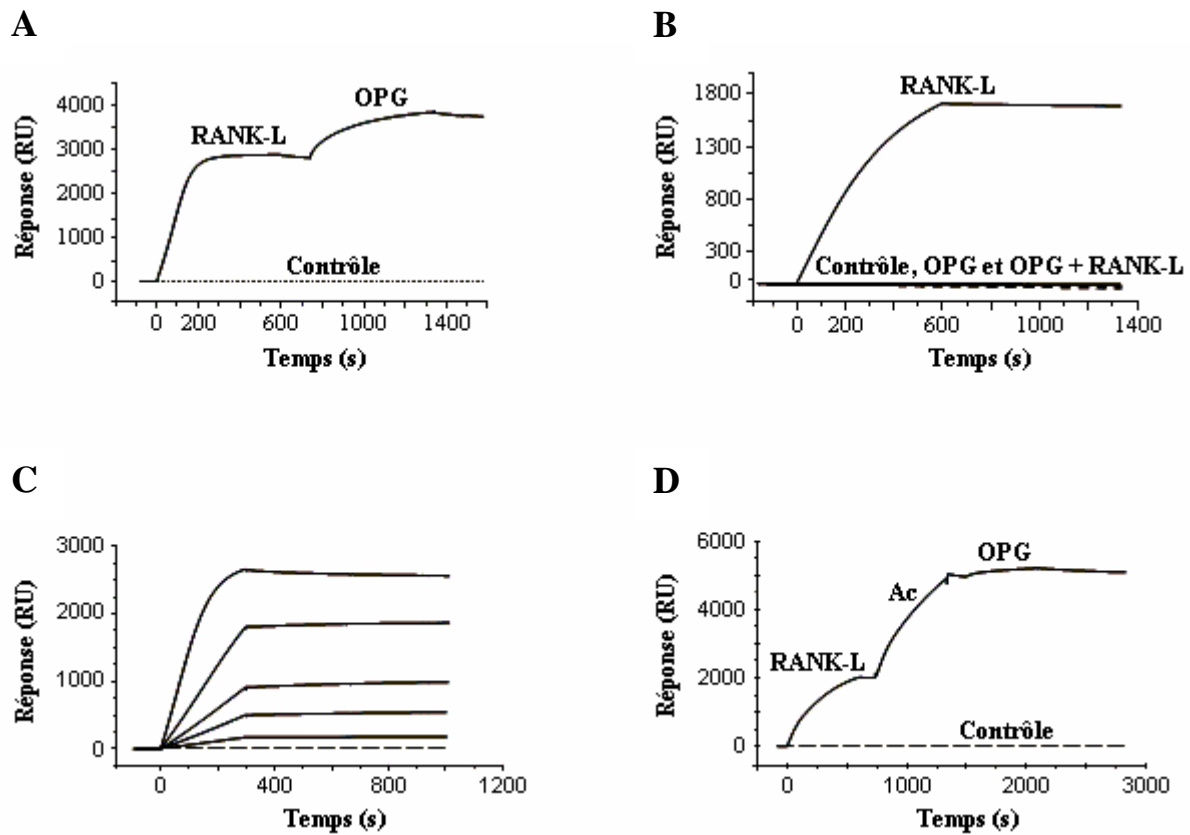


Figure 17 : Étude des interactions moléculaires entre RANK, RANK-L et OPG par résonance plasmonique de surface : formation d'un complexe ternaire.

Étude de la fixation de RANK-L 250 nM (A) ou 125 nM (B) et de l'OPG 91 nM injectés successivement (A) ou après une pré-incubation d'une heure à 37°C (B) sur RANK immobilisé. Immobilisation : 10508 RU ; débit : 5 µl/min ; volume injecté : 50 µl.

(C) RANK-L est injecté à différentes concentrations (5 à 125 nM) sur RANK immobilisé afin de déterminer les constantes cinétiques. Immobilisation : 646 RU ; débit : 40 µl/min ; volume injecté : 200 µl.

(D) RANK-L 250 nM suivi d'un anticorps anti-RANK-L 167 nM puis d'OPG 91 nM sont injectés sur RANK immobilisé. Immobilisation : 7889 RU ; débit : 5 µl/min ; volume injecté : 50 µl.

anticorps anti-RANK-L (figure 17D). Par ailleurs, la pré-incubation d'OPG avec RANK-L inhibe totalement la liaison de RANK-L à RANK immobilisé (figure 17B).

Ces résultats confirment le rôle de récepteur compétiteur de l'OPG tel qu'il est décrit dans la littérature puisqu'une pré-incubation d'OPG avec RANK-L inhibe la fixation de ce dernier sur RANK. Ils montrent également, et ce pour la première fois, que l'OPG est capable de former un complexe ternaire avec RANK et RANK-L ce qui pourrait permettre d'expliquer son action observée précédemment sur les ostéoclastes.

III.2. Étude des interactions moléculaires entre le complexe RANK / RANK-L / OPG et différents glycosaminoglycanes

L'OPG est une protéine possédant un site de liaison pour l'héparine, elle peut donc interagir avec cette molécule de même qu'avec des héparanes sulfates qui sont ses ligands physiologiques (Yamaguchi et al, 1998). De plus, des travaux récents ont montré que les cellules de myélome sont capables de fixer, internaliser et dégrader l'OPG et ce *via* un protéoglycane, le syndecan-1 (Standal et al, 2002). Dans ce contexte, les interactions moléculaires entre l'OPG et l'héparine ainsi qu'entre le complexe RANK / RANK-L / OPG et différents glycosaminoglycanes (GAG) ont été analysées par résonance plasmonique de surface.

III.2.1. Étude de la fixation de l'OPG sur l'héparine immobilisée

L'injection de l'OPG sur l'héparine immobilisée a permis de confirmer que ces molécules sont capables de se lier l'une à l'autre et ce par l'intermédiaire du domaine de liaison spécifique de l'OPG puisque l'OPG-Fc, molécule d'OPG dans laquelle le domaine de

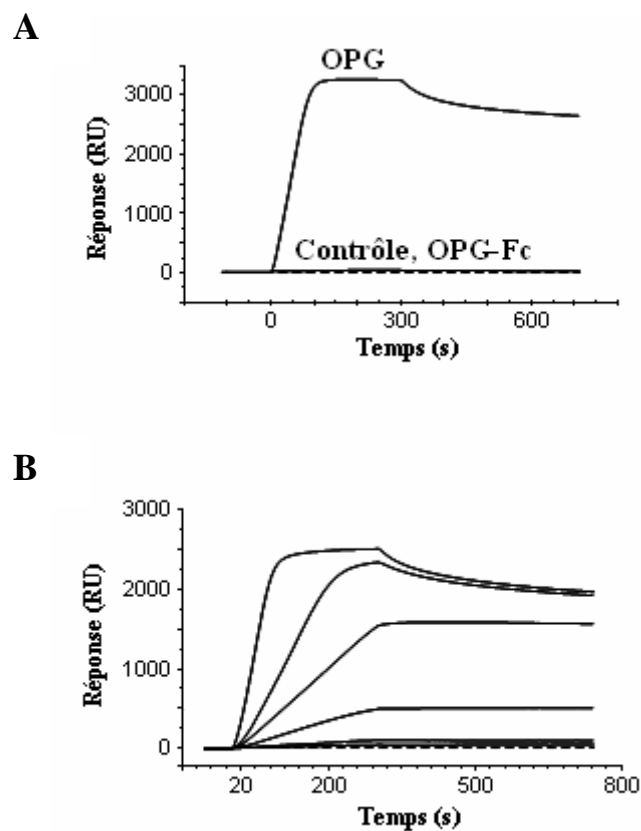


Figure 18 : Étude de la fixation de l'OPG sur l'héparine immobilisée par résonance plasmonique de surface.

(A) L'OPG à 91 nM et l'OPG-Fc à 110 nM (—) sont injectées sur l'héparine immobilisée et leur fixation est comparée au contrôle (--). Immobilisation : 121 RU ; débit : 10 μ l/min ; volume injecté : 50 μ l.

(B) L'OPG est injectée à différentes concentrations (0,91 à 45,4 nM) sur l'héparine immobilisée afin de déterminer les constantes cinétiques. Immobilisation : 121 RU ; débit : 40 μ l/min ; volume injecté : 200 μ l.

liaison à l'héparine a été remplacé par un fragment Fc, ne possède plus cette capacité (figure 18A). Les paramètres cinétiques de cette interaction ont ensuite été déterminés en injectant différentes concentrations d'OPG (0,91 à 45,4 nM) sur l'héparine immobilisée (figure 18B). L'analyse cinétique a alors été effectuée grâce au logiciel BIAevaluation en utilisant le modèle « binding with mass transfert ». La constante de dissociation K_D de cette interaction est égale à 0,28 nM ce qui indique que l'OPG se lie à l'héparine immobilisée avec une forte affinité.

III.2.2. Effet de l'héparine sur la fixation de l'OPG au complexe RANK / RANK-L

Puisque l'OPG se lie à l'héparine avec une forte affinité et qu'elle est également capable de former un complexe ternaire avec RANK et RANK-L, les interactions pouvant exister entre ces différentes molécules ont été étudiées.

Tout d'abord, l'héparine ne se fixe pas à RANK immobilisé, ni aux complexes RANK / RANK-L ou RANK / RANK-L / OPG (figures 19A, 19B). L'effet d'une pré-incubation de l'héparine avec l'OPG a alors été testé. Lorsque l'OPG est pré-incubée avec une dose élevée d'héparine (400 nM) pendant 30 min à température ambiante avant d'être injectée sur le complexe RANK / RANK-L préformé, une inhibition totale de la fixation d'OPG sur RANK / RANK-L est observée (figure 19C). Cette inhibition est « dose-dépendante » (figure 19D). En effet, quand l'OPG est incubée avec de l'héparine à 5 nM, il y a une inhibition de 27,2 % de sa fixation sur RANK / RANK-L, cette inhibition est de 54,4 % pour 10 nM, 90,8 % pour 15 nM et atteint les 100% pour 30 nM d'héparine.

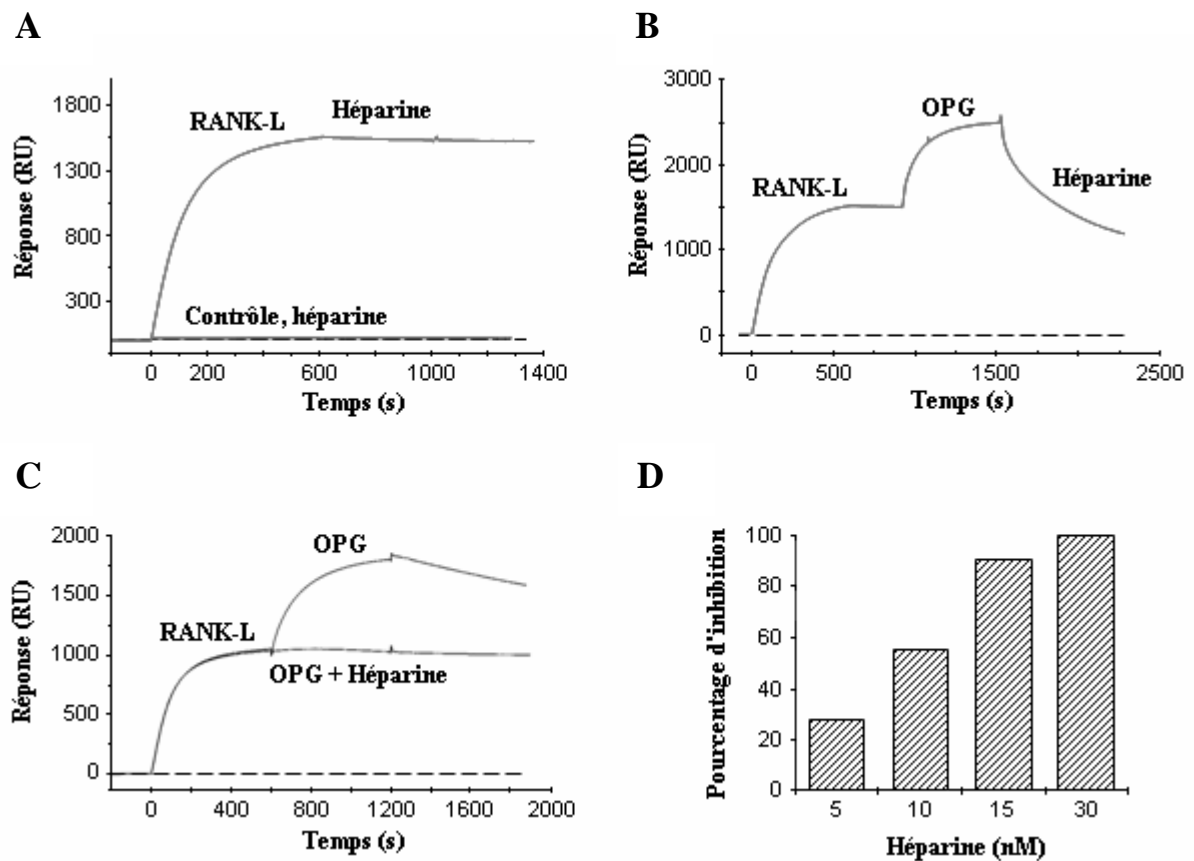


Figure 19 : Inhibition de la fixation d’OPG au complexe RANK / RANK-L par l’héparine.

(A – B) L’héparine 100 nM est injectée sur RANK immobilisé (A), sur le complexe RANK immobilisé / RANK-L 250 nM (A), ou sur le complexe RANK immobilisé / RANK-L 250 nM / OPG 100 nM (B). Immobilisation : 4930 RU ; débit : 5 μ l/min ; volume injecté : 50 μ l.
 (C – D) RANK-L 250 nM est injecté sur RANK immobilisé suivi de l’OPG 100 nM pour former le complexe ternaire RANK / RANK-L / OPG (C). L’OPG est également pré-incubée à température ambiante pendant 30 min avec 400 nM d’héparine (C) ou différentes concentrations d’héparine (5 à 30 nM) (D), puis injectée sur le complexe RANK / RANK-L. Immobilisation : 3598 RU (C), 4886 RU (D) ; débit : 5 μ l/min ; volume injecté : 50 μ l.

III.2.3. Importance de la sulfatation dans l'inhibition de la fixation d'OPG sur RANK / RANK-L par l'héparine

L'héparine est un GAG fortement sulfaté, nous avons donc voulu savoir quelle est l'importance de la sulfatation dans l'action inhibitrice de l'héparine sur la fixation de l'OPG au complexe RANK / RANK-L. Pour cela, des molécules d'héparine sélectivement désulfatées ont été testées en comparaison à l'héparine normale. Les résultats présentés dans la figure 20 indiquent que les molécules 2-*O*-désulfatée, 6-*O*-désulfatée, *N*-désulfatée/*N*-ré-acétylée ont un pouvoir inhibiteur identique à celui de l'héparine normale. L'héparine *N*-désulfatée, inhibe quant à elle 85% de la fixation de l'OPG à RANK / RANK-L. Enfin, lorsque l'OPG est pré-incubée avec l'héparine totalement désulfatée, la fixation obtenue est parfaitement identique à celle de l'OPG seule. Ces résultats montrent donc que l'héparine totalement désulfatée n'est plus capable d'inhiber la fixation d'OPG à RANK / RANK-L contrairement aux autres formes testées.

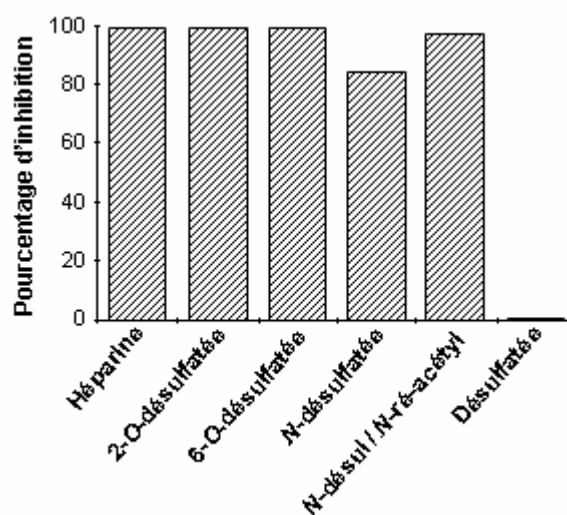


Figure 20 : Importance de la sulfatation dans l'activité inhibitrice de l'héparine.

L'OPG 100 nM est incubée, pendant 30 min à température ambiante, avec différentes molécules d'héparine sélectivement désulfatée à 400 nM, puis injectée sur le complexe RANK / RANK-L préformé. Immobilisation : 3598 RU ; débit : 5 µl/min ; volume injecté : 50 µl.

III.2.4. Détermination de la taille minimale de la chaîne saccharidique présentant une activité inhibitrice

Afin de déterminer la taille minimale de la chaîne saccharidique présentant une activité inhibitrice identique à celle de l'héparine, différents oligosaccharides ont été testés. Avec le plus petit oligosaccharide utilisé, un tétrasaccharide (dp4), seule une faible inhibition (2,2%) est observée (figure 21). Cette inhibition augmente avec la taille des oligosaccharides puisqu'elle est de 30,7% pour un hexasaccharide (dp6), de 88% pour un octosaccharide (dp8), et qu'elle atteint un maximum de 100% pour un décacaccharide (dp10) (figure 21). Ces résultats démontrent donc qu'une structure décacaccharidique est suffisante pour obtenir une inhibition totale de la fixation d'OPG au complexe RANK / RANK-L, identique à celle de l'héparine.

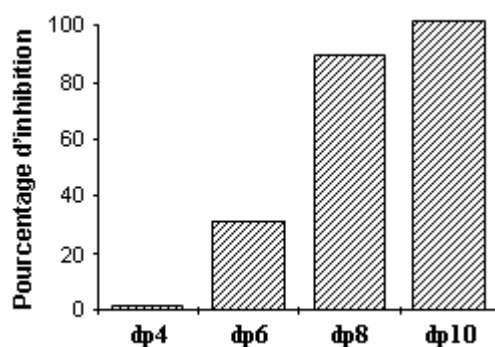


Figure 21 : Détermination de la taille minimale de la chaîne saccharidique présentant une activité inhibitrice.

L'OPG 100 nM est incubée, pendant 30 min à température ambiante, avec des oligosaccharides de différentes tailles (dp4 à dp10) à 400 nM, puis injectée sur le complexe RANK / RANK-L préformé. Immobilisation : 4930 RU ; débit : 5 µl/min ; volume injecté : 50 µl.

III.2.5. Effet de différents GAG sur la fixation de l'OPG au complexe RANK / RANK-L

Enfin, nous avons voulu comparer l'effet de l'héparine à celui d'autres GAG : héparane sulfate de muqueuse intestinale de porc (pHS) ; héparane sulfate de rein de bovin (bHS) ; dermatane sulfate (DS) ; chondroïtine sulfate (CS). A forte concentration (400 nM), ces molécules inhibent totalement la fixation de l'OPG au complexe RANK / RANK-L comme le fait l'héparine (figure 22). Par contre, pour une concentration inférieure (10 nM), des différences sont observées. Alors que l'héparine inhibe la liaison de l'OPG à RANK / RANK-L de 50%, les héparanes sulfates de porc et de bovin exercent une inhibition, respectivement, de 65 et 60%, le DS de 81% et le CS de 80% (figure 22). Ces résultats indiquent donc que les GAG testés, et en particulier le DS et le CS, inhibent la fixation de l'OPG au complexe RANK / RANK-L plus fortement que l'héparine.

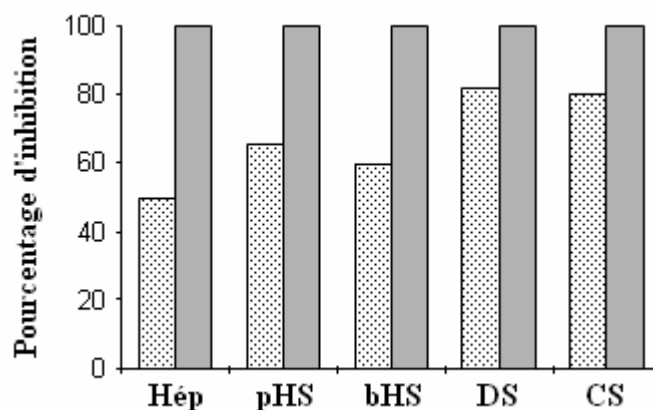


Figure 22 : Effet de différents GAG sur la fixation de l'OPG au complexe RANK / RANK-L.

L'OPG 100 nM est incubée à température ambiante pendant 30 min en présence ou non de différents glycosaminoglycanes à 10 nM (▨) ou 400 nM (■), puis injectée sur le complexe RANK / RANK-L préformé. Immobilisation : 4886 RU ; débit : 5 µl/min ; volume injecté : 50 µl.

Hép : héparine ; pHS : héparane sulfate de muqueuse intestinale de porc ; bHS : héparane sulfate de rein de bovin ; DS : dermatane sulfate ; CS : chondroïtine sulfate.

Ces différentes expériences ont permis de montrer que l'héparine est capable d'inhiber la fixation d'OPG au complexe RANK / RANK-L préformé et qu'un minimum de 10 résidus saccharidiques est nécessaire pour exercer l'abolition de cette fixation. De plus, la sulfatation est indispensable à cette inhibition mais elle n'a pas besoin d'être spécifique puisque des molécules sélectivement désulfatées en position N ou O conservent leur pouvoir inhibiteur. Enfin, des GAG, autres que l'héparine, sont également capables d'inhiber la fixation d'OPG au complexe RANK / RANK-L.

IV. ÉTUDE DE LA FIXATION D'OPG RADIOMARQUÉE

Les résultats obtenus précédemment, grâce à des études de résonance plasmonique de surface, ont démontrés que les molécules RANK, RANK-L et OPG pouvaient former un complexe ternaire et que l'interaction de l'OPG avec RANK / RANK-L pouvait être inhibée par l'héparine. Nous avons alors voulu étudier ces interactions dans un système plus physiologique et pour cela, l'OPG a été radiomarquée à l'iode 125 et sa fixation sur les cellules 2.93 RANK-L ou 2.93 RANK a été analysée dans différentes conditions.

IV.1. Étude de la fixation de l'OPG radiomarquée sur les cellules 2.93 RANK-L

Des concentrations croissantes d'OPG radiomarquée ont été incubées avec des cellules 2.93 ou 2.93 RANK-L pendant 90 min à 4°C puis, la radioactivité des cellules et des surnageants a été mesurée à l'aide d'un compteur gamma et comparée à celle des conditions « non spécifiques ». Les résultats obtenus mettent en évidence une très forte liaison spécifique de l'OPG sur les cellules 2.93 RANK-L (figure 23B) alors qu'elle ne se fixe pas aux cellules 2.93 (figure 23A). Ceci indique que la capacité de fixation de l'OPG n'a pas été altérée par le radiomarquage et qu'elle se fixe à RANK-L exprimé à la surface des cellules 2.93 RANK-L. La représentation de Scatchard correspondante (figure 23C) permet de déterminer que la constante de dissociation de cette liaison est égale à 0,38 nM et que le nombre de sites de fixation par cellule est d'environ 55000.

L'inhibition de cette liaison par RANK-L soluble (RANK-Ls) a alors été étudiée. Pour cela, avant d'être mise en présence des cellules 2.93 RANK-L, l'OPG, à une concentration fixe de 1 nM, est incubée avec une gamme de RANK-Ls (0,49 nM à 1 µM) pendant 1 heure à température ambiante. Dans ces conditions, RANK-Ls est capable d'inhiber, et ce de manière dose-dépendante, la fixation d'OPG aux cellules 2.93 RANK-L (figure 24).

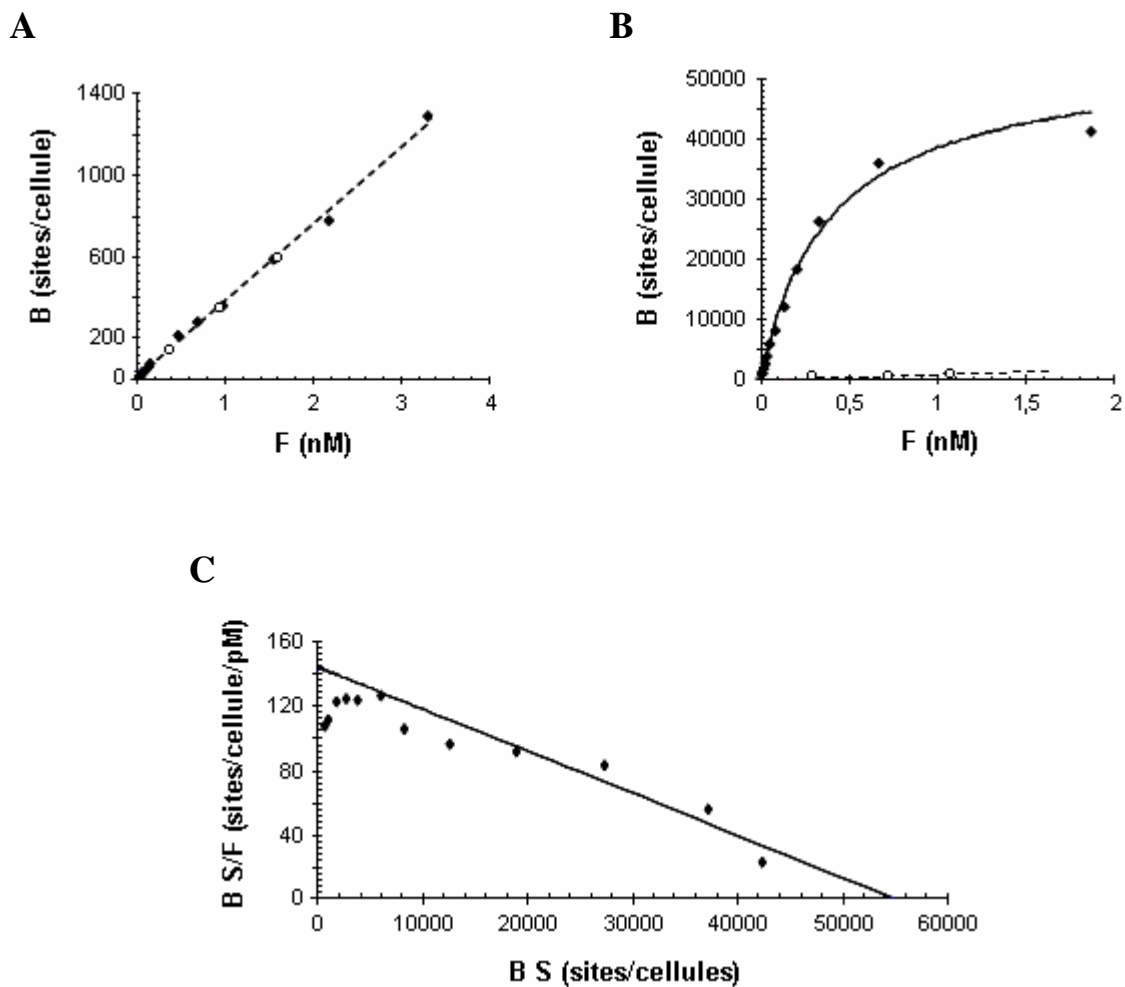


Figure 23 : Étude de la fixation de l'OPG radiomarquée sur les cellules 2.93 RANK-L.

Des concentrations croissantes d'OPG radiomarquée sont incubées, pendant 90 min à 4°C sous agitation douce, avec des cellules 2.93 (A) ou 2.93 RANK-L (B) (10^6 cellules/puits). L'OPG radiomarquée libre, F, est alors séparée de celle liée aux cellules, B, puis la radioactivité de chaque fraction est mesurée à l'aide d'un compteur gamma. RAS de l'OPG radiomarquée : 11978 cpm/fmol.

-○- : liaison non spécifique ; —◆— : liaison totale.

(C) Représentation de Scatchard correspondant à la fixation de l'OPG radiomarquée sur les cellules 2.93 RANK-L et permettant de déterminer que $K_D = 0,38$ nM et que $B_{max} = 55000$ sites/cellules.

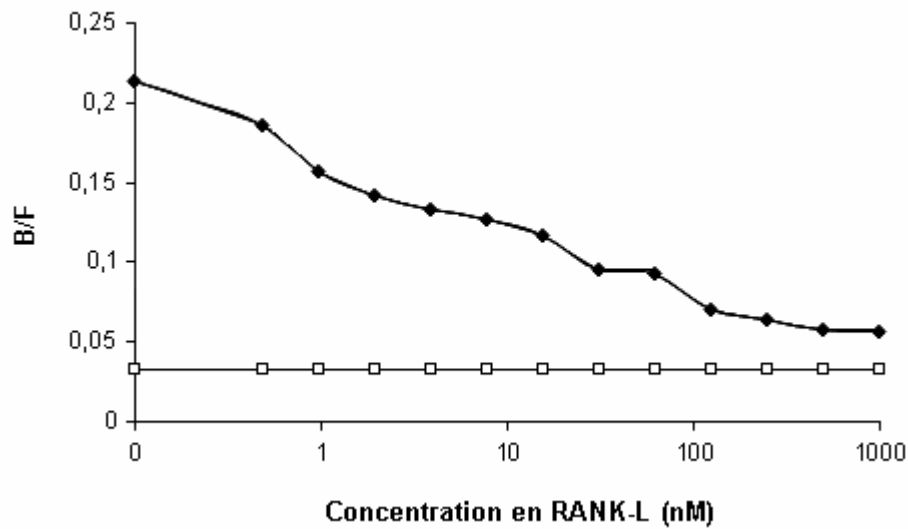


Figure 24 : Inhibition de la fixation de l'OPG aux cellules 2.93 RANK-L par RANK-Ls.

L'OPG radiomarquée 1 nM est incubée avec une gamme de RANK-Ls (0,49 nM à 1 μ M) pendant 1 heure à température ambiante puis mise en présence des cellules 2.93 RANK-L (10^6 cellules/puits). Après une incubation de 90 min à 4°C sous agitation douce, les cellules et surnageants sont séparés et la radioactivité de chaque fraction est mesurée à l'aide d'un compteur gamma. RAS de l'OPG radiomarquée : 14417 cpm/fmol.

—□— : liaison non spécifique ; —◆— : OPG + RANK-L.

L'effet de l'héparine sur la fixation de l'OPG à RANK-L, ainsi que celui d'un tétrasaccharide (dp4) et d'un décasaccharide (dp10), a ensuite été analysé. L'OPG a été pré-incubée avec ces molécules (gamme de 0,02 à 5 μM) pendant une heure à température ambiante, puis mise en présence des cellules 2.93 RANK-L pendant 90 min à 4°C. Le tétrasaccharide n'exerce aucune inhibition sur la fixation de l'OPG (figure 25) comme c'était le déjà cas dans les expériences de résonance plasmonique de surface. Par contre, contrairement à ce qui avait été observé dans ces expériences, ni l'héparine, ni le décasaccharide n'inhibe la liaison de l'OPG à RANK-L (figure 25).

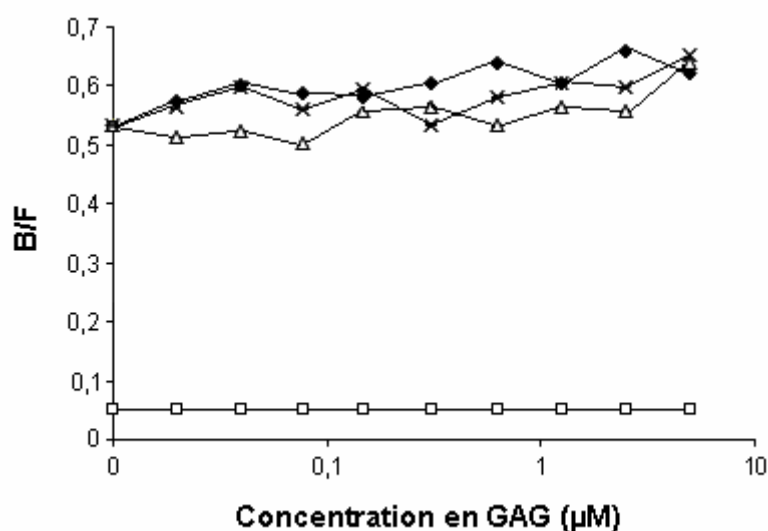


Figure 25 : Étude de l'effet de la pré-incubation de l'OPG avec différents GAG sur sa fixation aux cellules 2.93 RANK-L.

L'OPG radiomarquée 1 nM est incubée avec une gamme d'héparine, de tétrasaccharide (dp4) ou de décasaccharide (dp10) (0,02 à 5 μM) pendant 1 heure à température ambiante puis mise en présence des cellules 2.93 RANK-L (10^6 cellules/puits). Après une incubation de 90 min à 4°C sous agitation douce, les cellules et surnageants sont séparés et la radioactivité de chaque fraction est mesurée à l'aide d'un compteur gamma. RAS de l'OPG radiomarquée : 14417 cpm/fmol.

—□— : liaison non spécifique ; —◆— : OPG + Héparine ; —△— : OPG + dp4 ; —×— : OPG + dp10.

IV.2. Étude de la fixation de l'OPG radiomarquée sur les cellules 2.93 RANK

Les cellules 2.93 RANK sont incubées en présence ou non de 500 ng/ml de RANK-L pendant 45 min à 4°C ou à température ambiante, rincées, puis mises en présence d'une gamme d'OPG radiomarquée. Après 90 min d'incubation à 4°C, les cellules et le surnageant sont séparés et leur radioactivité est déterminée puis comparée à celle des conditions « non spécifiques ».

Lorsque l'OPG radiomarquée est mise en présence de cellules 2.93 RANK, non incubées avec RANK-L, aucune fixation spécifique n'est observée (figure 26A). Il en est de même lorsque les cellules ont préalablement été incubées en présence de RANK-L à 4°C ou à température ambiante (figures 26B et 26C). Ces expériences n'ont donc pas permis de confirmer la formation du complexe ternaire RANK / RANK-L / OPG.

Ces différents résultats ont montré que l'OPG radiomarquée à l'iode 125 a la capacité de se lier à RANK-L exprimé à la surface des cellules 2.93 RANK-L, et que cette fixation peut être inhibée par des concentrations croissantes de RANK-Ls mais pas par l'héparine, un tétrasaccharide ou un décasaccharide. Enfin, la formation du complexe ternaire RANK / RANK-L / OPG, observée dans les précédentes expériences de résonance plasmonique de surface, n'a pu être confirmée.

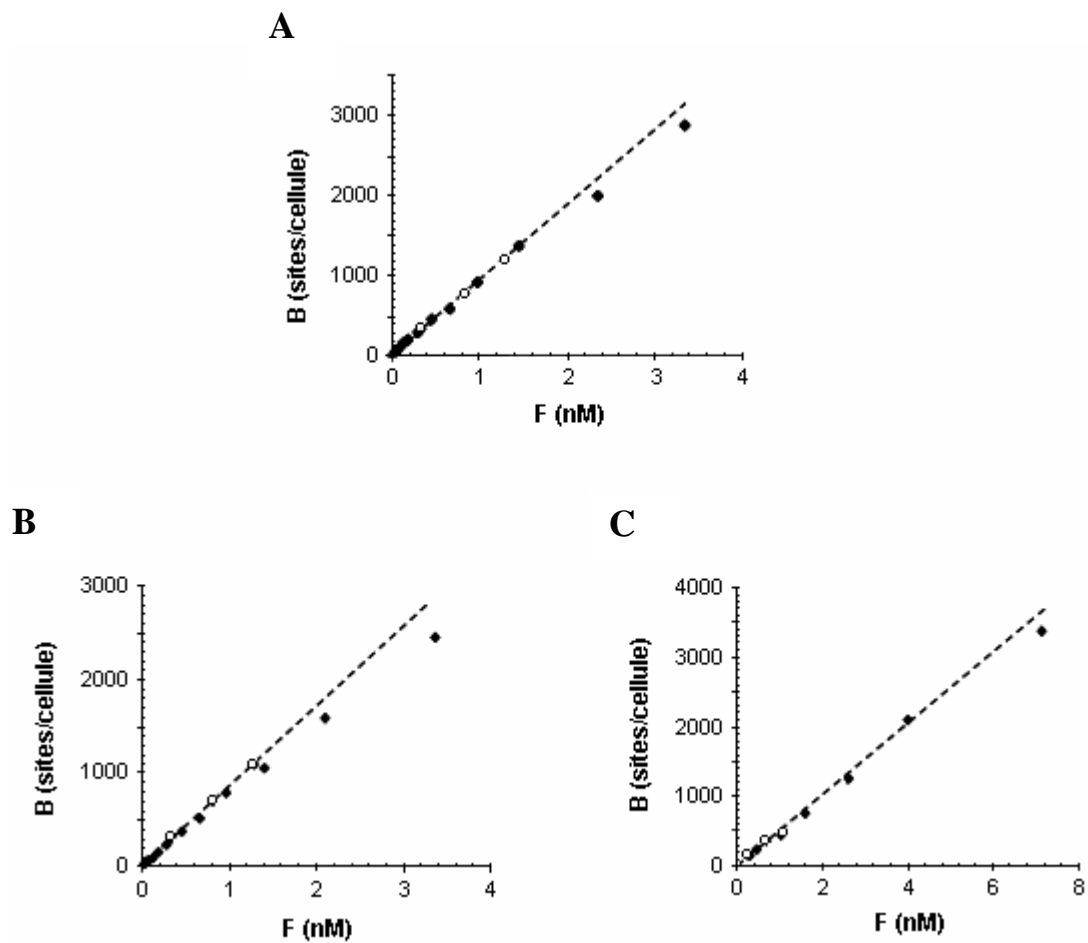


Figure 26 : Étude de la fixation de l'OPG radiomarquée sur les cellules 2.93 RANK

Des concentrations croissantes d'OPG radiomarquée sont incubées, pendant 90 min à 4°C sous agitation douce, avec des cellules 2.93 RANK (A) ou avec des cellules 2.93 RANK pré-incubées avec 500 ng/ml de RANK-L pendant 45 min à température ambiante (B) ou à 4°C (C) (10^6 cellules/puits). L'OPG radiomarquée libre, F, est alors séparée de celle liée aux cellules, B, puis la radioactivité de chaque fraction est mesurée à l'aide d'un compteur gamma. RAS de l'OPG radiomarquée : 12697 cpm/fmol.

-○- : liaison non spécifique ; —◆— : liaison totale.

V. INFLUENCE DE L'OPG SUR LA DEMI-VIE DE RANK-L

V.1. Étude du devenir de l'OPG liée aux cellules 2.93 RANK-L par microscopie confocale

La fixation de l'OPG à RANK-L exprimé à la surface des cellules 2.93 RANK-L a également été étudiée en microscopie confocale. Pour cela, ces cellules sont incubées en présence ou en absence d'OPG à 100 ng/ml pendant 1 heure à 4°C, rincées, puis placées ou non à 37°C pendant 30 min, 1 heure ou 3 heures., avant d'être déposées sur une lame de verre. Une incubation avec un anticorps anti-OPG biotinylé est alors effectuée suivie d'une incubation avec une solution de streptavidine-FITC.

L'analyse des images obtenues montre tout d'abord qu'en absence d'OPG aucun marquage n'est détecté (figure 27A). Ensuite, lorsque les cellules ne sont pas placées à 37°C après leur incubation avec l'OPG, celle-ci se trouve localisée au niveau de la membrane des cellules 2.93 RANK-L (figure 27B). Par contre, quand une incubation à 37°C est effectuée, une internalisation (localisation cytoplasmique) puis une dégradation de l'OPG sont observées (figures 27C-E).

Ces résultats indiquent donc que l'OPG se fixe aux cellules 2.93 RANK-L puis qu'elle est internalisée et dégradée de manière dépendante du temps.

V.2. Étude de l'influence de l'OPG sur la demi-vie de RANK-L par western blot

Nous venons de voir que l'OPG, lorsqu'elle se fixe aux cellules 2.93 RANK-L, peut être internalisée puis dégradée, mais que ce passe-t-il au niveau de RANK-L ? Pour répondre à cette question, les cellules 2.93 RANK-L ont été incubées, à 37°C pendant 2, 3, 4 ou 6 heures, en présence d'un inhibiteur de synthèse protéique, le cycloheximide, à 4 µg/ml avec ou sans OPG à 100 ng/ml. Les cellules sont ensuite lysées, puis la présence de RANK-L est

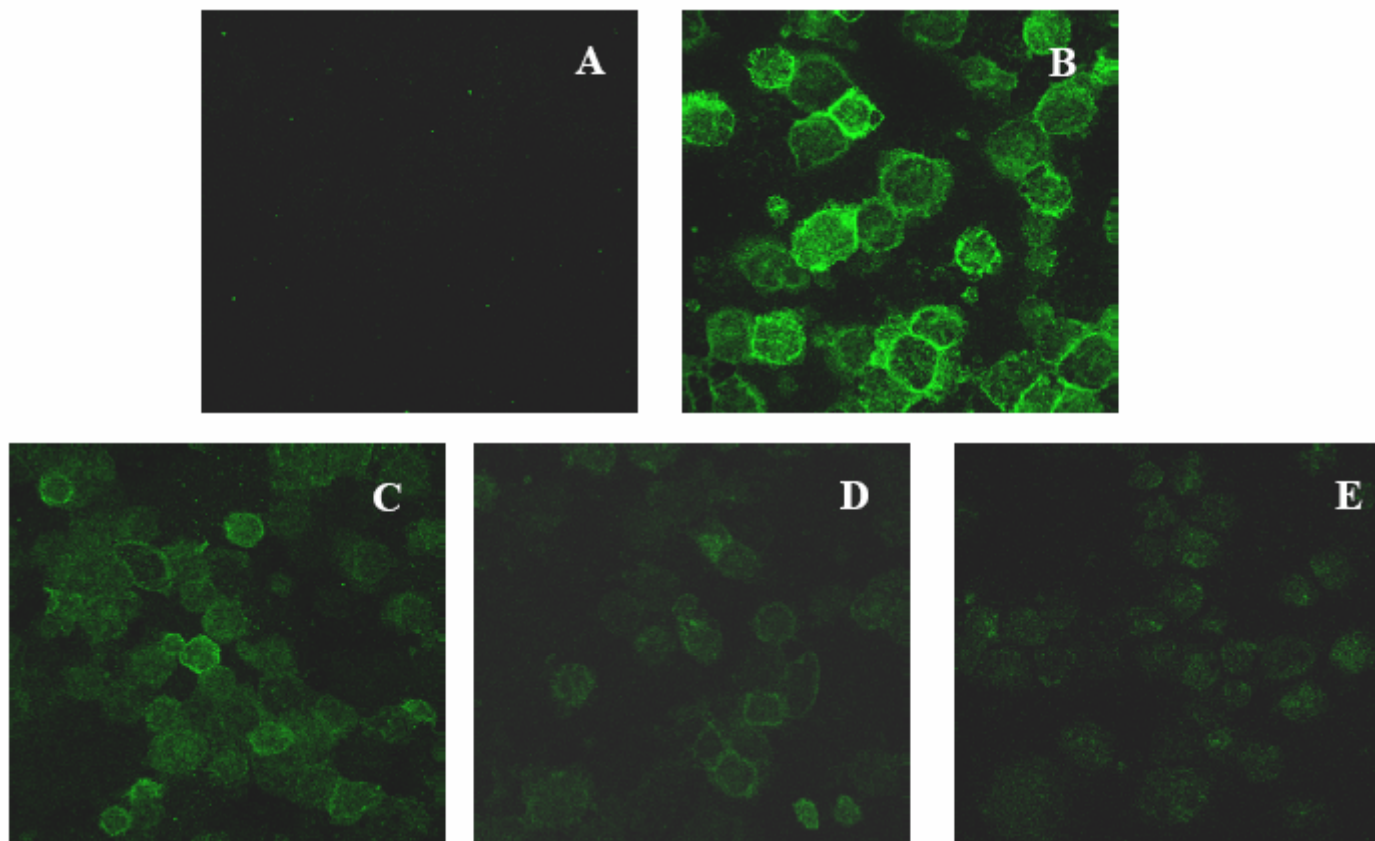


Figure 27: Étude du devenir de l'OPG liée aux cellules 2.93 RANK-L par microscopie confocale.

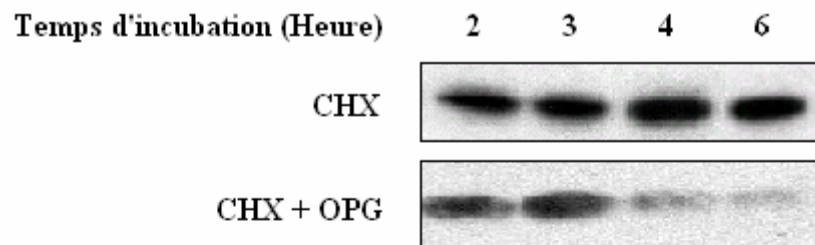
Les cellules 2.93 RANK-L sont incubées sans (A) ou avec de l'OPG à 100 ng/ml pendant une heure à 4°C (B). Le milieu est alors remplacé par du milieu frais sans OPG et les cellules sont incubées à 37°C pendant 30 minutes (C), 1 heure (D) ou 3 heures (E). Après avoir été déposées sur une lamelle de verre à l'aide d'un cytopspin, puis perméabilisées, les cellules sont incubées avec un anticorps anti-OPG biotinylé puis avec une solution de streptavidine-FITC.

déterminée par western blot. Lorsque les cellules sont incubées en absence ou en présence de cycloheximide, aucune variation de l'expression de RANK-L n'est observée (figure 28A). Au contraire, quand cette incubation est réalisée avec de l'OPG une diminution de RANK-L est mise en évidence dès 4 heures et s'accroît à 6 heures d'incubation (figure 28A). Ces résultats indiquent donc que l'OPG influence la demi-vie de RANK-L membranaire en stimulant son internalisation et sa dégradation.

Afin d'étudier l'effet des GAG dans cette activité biologique de l'OPG, des expériences similaires ont été réalisées en pré-incubant préalablement, pendant 30 min à température ambiante, l'OPG à 100 ng/ml (0,91 nM) avec 91 nM d'héparine, de tétrasaccharide, de décasaccharide, d'héparane sulfate, de dermatane sulfate ou de chondroïtine sulfate. Les résultats présentés dans la figure 28B montrent que seul le tétrasaccharide est sans effet sur l'internalisation de RANK-L induite par l'OPG, toutes les autres molécules testées inhibent cette activité de l'OPG.

Ces expériences démontrent que l'OPG est capable de diminuer la demi-vie de RANK-L exprimé à la surface des cellules 2.93 RANK-L et que l'héparine, l'héparane sulfate, le chondroïtine sulfate, le dermatane sulfate de même qu'un décasaccharide peuvent inhiber cet effet de l'OPG alors qu'un tétrasaccharide ne le peut pas.

A



B

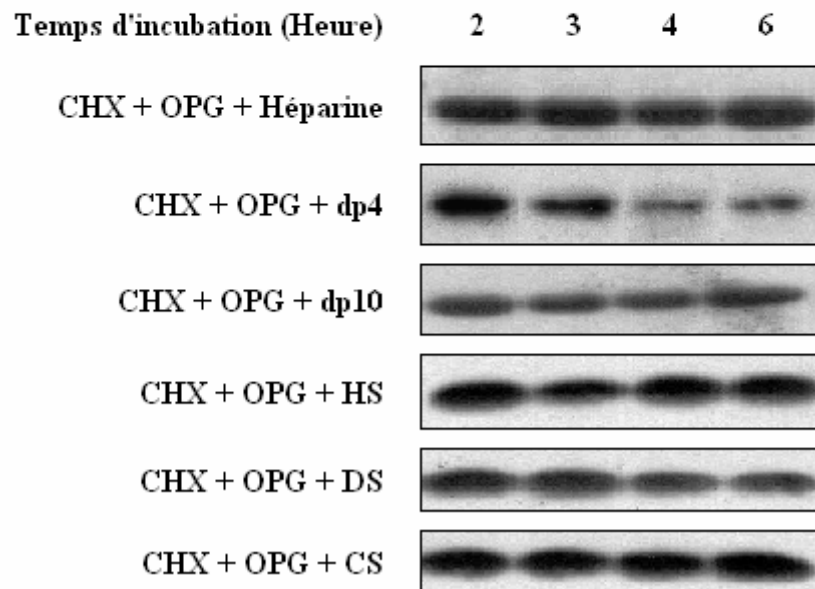


Figure 28 : Étude de l'influence de l'OPG sur la demi-vie de RANK-L par western blot

Les cellules 2.93 RANK-L sont incubées en présence de cycloheximide à 4 µg/ml, avec ou sans OPG à 100 ng/ml (0,91 nM) pendant 2, 3, 4 ou 6 heures (A). Dans d'autres expériences l'OPG est pré-incubée pendant 30 min 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 (B). Les cellules sont alors lysées puis l'expression de RANK-L est analysée par western blot.

VI. SOUS-CLONAGE ET TRANSFECTION DU SYNDECAN-1

Comme nous l'avons déjà vu, les travaux de l'équipe de Standal ont montré que le syndecan-1 pouvait, dans les cellules de myélome, fixer l'OPG et induire son internalisation et sa dégradation (Standal et al, 2002). De plus, les résultats obtenus précédemment ont mis en évidence que différents GAG sont capables d'interagir avec le système OPG / RANK-L / RANK. Il nous est alors paru intéressant de transférer les cellules 2.93 RANK avec le syndecan-1 afin de posséder une cellule sur-exprimant ces deux molécules. Dans ce but un sous-clonage du syndecan-1 a tout d'abord été effectué.

VI.1. Sous-clonage du syndecan-1

L'ADNc codant pour le syndecan-1 humain en notre possession était au départ intégré dans le même vecteur que celui codant pour RANK, à savoir le pcDNA₃-néomycine. Il a donc fallu le sous-cloner dans un vecteur possédant un gène de résistance différent, ici le pcDNA₃-hygromycine. Suite aux digestions par les enzymes de restriction et à l'action de la phosphatase alcaline, des ligations ont été réalisées sous trois conditions :

- la solution plasmidique contenant le pcDNA₃-néomycine/syndecan-1 digéré par Not I, Hind III et Spe I,
- la solution plasmidique contenant le pcDNA₃-hygromycine digéré par Not I, Hind III et ayant subi l'action de la phosphatase alcaline,
- les deux solutions plasmidiques précédentes ensemble.

Pour chaque condition une incubation avec et sans T4-DNA ligase est effectuée. Les produits de la ligation sont ensuite utilisés pour transformer, par choc thermique, des bactéries *Escherichia coli* DH5 α préalablement rendues compétentes et sensibles à l'ampicilline.

Vecteurs	Solution plasmidique 1		Solution plasmidique 2		Solutions plasmidiques 1 + 2	
	-	+	-	+	-	+
T4 DNA ligase	-	+	-	+	-	+
Nombre de colonies	0	>200	35	89	22	>400

Tableau 5 : Résultats des transformations bactériennes.

Des bactéries *Escherichia coli* DH5 α préalablement rendues compétentes et sensibles à l'ampicilline, sont transformées par choc thermique avec les solutions plasmidiques 1 et 2 ayant subi l'action de la T4 DNA ligase ou non. Ces bactéries sont ensuite sélectionnées sur du milieu LB solidifié et supplémenté avec de l'ampicilline à la concentration finale de 100 $\mu\text{g/ml}$. Le nombre de colonies dans chaque condition est déterminé après une nuit d'incubation à 37°C.

Solution plasmidique 1 : pcDNA₃-néomycine/syndecan-1 digéré par Not I, Hind III et Spe I.

Solution plasmidique 2 : pcDNA₃-hygromycine digéré par Not I, Hind III et ayant subi l'action de la phosphatase alcaline.

Les résultats de ces transformations sont présentés dans le tableau 5. Dans les deux conditions témoins correspondant aux produits de ligation des deux solutions plasmidiques seules avec T4-DNA ligase, une re-circularisation des deux plasmides est observée. Ce repliement est élevé pour le pcDNA₃-néomycine/syndecan-1 avec plus de 200 colonies tandis que pour le pcDNA₃-hygromycine seulement 89 colonies se sont formées. Cependant, les résultats de la transformation par les produits de ligation des deux solutions plasmidiques réunies peuvent être pris en compte puisqu'un taux de transformation supérieur aux conditions témoins est observé avec plus de 400 colonies.

Vingt clones bactériens issus de la transformation par les produits de ligation des deux solutions plasmidiques réunies, ont alors été utilisés pour réaliser des mini-préparations d'ADN plasmidique. L'ADN ainsi obtenu est alors digéré par Hind III et Not I afin de vérifier la présence de l'insert syndecan-1. Quatre clones sur les 20 se sont avérés positifs pour l'insert syndecan-1, dont le clone 10. La figure 29A présente la migration des vecteurs pcDNA₃-néomycine/syndecan-1, pcDNA₃-hygromycine et du clone 10 digérés, ou non, par différentes enzymes de restriction. La migration de l'ADN plasmidique non digéré montre, pour les trois plasmides, deux bandes correspondant aux formes enroulée et super enroulée de l'ADN. La digestion du clone 10 par Hind III et Not I met en évidence la présence d'une bande correspondant à l'insert syndecan-1, à la taille attendue de 2,5 kb, identique à celle obtenue par digestion du plasmide pcDNA₃-néomycine/syndecan-1. La seconde bande observée pour la digestion du pcDNA₃-néomycine/syndecan-1 représente le vecteur linéarisé à la taille attendue de 5,4 kb. Le vecteur pcDNA₃-hygromycine digéré par les enzymes Not I et Hind III présente quant à lui une seule bande, à la taille attendue de 5,6 kb, correspondant au plasmide linéarisé.

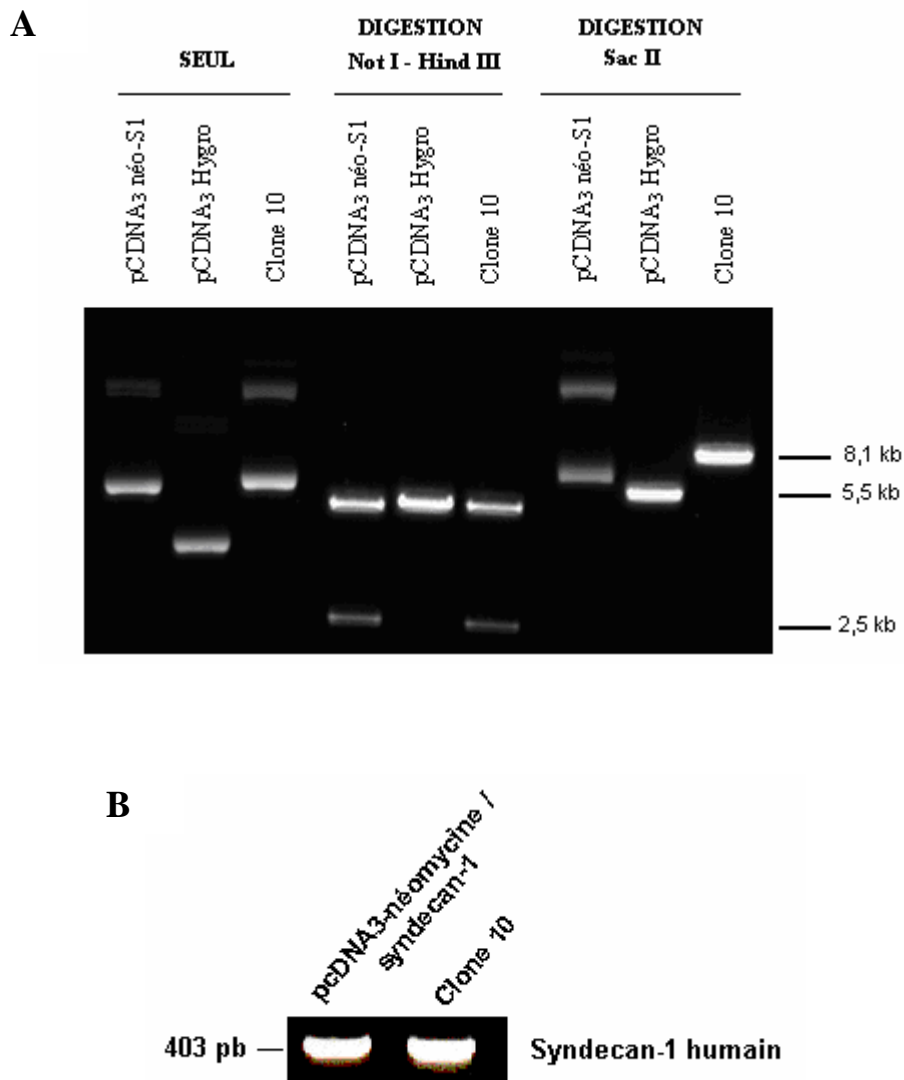


Figure 29: Détermination de la composition du clone 10.

(A) Les plasmides pcDNA₃-néomycine/syndecan1, pcDNA₃-hygromycine et le clone 10 sont digérés ou non par Hind III/Not I ou Sac II, puis les produits de digestion sont séparés par électrophorèse.

(B) Une PCR, permettant de mettre en évidence l'insert syndecan-1 humain, est réalisée sur le plasmide pcDNA₃-néomycine/syndecan1 et sur le clone 10.

Afin de déterminer dans quel plasmide l'insert syndecan-1 du clone 10 a été intégré, une digestion par l'enzyme Sac II, possédant un site de restriction uniquement sur le vecteur pcDNA₃-hygromycine, a été réalisée. Le plasmide pcDNA₃-néomycine présente deux bandes correspondant aux formes enroulée et super enroulée de l'ADN ce qui confirme qu'il est dépourvu de site pour l'enzyme de restriction Sac II (figure 29A). Le clone 10, quant à lui, a été linéarisé par l'enzyme Sac II, de même que le pcDNA₃-hygromycine (figure 29A), ce qui indique que le vecteur composant le clone 10 est le pcDNA₃-hygromycine. Enfin, la présence du syndecan-1 humain dans le clone 10 a été confirmée par PCR. Le plasmide pcDNA₃-néomycine/syndecan-1 d'origine a été utilisé comme témoin positif. Une bande de 403 pb correspondant à la taille du fragment attendu pour le syndecan-1 humain est observée pour les deux plasmides (figure 29B).

Ces expériences permettent donc de conclure que le clone 10 correspond bien au pcDNA₃-hygromycine/syndecan-1 recherché.

VI.2. Transfection des cellules 2.93 RANK par le plasmide pcDNA₃-hygromycine/syndecan-1

L'insert syndecan-1 ayant été vectorisé dans le pcDNA₃-hygromycine, la transfection des cellules 2.93-RANK a pu être réalisée. Après un mois de sélection par l'hygromycine B à 125 ng/mL, l'expression de l'ARNm du syndecan-1 est étudiée par RT-PCR et comparée à celle du 18S.

Les cellules 2.93 RANK expriment de façon endogène le syndecan-1 mais à un faible taux (figure 30) et la transfection devrait permettre d'augmenter ce taux d'expression. Cependant, aucune surexpression du syndecan-1 par les cellules 2.93 RANK, transfectées par le pcDNA₃-hygromycine/syndecan-1, n'a pu être observée (figure 30). Des expériences, permettant de comprendre ce résultat, sont en cours.

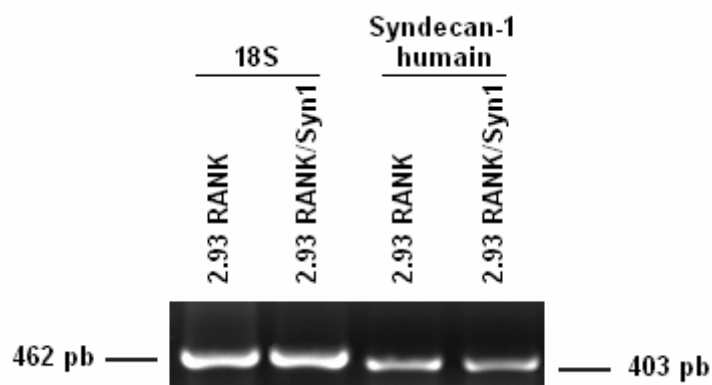


Figure 30 : Analyse par RT-PCR de l'expression du syndecan-1 humain dans les cellules 2.93 RANK et 2.93 RANK transfectées par le pcDNA₃-hygromycine/syndecan-1.

Les cellules 2.93 RANK sont transfectées avec le plasmide pcDNA₃-hygromycine/syndecan-1, puis, après 1 mois de sélection par l'hygromycine B à 125 ng/mL, les ARN totaux sont extraits. Une RT-PCR permettant de mettre en évidence le syndecan-1 humain est alors réalisée sur ces cellules ainsi que sur les 2.93 RANK, et est comparée au 18S.

VII. ANALYSE PHÉNOTYPIQUE ET FONCTIONNELLE DE LYMPHOCYTES INFILTRANT LES TUMEURS

Article de référence :

- *Theoleyre S, Mori K, Cherrier B, Passuti N, Gouin F, Redini F, Heymann D. Phenotypic and functional analysis of lymphocytes infiltrating osteolytic tumors: use as a possible therapeutic approach of osteosarcoma. BMC Cancer. 2005. 5:123.*

VII.1. Analyse phénotypique des TIL provenant de biopsies de tumeurs humaines

Les TIL ont pu être extraits à partir de petits fragments (1 mm³) de différentes tumeurs mis en culture immédiatement après la biopsie, excepté pour les chondrosarcomes, la dysplasie fibreuse et 50% des métastases osseuses (tableau 4). Ces TIL ont ensuite été maintenus en culture et amplifiés, pendant trois semaines en présence d'IL-2 à 300 UI/ml, afin d'être analysés par cytométrie en flux.

Les TIL ainsi isolés (figure 31, barres hachurées) sont majoritairement CD3⁺ (de 65 à 99%). Les TIL issus de plasmocytomes présentent un profil préférentiellement CD4⁺ (moyenne : 64,4%) avec une petite sous-population CD8⁺ (moyenne : 6,4%) (figure 31). De la même manière, les TIL provenant d'ostéosarcomes sont essentiellement CD4⁺ (moyenne : 49,9%) mais possèdent une sous-population CD8⁺ plus importante (moyenne : 15,5%). Les TIL issus de sarcomes d'Ewing, de TCG ou de métastases osseuses sont quant à eux caractérisés par des profils CD4⁺ et CD8⁺ équivalents (environ 40%) (figure 31). Un faible pourcentage de cellules CD20⁺ et CD161⁺ est également observé dans chaque pathologie sans corrélation avec l'histologie de la tumeur.

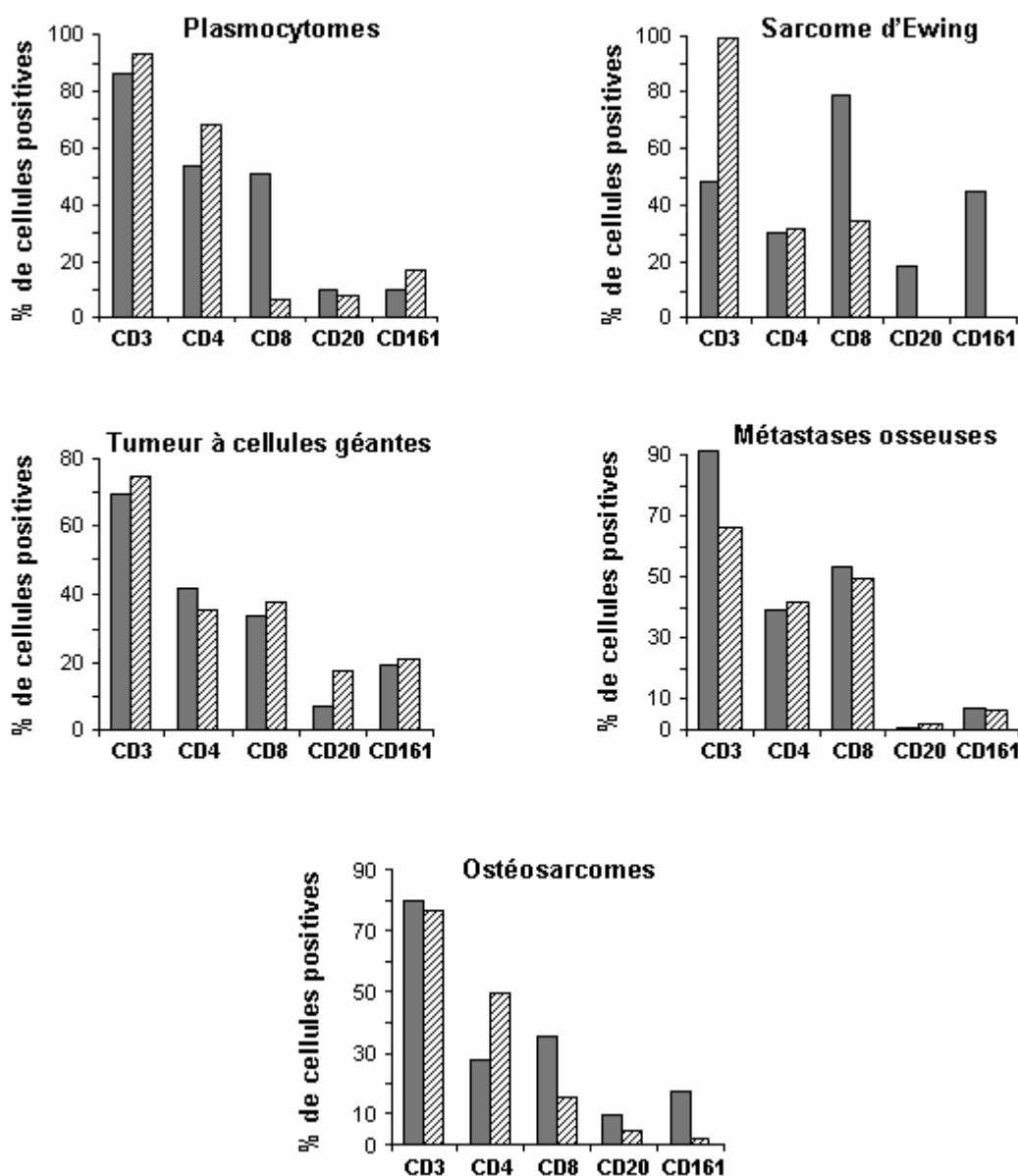


Figure 31 : Analyse phénotypique des TIL provenant de biopsies de tumeurs humaines comparés aux PBL autologues.

Les TIL sont isolés à partir de biopsies de tumeurs et cultivés pendant 21 jours dans du RPMI 1640 supplémenté avec 10% de SVF, 300 UI/ml d'IL-2. Les PBL autologues sont isolés à partir du sang périphérique, par séparation par gradient de densité et cultivés dans les mêmes conditions pendant 21 jours. Les TIL (barres hachurées) et les PBL (barres grises) sont ensuite analysés par cytométrie en flux. Le pourcentage de cellules positives donné correspond à la moyenne des valeurs obtenues. Plasmocytome, n = 2 ; sarcome d'Ewing, n = 2 ; tumeur à cellules géantes, n = 7 ; métastases osseuses, n = 4 ; ostéosarcome, n = 6.

Afin de comparer les TIL et les PBL issus d'un même patient, une analyse phénotypique des PBL a ensuite été réalisée pour tous les cas inclus dans l'étude (figure 31, barres grises). Une importante diminution du pourcentage de cellules CD8⁺ dans les TIL issus de plasmocytomes, de sarcomes d'Ewing et d'ostéosarcomes est observée en comparaison aux PBL (respectivement 88, 58 et 57%). Un fort taux de cellules Natural Killer (NK) CD161⁺ (43%) a par ailleurs été détecté dans les PBL de patients atteints de sarcome d'Ewing ce qui contraste avec les autres pathologies (figure 31).

VII.2. Analyse de la cytotoxicité des TIL humains

Afin de déterminer l'activité cytotoxique des TIL amplifiés, des tests de cytotoxicité au ⁵¹Cr ont été réalisés. Pour cela, les TIL sont mis en présence de différentes lignées allogéniques préalablement incubées avec du ⁵¹Cr. Les cellules utilisées ici sont les lignées Daudi (lignée de lymphome B humain), K562 (lignée érythroleucocytaire humaine), MG63 et SaOS2 (lignées d'ostéosarcome humain présentant respectivement un état de différenciation ostéoblastique faible et élevé).

Les TIL provenant des plasmocytomes, des sarcomes d'Ewing et des TCG, ne possèdent aucune activité lytique contre les lignées allogéniques testées. Par contre, les TIL extraits des biopsies d'ostéosarcomes présentent une activité cytotoxique, contre toutes les lignées cellulaires utilisées, significative comparée aux PBL autologues ($P < 0,01$) (figure 32). Cette activité cytotoxique varie selon le rapport cible/effecteur (C/E) considéré. En effet, l'intensité de la réponse cytotoxique des TIL contre les K562 varie de 50 à 70% pour des rapports C/E de 1/12,5 à 1/50 respectivement. Pour les Daudi, SaOS2 et MG63, cette réponse atteint 20% pour un rapport C/E de 1/12,5 et 65% pour un rapport C/E de 1/50. Pour tous les ostéosarcomes analysés, les PBL autologues présentent une faible cytotoxicité contre les quatre lignées allogéniques, et aucune dose-réponse n'a été observée (figure 32).

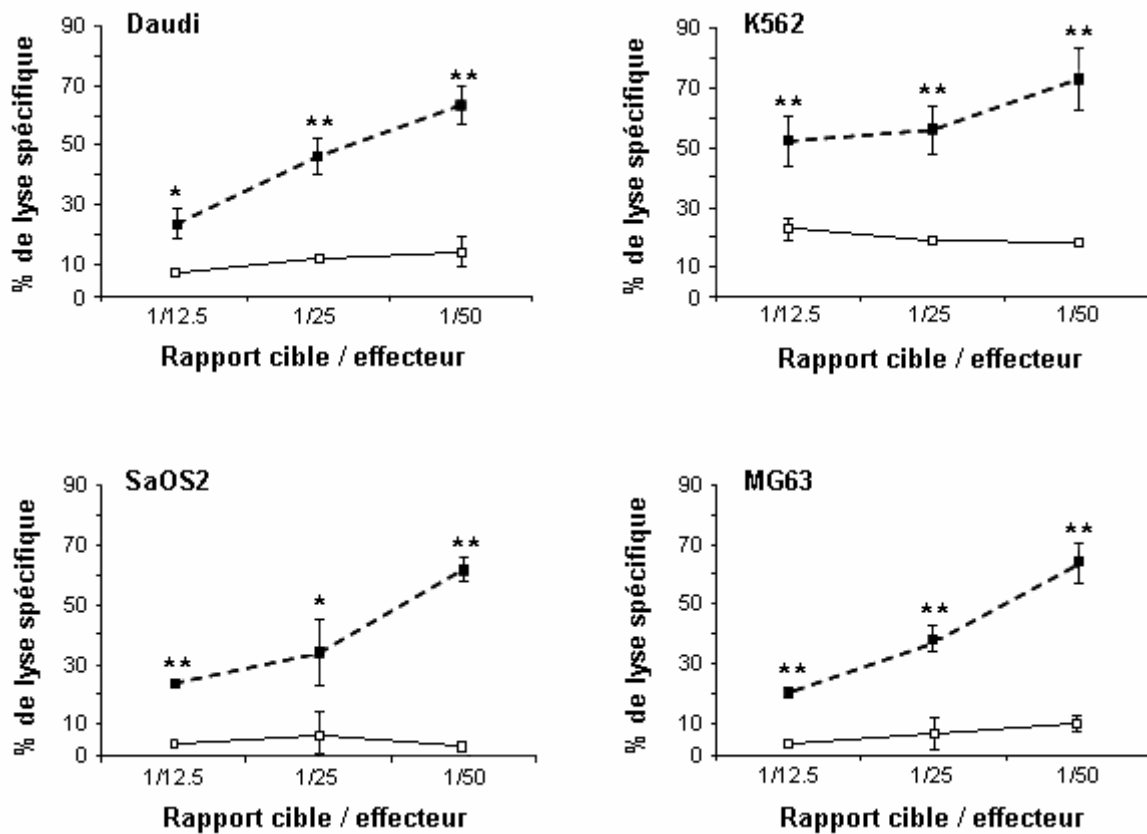


Figure 32 : Comparaison de la cytotoxicité des TIL et des PBL de patients atteints d'ostéosarcome.

Les TIL sont isolés à partir de biopsies de patients atteints d'ostéosarcome (n = 6), et les PBL autologues à partir du sang périphérique, par séparation par gradient de densité. Après 21 jours de culture dans du RPMI 1640 supplémenté avec 10% de SVF, 300 UI/ml d'IL-2, leur cytotoxicité est déterminée par des tests de relargage du ^{51}Cr . Les lignées allogéniques Daudi, K562, SaOS2 et MG63 sont utilisées comme cellules cibles. * $P < 0,01$; ** $P < 0,001$.

VII.3. Analyse phénotypique et cytotoxique des TIL issus d'ostéosarcome de rat

Les TIL amplifiés à partir des biopsies d'ostéosarcome de rat, présentent le même phénotype que les TIL issus d'ostéosarcomes humains. En effet, les TIL de rat sont à 90% CD3⁺, à 50% CD4⁺ et à 18% CD8⁺ (figure 33, barres hachurées). Les PBL autologues ont un rapport CD4⁺/CD8⁺ inversé avec 16% de CD4⁺ et 32% de CD8⁺ (figure 33, barres grises).

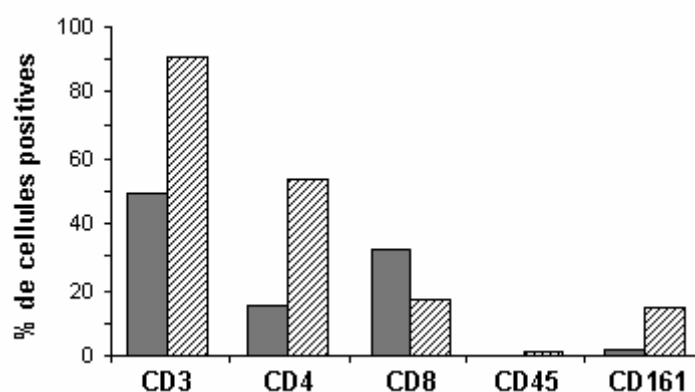


Figure 33 : Analyse phénotypique des TIL issus d'ostéosarcome de rat, comparés aux PBL autologues.

Les TIL sont isolés à partir de biopsies d'ostéosarcome de rat (n = 8) par traitement enzymatique et sont cultivés pendant 14 jours dans du milieu X-VIVO 15 supplémenté avec de l'IL-2 à 900 UI/ml. Les PBL autologues sont isolés à partir du sang périphérique, par séparation par gradient de densité et cultivés dans les mêmes conditions pendant 14 jours. Les TIL (barres hachurées) et les PBL (barres grises) sont ensuite analysés par cytométrie en flux. Le pourcentage de cellules positives donné correspond à la moyenne des valeurs obtenues.

Les tests de cytotoxicité au ⁵¹Cr indiquent, quant à eux, que les TIL de rat ont une activité lytique contre les lignées tumorales autologue et allogéniques (UMR 106, ROS 17/2.8), similaire à celle des TIL humains (figure 34). De plus, cette activité lytique est plus élevée quand elle est dirigée contre la lignée tumorale autologue et la lignée UMR 106 (63% pour un rapport C/E de 1/50) que contre les cellules ROS 17/2.8 (48% pour un rapport C/E de

1/50). Cependant, il faut noter que l'activité cytotoxique des PBL de rat est beaucoup plus importante que celle des PBL humains (figure 34).

La capacité des cellules tumorales autologues à stimuler la prolifération des TIL de rat a également été étudiée. Pour cela, les TIL ont été cultivés sans antigènes tumoraux pendant les 23 premiers jours, puis des cellules tumorales autologues irradiées ont été ajoutées. La figure 35 montre que la prolifération des TIL est caractérisée par une multiplication de plus de 4 fois du nombre de cellules durant les 3 premières semaines de culture, puis, durant les cinq jours suivants, par une rapide amplification, suite à l'ajout des cellules tumorales autologues irradiées, permettant d'atteindre un nombre de TIL 10 fois supérieur à celui de départ. Ces résultats indiquent donc que les TIL issus d'ostéosarcome de rat sont très sensibles aux antigènes tumoraux exprimés par les cellules tumorales autologues.

Ces différentes expériences démontrent donc qu'il est possible d'obtenir des TIL à partir de la plupart des pathologies tumorales osseuses étudiées, mais que seuls les TIL issus d'ostéosarcome présentent une activité cytotoxique contre des lignées tumorales allogéniques.

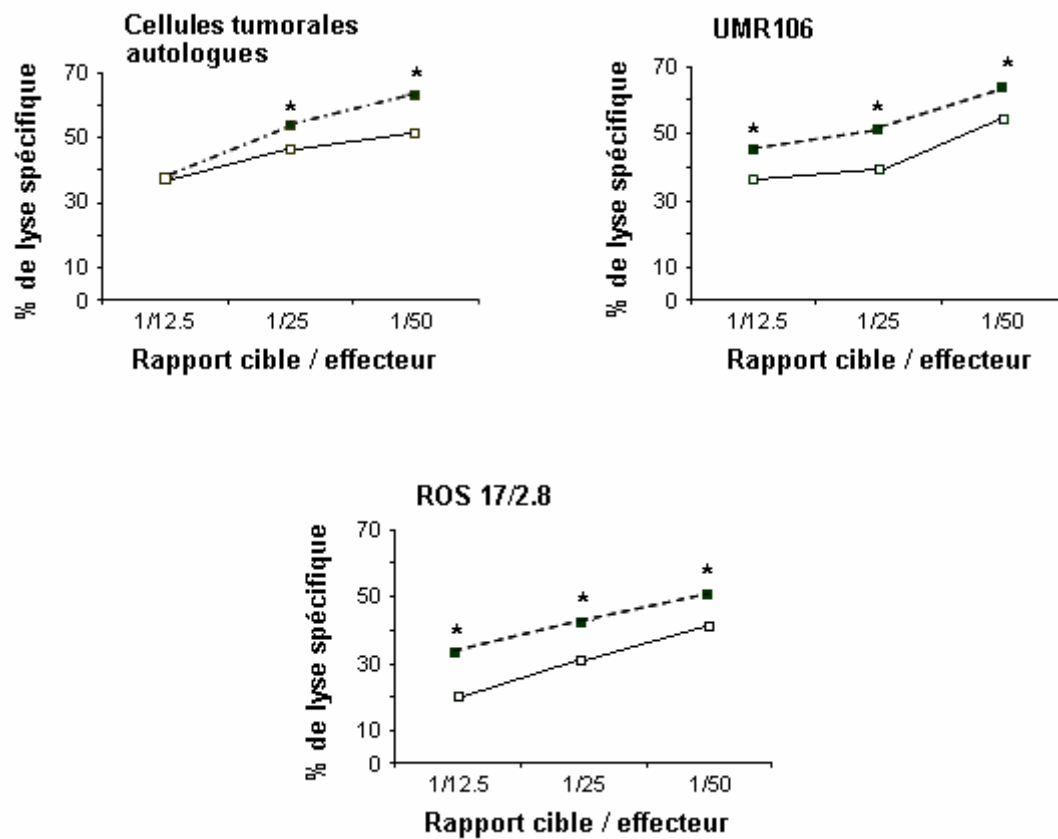


Figure 34 : Comparaison de la cytotoxicité des TIL et des PBL d'ostéosarcome de rat.

Les TIL sont isolés à partir de biopsies d'ostéosarcome de rat ($n = 8$), et les PBL autologues à partir du sang périphérique, par séparation par gradient de densité. Après 14 jours de culture dans du milieu X-VIVO 15 supplémenté avec de l'IL-2 à 900 UI/ml, leur cytotoxicité est déterminée par des tests de relargage du ^{51}Cr . Les lignées allogéniques d'ostéosarcome de rat UMR 106 et ROS 17/2.8 ainsi que les cellules tumorales autologues sont utilisées comme cellules cibles. * $P < 0,05$.

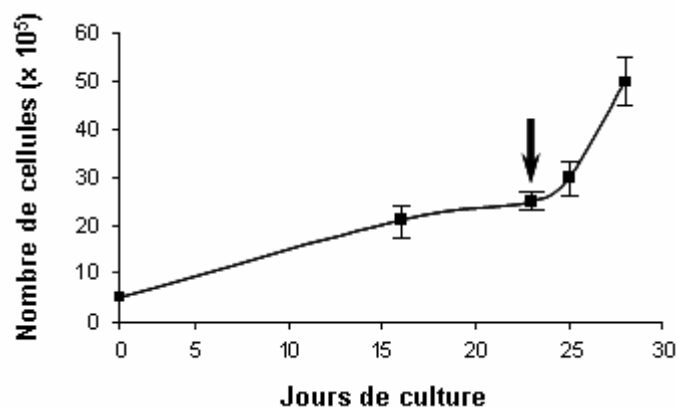


Figure 35 : Étude de la prolifération des TIL issus d'ostéosarcome de rat.

Les TIL sont isolés, à partir de biopsies d'ostéosarcome de rat, par traitement enzymatique et sont cultivés à 5×10^5 cellules/puits (dans des plaques 6 puits) pendant 28 jours dans du milieu X-VIVO 15 supplémenté avec de l'IL-2 à 900 UI/ml. Au jour 23 (flèche), 20×10^3 cellules tumorales autologues irradiées (75 grays) sont ajoutées dans chaque puits. Les TIL sont numérés par comptage au bleu trypan. Ces résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

DISCUSSION

Le tissu osseux est un tissu conjonctif complexe en perpétuel remaniement : la succession des phases d'apposition, assurées par les ostéoblastes, et de résorption, dépendantes de l'activité des ostéoclastes, permettent son renouvellement constant et son adaptation. Cependant, afin de permettre le maintien de la masse osseuse, ces deux processus doivent être finement régulés. Cette régulation est essentiellement contrôlée par des cytokines appartenant à la superfamille des Tumor Necrosis Factors (TNF) et de leurs récepteurs, et plus particulièrement par les molécules OPG, RANK-L et RANK. Cette triade représente en effet l'élément clé vers lequel converge la plupart des systèmes régulateurs de la résorption osseuse connus à ce jour. L'OPG est décrite comme étant un inhibiteur de l'interaction RANK-L/RANK et par conséquent un inhibiteur de la résorption osseuse. Cependant peu de choses sont connues sur son action directe sur les cellules osseuses. C'est pourquoi, dans la première partie de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'activité biologique de l'OPG et plus précisément à l'étude des mécanismes impliqués dans cette activité. Pour cela, deux modèles d'ostéoclastogenèse ont été utilisés, un modèle d'ostéoclastes purifiés de lapereaux et un modèle de précurseurs ostéoclastiques murins, la lignée RAW 264.7. Les interactions moléculaires entre la triade OPG / RANK-L / RANK et les protéoglycanes, ainsi que leur implication dans l'activité biologique de l'OPG, ont également été étudiées.

La seconde partie de travail porte sur la caractérisation phénotypique et fonctionnelle de TIL extraits à partir de biopsies de tumeurs osseuses humaines ou d'ostéosarcome de rat, et ce, dans le but d'évaluer leur intérêt thérapeutique. En effet, la réponse au traitement actuel des tumeurs osseuses, basé sur l'exérèse de la tumeur associée à une chimiothérapie, est souvent insuffisante, de nouvelles approches thérapeutiques, telle que l'immunothérapie passive, doivent donc être envisagées.

Les premières données suggérant que l'OPG pouvait se fixer à la surface de cellules eucaryotes ont été présentées par Kwon et al (1998). En effet, ces auteurs ont identifié une nouvelle molécule appelée TR1 (TNF Receptor related molecule 1) capable d'exercer des activités biologiques directes incluant l'inhibition de l'ostéoclastogénèse et la prolifération des fibroblastes. En réalité cette molécule est identique à l'OPG. Des expériences de Scatchard ont mis en évidence l'existence de deux récepteurs pour TR1, l'un de haute affinité ($K_D = 45 \text{ pM}$) et l'autre d'affinité moyenne ($K_D = 320 \text{ pM}$). Si le récepteur de haute affinité décrit par Kwon et al peut correspondre à RANK-L, celui d'affinité moyenne reste à identifier. Les mécanismes selon lesquels l'OPG exerce son activité biologique, ainsi que les caractéristiques de ses interactions moléculaires avec les ostéoclastes, ne sont pas clairement définis. L'équipe d'Hakeda et al a mis en évidence, pour la première fois, une activité directe de l'OPG sur des ostéoclastes isolés et ce *via* une protéine de 140 kDa (Hakeda et al, 1998). En effet, ces travaux ont révélés que l'OPG est capable d'inhiber, de manière directe, l'activité de résorption des ostéoclastes matures. La nature exacte du ou des récepteurs à l'OPG présents sur les ostéoclastes n'a pas, à ce jour, été mieux caractérisée. RANK-L a été éliminé des candidats potentiels puisqu'il n'est pas exprimé par les ostéoclastes, cependant, dans le modèle d'ostéoclastes de lapin utilisé, sa production par des cellules stromales contaminantes n'est pas à exclure.

Les surnageants de culture d'ostéoclastes purifiés de lapin présentent une activité métallo-protéasique que nous avons pu être mise en évidence par des expériences de zymographie. En effet, une bande majoritaire de 92 kDa, correspondant à la forme latente de la MMP9, et une bande beaucoup plus faible de 62 kDa, correspondant à la MMP2, ont été identifiées. Ces résultats sont en corrélation avec ceux obtenus en RT-PCR puisque l'ARNm de la MMP9 est exprimé à un taux élevé dans les ostéoclastes purifiés de lapin alors qu'un très faible signal a pu être détecté pour le messager de la MMP2. Dans des cultures de cellules

totales osseuses il est possible d'observer une activité MMP2 qui est vraisemblablement due aux ostéoblastes/cellules stromales (Rousselle et al, 2000), c'est pourquoi, dans les surnageants d'ostéoclastes purifiés, seule une très faible activité est détectable. L'activité MMP9 mise en évidence ici correspond quant à elle à l'activité de la forme latente de la protéase, ou pro-MMP9. Dans un environnement physiologique, cette pro-MMP9 pourrait ensuite être activée par des facteurs tels que la stromélysine ou la plasmine (Ramos-DeSimone et al, 1999).

L'expression et l'activité basales de la MMP9 dans les ostéoclastes peuvent être stimulées par l'OPG. En effet, l'ARMm de la MMP9 ainsi de l'activité de la pro-MMP9 sont fortement augmentés en présence d'OPG à 100 ng/ml. Une stimulation de l'activité de la MMP2 est de plus observée avec 100 ng/ml d'OPG. RANK-L est également capable de stimuler l'expression et l'activité de la MMP9 dans les ostéoclastes purifiés (Wittrant et al, 2003). Ces deux molécules, OPG et RANK-L, exercent donc la même activité stimulatrice sur la MMP9 ce qui révèle que l'action de l'OPG décrite ici n'est pas liée à une inhibition de RANK-L. Ces résultats sont cependant en contradiction avec le rôle inhibiteur de l'OPG sur la résorption osseuse. Les MMP ne sont pas seulement impliquées dans la dégradation de la matrice osseuse. En effet, la MMP9 joue aussi un rôle dans l'activité invasive des ostéoclastes. Dong et al ont confirmé cette hypothèse par des expériences d'inactivation de gène, et démontré l'implication de la MMP9 dans l'induction de la mobilité et le recrutement de pré-ostéoclastes par des cellules d'adénocarcinome prostatique issues de la lignée PC3 (Dong et al, 2005). Par conséquent, les MMP exprimées par les ostéoclastes pourraient être plus largement impliquées dans leurs propriétés de migration et d'attachement aux composants matriciels que dans la formation de la lacune de résorption. Ainsi, la stimulation des MMP par l'OPG pourrait être le reflet d'une régulation des mécanismes d'initiation de la résorption osseuse. Par ailleurs, l'étude de l'activité des MMP *in vitro* par zymographie ne

tient pas compte de la régulation de cette activité par les TIMP qui sont leurs inhibiteurs naturels. Par RT-PCR il a cependant été possible de montrer que l'OPG stimule également l'expression de TIMP-1 ce qui suggère que la balance entre l'activité des MMP et des TIMP puisse s'équilibrer en présence de ce facteur (Wittrant et al, 2002).

Afin de déterminer les voies de signalisation impliquées dans la stimulation de la MMP9 par l'OPG dans les ostéoclastes, nous avons utilisé des inhibiteurs spécifiques de différentes voies de transduction intracellulaires. Les résultats obtenus indiquent que l'inhibition de la PKC, des MAPK (ERK1/2 et p38), des tyrosines kinases ou de Ras abolit totalement la stimulation de la MMP9 induite par l'OPG. Ceci démontre que l'OPG a la capacité d'activer la voie des ras/MAPK dans les ostéoclastes et ainsi de stimuler l'expression de la MMP9 et l'activité de la pro-MMP9.

L'étude des voies de transduction activées par l'OPG a ensuite été poursuivie en utilisant la lignée murine RAW 264.7. Ces cellules, différenciées en présence de RANK-L et exprimant des marqueurs ostéoclastiques (RANK, TRAP, CTR, cathepsine K), nous ont permis de mettre en évidence l'induction de la phosphorylation des molécules ERK1/2 et p38 par l'OPG. Alors que ces cellules n'expriment pas RANK-L, un anticorps anti-RANK-L bloquant est capable d'inhiber totalement l'activation de p38 par l'OPG et de réduire légèrement celle de ERK1/2, démontrant ainsi que la signalisation induite par l'OPG est dépendante de RANK-L. De la même manière, un excès de RANK-L libre abolit également la phosphorylation de p38 par l'OPG. Dans les cellules RAW 264.7, RANK-L utilisé pour stimuler l'ostéoclastogenèse, est, comme l'ont démontré des expériences de cytométrie en flux, toujours fixé à RANK exprimé à la surface des ostéoclastes. Nous pouvons alors supposer que l'OPG se lie au complexe RANK / RANK-L et induit ainsi l'activation de p38. Cette hypothèse est renforcée par les résultats des expériences de résonance plasmonique de

surface qui ont révélé que l'OPG pouvait se fixer au complexe RANK / RANK-L préformé constituant alors un complexe ternaire RANK / RANK-L / OPG. De plus, la fixation d'un anticorps anti-RANK-L sur le complexe RANK / RANK-L inhibe la fixation ultérieure de l'OPG.

Ces résultats permettent donc d'expliquer l'activité biologique directe de l'OPG, sur les ostéoclastes purifiés de lapin et sur les cellules RAW 264.7 différenciées, grâce à la formation d'un hétéro-complexe moléculaire RANK / RANK-L / OPG. Ainsi, l'OPG se comporte comme un récepteur compétiteur en inhibant la fixation de RANK-L à RANK, mais peut également induire la phosphorylation de p38 *via* RANK-L. Ces actions de l'OPG peuvent dépendre de la séquence d'association de ces deux molécules. En effet, lorsque l'OPG se lie à RANK-L, avant que celui-ci n'interagisse avec RANK, l'OPG agit comme un récepteur compétiteur. Ceci a été confirmé par résonance plasmonique de surface puisque la pré-incubation de RANK-L avec l'OPG, inhibe la fixation ultérieure de RANK-L à RANK. Dans le cas où RANK-L se fixe à RANK, exprimé à la surface des ostéoclastes, avant d'interagir avec l'OPG, la formation d'un complexe ternaire est alors possible et l'OPG a la possibilité d'induire l'activation de p38.

L'existence de ce complexe ternaire n'a cependant pas pu être confirmée dans un modèle cellulaire. En effet, les expériences de Scatchard, réalisées sur les cellules 2.93 RANK pré-incubées avec RANK-L, n'ont pas permis d'obtenir une fixation spécifique de l'OPG radiomarquée. Plusieurs raisons peuvent expliquer ce résultat. Tout d'abord, les expériences de BIAcore sont réalisées à température ambiante alors que l'incubation des cellules avec l'OPG radiomarquée se fait à 4°C ce qui peut entraîner une modification des constantes cinétiques. La seconde hypothèse est liée à des différences de conformation. RANK est généralement présent à la membrane cellulaire sous forme trimérique (Locksley et al, 2001;

Walsh et Choi, 2003), cependant, dans les expériences de résonance plasmonique de surface, il est immobilisé de manière aléatoire sur le support de dextran, ce qui induit une conformation différente. De même, dans un modèle cellulaire, RANK-L se lie à RANK sous forme de trimère ce qui forme un complexe avec une stœchiométrie 3:3, présentant une conformation particulière et un encombrement stérique important (Locksley et al, 2001; Walsh et Choi, 2003). Dans les études de BIAcore, cette stœchiométrie est vraisemblablement modifiée ce qui peut induire une fixation de l'OPG au complexe RANK / RANK-L plus stable, et donc plus facile à mettre en évidence, que dans les expériences de Scatchard.

La faible inhibition, par un anticorps anti-RANK-L, de l'activation de ERK1/2 induite par l'OPG, suggère quant à elle l'existence d'un second site de liaison pour l'OPG qui reste à déterminer. Dans ce contexte, les protéoglycanes tels que le syndecan-1 semblent être de bons candidats. En effet, Standal et al ont révélé que l'OPG peut se lier au syndecan-1 exprimé à la surface des cellules de myélome, mettant ainsi en évidence un nouveau site de liaison potentiel pour l'OPG (Standal et al, 2002). Plus récemment, des travaux effectués par l'équipe de Mosheimer ont démontré que l'OPG affecte la migration des monocytes en interagissant avec le syndecan-1 (Mosheimer et al, 2005). RANK-L est également capable d'avoir un effet chimioattractant sur les monocytes (Breuil et al, 2003). Ces résultats indiquent, comme ceux que nous avons obtenus sur la MMP9, que l'OPG et RANK-L peuvent avoir des effets similaires, ce qui est en contradiction avec l'activité inhibitrice de l'OPG sur la liaison RANK / RANK-L classiquement décrite. L'interaction, de l'OPG avec le syndecan-1 révélée par Mosheimer et al, induit l'activation des voies dépendantes de la protéine kinase C, de la phosphatidylinositol-3-kinase/Akt et des tyrosines kinases. Ces résultats renforcent notre hypothèse selon laquelle l'activation, par l'OPG, de ERK1/2 dans les cellules RAW 264.7 pourrait être dépendante des protéoglycanes. D'autres expériences ont par ailleurs montrées

que le pervanadate peut activer des kinases intracellulaires conduisant à la phosphorylation de résidus tyrosine du syndecan-1 (Reiland et al, 1996). Les protéoglycanes, considérés comme des co-récepteurs pour les facteurs de croissance, sont ainsi également capables d'influencer l'activation de récepteurs tyrosines kinases variés (Bernfield et al, 1992). Dans nos expériences nous avons mis en évidence que l'activité MMP9, induite par l'OPG dans les ostéoclastes purifiés, est abolit par un inhibiteur des tyrosines kinases. Ceci renforce de nouveau l'hypothèse d'un rôle prépondérant des protéoglycanes dans l'activité biologique directe de l'OPG.

Afin d'étudier les interactions pouvant exister entre le système RANK / RANK-L / OPG et différents GAG, des expériences de résonance plasmonique de surface ont été réalisées. Nous avons tout d'abord pu confirmer que l'OPG, qui possède un site de liaison spécifique à l'héparine (Yamaguchi et al, 1998), se fixe sur cette molécule avec une forte affinité ($K_D = 0,28$ nM). Ensuite, alors qu'elle ne se fixe ni à RANK, ni aux complexes RANK / RANK-L ou RANK / RANK-L / OPG, l'héparine inhibe la fixation de l'OPG au complexe RANK / RANK-L préformé. Des travaux, réalisés au sein de notre laboratoire, ont montrés que l'OPG est capable d'influencer la demi-vie de RANK-L membranaire en stimulant son internalisation et sa dégradation (Kwan Tat et al, soumis). Des expériences de western blot ont alors permis de mettre en évidence que la pré-incubation de l'OPG avec l'héparine abolit cet effet sur la demi-vie de RANK-L. Ce résultat est donc en corrélation avec l'inhibition de la fixation de l'OPG, par l'héparine, observée en BIAcore. Cependant, des expériences de Scatchard dans lesquelles l'OPG radiomarquée, pré-incubée avec de l'héparine, est ajoutée sur des cellules 2.93 RANK-L n'a pas permis de retrouver une telle inhibition de fixation. La différence observée entre ces deux manipulations ne semble pas liée aux conditions expérimentales puisqu'il est possible d'inhiber la fixation de l'OPG aux

cellules 2.93 RANK-L par des concentrations croissantes de RANK-L soluble. Elle peut par contre peut-être s'expliquer par un défaut de liaison entre l'OPG radiomarquée et l'héparine. Au niveau du site de liaison à l'héparine de l'OPG, qui est composé des 50 derniers acides aminés de la protéine (Yamaguchi et al, 1998), il existe deux histidines mais surtout trois tyrosines sur lesquels peut se fixer l'iode 125 (Morinaga et al, 1998). La présence d'atomes d'iode pourrait donc altérer la fixation de l'héparine à l'OPG.

Il a été démontré que les héparanes sulfates sont responsables de la séquestration de différents facteurs de croissance et 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). L'équipe de Borset a en particulier 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 et l'OPG (Borset et al, 2000). L'association de ces données et de nos résultats suggère que l'OPG, ainsi séquestrée, ne puisse plus interagir avec RANK-L ce qui favoriserait la résorption osseuse.

La taille minimale des chaînes saccharidiques nécessaire pour obtenir une activité inhibitrice comparable à celle de l'héparine a ensuite été déterminée. Si une chaîne de quatre résidus saccharidiques n'exerce qu'une très faible inhibition, une molécule composée de 10 résidus est en revanche capable d'abolir la fixation de l'OPG au complexe RANK / RANK-L d'une manière identique à l'héparine complète. Des expériences de western blot, similaires à celle réalisée avec l'héparine, ont permis de confirmer ces résultats. En effet, le décasaccharide est, comme l'héparine, capable d'inhiber l'effet de l'OPG sur la demi-vie de RANK-L, alors que le tétrasaccharide ne le peut pas. L'importance de la sulfatation dans

l'activité inhibitrice de l'héparine a également été analysée. Nos résultats montrent que seule la molécule d'héparine totalement désulfatée perd son pouvoir inhibiteur, alors que l'héparine *N*-désulfatée inhibe la fixation d'OPG au complexe RANK / RANK-L de 85% et que les molécules 2-*O*-désulfatée, 6-*O*-désulfatée, *N*-désulfatée/*N*-ré-acétylée ont une activité inhibitrice identique à celle de l'héparine. De nombreuses études ont mis en évidence l'importance de la sulfatation dans la fixation des facteurs de croissance, et autres molécules, aux glycosaminoglycanes, ainsi que dans la régulation de leurs activités biologiques (Garg et al, 2003 ; Ricard-Blum et al, 2004 ; Deepa et al, 2004 ; Taylor et al, 2005). Des travaux de Pye et al ont en effet révélé que la 6-*O*-sulfatation des chaînes d'héparanes sulfate était primordiale pour l'activité du FGF-1 (Pye et al, 2000). Ces auteurs ont de plus proposé que des variations, au niveau de la position des *O*-sulfatations, soient responsables d'une activation différentielle du FGF-1 ou du FGF-2. Nos résultats ont également permis de souligner l'importance de la sulfatation dans la liaison de l'OPG à l'héparine puisqu'une molécule d'héparine totalement désulfatée n'est plus capable de se fixer à l'OPG. Cependant l'utilisation de molécules sélectivement désulfatées n'a pas clairement révélé l'implication d'un type de sulfatation précis dans la fixation de l'OPG à l'héparine. Nos expériences ont été réalisées avec de fortes concentrations d'héparines désulfatées ce qui a pu masquer des différences entre les molécules. Il serait donc intéressant de refaire ces manipulations avec des concentrations plus faibles afin de confirmer ou non les résultats précédents.

Enfin, nous avons voulu comparer l'effet de l'héparine, sur la fixation de l'OPG au complexe RANK / RANK-L, à celui d'autres GAG : héparanes sulfates, dermatane sulfate (DS), chondroïtine sulfate (CS). Dans des expériences de résonance plasmonique de surface ou de western blot, ces molécules, à forte concentration, exercent le même effet que l'héparine c'est-à-dire une inhibition totale de la fixation de l'OPG. Cependant à plus faible

dose, les différents GAG testés, et en particulier les DS et CS, ont une activité inhibitrice supérieure à celle de l'héparine. Des études très récentes ont démontré que les effets inhibiteurs des GAG, sur la prolifération d'ostéoblastes et de cellules d'ostéosarcome, étaient dépendants de leur type et de leur composition chimique (Nikitovic et al, 2005). Plus précisément, ces auteurs indiquent que la présence d'acide iduronique confère au DS un pouvoir inhibiteur supérieur à celui du CS. L'héparine, quant à elle, a une activité inhibitrice plus importante que le CS ou le DS et ce grâce à la présence de disaccharides tri-sulfatés dans sa structure. Nos résultats sont en contradiction avec ceux de Nikitovic puisque, de tous les GAG testés, l'héparine a le plus faible pouvoir inhibiteur. Cependant, des variations de sulfatation et de composition chimique entre les unités disaccharidiques des GAG, pourraient également être à l'origine des différences observées dans nos expériences.

Dans la première partie de ce travail nous avons donc pu montrer que l'OPG est capable d'exercer une activité biologique directe sur les ostéoclastes passant par l'activation de MAPK telles que p38 et ERK1/2. La phosphorylation de p38 est dépendante de RANK-L et pourrait être consécutive à la formation d'un complexe ternaire RANK / RANK-L / OPG dont l'existence a été révélée grâce à des expériences de résonance plasmonique de surface. La réalité biologique de ce complexe doit cependant être confirmée. Pour cela, les conditions des expériences de Scatchard déjà initiées et utilisant de l'OPG radiomarquée, pourront être modifiées : modifications de la température et du temps incubation, utilisation d'autres lignées cellulaires exprimant RANK... Des expériences de cytométrie en flux pourront également être envisagées de même que de la microscopie confocale. L'activation de la voie ERK1/2 par l'OPG est, quant à elle, indépendante de RANK-L, mais pourrait impliquer par la fixation de l'OPG à un protéoglycane tel que le syndecan-1. Afin de vérifier cette hypothèse, les expériences de western blot réalisées sur les cellules RAW 264.7, pourront être répétées en

traitant préalablement les cellules avec de l'héparinase ou de l'héparitinase, ou en utilisant un anticorps anti-syndecan-1, et en évaluant les effets sur la phosphorylation de ERK1/2. L'obtention de cellules sur-exprimant le syndecan-1, seul ou en association avec RANK, permettra également d'étudier plus en détails l'implication de cette molécule dans l'activité biologique de l'OPG.

Les interactions entre le système RANK / RANK-L / OPG et des GAG ont par ailleurs été étudiées. Nous avons ainsi mis en évidence la capacité de l'héparine, et d'autres GAG, à inhiber la fixation de l'OPG au complexe RANK / RANK-L, révélant une possible implication de ces molécules dans le contrôle de la biodisponibilité de l'OPG. Des différences entre les GAG testés ont cependant été trouvées et nécessiteront d'être mieux caractérisées : importance de la composition chimique des unités disaccharidiques, nombre et position des groupements sulfates intervenant dans la liaison... Pour cela des oligosaccharides de structure et de composition en groupement sulfate définies pourront être utilisés.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons démontré que des TIL peuvent être extraits de la plupart des tumeurs osseuses de l'adulte étudiées (ostéosarcomes, sarcomes d'Ewing, TCG, plasmocytomes) exception faite des chondrosarcomes, de la dysplasie fibreuse et de 50% des métastases osseuses. Nous avons également mis en évidence que seuls les TIL d'ostéosarcomes présentent une activité cytotoxique contre des lignées tumorales allogéniques et que cette activité est significative comparée à celle des PBL autologues.

Les lymphocytes présents au niveau d'un site tumoral peuvent être constitués de lymphocytes T générant une réponse anti-tumorale spécifique associés à une composante non spécifique responsable de la réponse inflammatoire. Cependant, ces cellules spécifiques sont en nombre insuffisant pour permettre l'élimination de la tumeur. Dans ce contexte, le transfert adoptif de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques s'est avéré efficace pour induire une régression tumorale dans différents modèles animaux (Lynch et Miller, 1991 ; Melief et Kast, 1995). Par ailleurs, si l'isolement et la caractérisation de TIL à partir de tumeurs malignes humaines ont pu être réalisés (Kowalczyk et al, 1997 ; Diederichsen et al, 1999 ; Yakirevich et al, 1999 ; Dudley et al, 2003), peu de données concernant les tumeurs osseuses sont disponibles dans la littérature, excepté pour les tumeurs pédiatriques (Rivoltini et al, 1992). La présence de lymphocytes T dans les ostéosarcomes humains a été précédemment étudiée par Trieb et al (1998). L'analyse phénotypique a révélé que ces lymphocytes infiltrant sont à 95% CD3⁺ et à 68% CD8⁺. L'équipe de Rivoltini a également analysé le phénotype de TIL issus de 37 tumeurs pédiatriques, dont 12 ostéosarcomes, et démontré qu'ils étaient majoritairement CD8⁺ (Rivoltini et al, 1992). Ces auteurs ont de plus mis en évidence que l'activité lytique de ces TIL contre les cellules tumorales allogéniques et autologues était variable et dépendait de l'histologie de la tumeur. Rivoltini et al ont alors conclu, en 1992, que les TIL extraits à partir de tumeurs pédiatriques étaient difficiles à amplifier à un niveau suffisant pour des immunothérapies, mais que ceci était tout de même envisageable.

Dans notre étude, les phénotypes des TIL issus des différents cas d'ostéosarcomes humains chez l'adulte, sont très similaires : en moyenne 77% des cellules sont CD3⁺, 50% CD4⁺ et 15,5% CD8⁺. Ces cellules possèdent de plus une forte activité cytotoxique dirigée contre les quatre lignées tumorales allogéniques testées, alors que pour les PBL autologues cette cytotoxicité est beaucoup moins importante. Cette différence entre les TIL et les PBL peut s'expliquer par un processus de ciblage des lymphocytes T spécifiques de la tumeur sur le site de la tumeur lui-même. En effet, récemment, Haanen et al ont analysé, chez des patients atteints de mélanome métastatique, la présence de TIL et de cellules T circulantes spécifiques d'antigènes associés aux tumeurs (AAT), avant et après vaccination par des cellules tumorales autologues (Haanen et al, 2005). Ils ont ainsi démontré que, chez aucun des patients, les cellules T spécifiques d'AAT ne se trouvaient présentes, au même moment, dans le sang circulant et dans la tumeur. Aucun changement significatif de la fréquence et de la spécificité des cellules T spécifiques d'AAT circulantes n'a pu être mis en évidence, au cours du traitement, alors que des TIL spécifiques d'AAT ont pu être détectés dans le tissu tumoral pour 75% des biopsies analysées. Ces résultats suggèrent qu'un phénomène de ciblage des cellules T spécifiques de la tumeur, au sein même de la tumeur, pourrait contribuer à l'efficacité de l'immunité anti-tumorale.

Ce travail de caractérisation phénotypique et fonctionnelle des TIL a également été réalisé dans un modèle expérimental d'ostéosarcome, mimant la pathologie humaine, chez le rat. Les TIL extraits à partir des biopsies tumorales de rat, présentent un phénotype similaire à celui des TIL d'ostéosarcomes humains : 90% de cellules CD3⁺, 50% de CD4⁺ et 18% de CD8⁺. De même, ils possèdent une importante activité cytotoxique contre des lignées tumorales autologues et allogéniques. La prédominance des TIL CD4⁺, obtenus à partir des biopsies de rat ou humaines, contraste avec les données rapportées par Topalian et al (1987).

En effet, ces auteurs ont montré une corrélation entre les lymphocytes CD8⁺ et une forte activité cytotoxique. Cependant, il faut considérer le rôle de la sous-population de lymphocytes T CD4⁺ sur l'activité des TIL CD8⁺. La survie des lymphocytes T CD8⁺ et leur activité contre la plupart des tumeurs sont augmentées par les cellules T CD4⁺ helper (CD4⁺CD25⁻) et inhibées par les cellules T CD4⁺ régulatrices (CD4⁺CD25⁺) (Antony et al, 2005 ; Kojima et al, 2005 ; Ormandy et al, 2005 ; Yu et al, 2005). En effet, les cellules T CD4⁺CD25⁺ sont capables de maintenir un microenvironnement, au niveau du site tumoral, qui masque l'immunogénicité de la tumeur et permet ainsi la croissance progressive de tumeurs antigéniques. Dans ce cas, la suppression (*in vivo* ou *ex vivo* pour les TIL extraits) des cellules T régulatrices, représente une approche immunothérapeutique possible. Cependant des données contradictoires ont également été avancées : dans le cas des tumeurs intestinales, qui sont fortement associées à un microenvironnement inflammatoire, une régression après injection de cellules T régulatrices CD4⁺CD25⁺ est observée (Erdman et al, 2005). L'ensemble de ces publications soulève donc l'hypothèse de plus larges fonctions, pour les lymphocytes régulateurs, dans la prévention et le traitement des cancers humains. Ainsi, la prédominance CD4⁺ dans la population des TIL ne devrait pas être préjudiciable au succès d'immunothérapies basées sur les lymphocytes T, mais doit être étroitement corrélée à leur statut CD25⁺ (faible ou élevé).

L'activité lytique présentée par les TIL d'ostéosarcome de rat est plus faible contre les cellules ROS 17/2.8 que contre la lignée UMR 106 ou les cellules tumorales autologues ce qui suggèrent l'existence d'antigènes tumoraux communs partagés par les cellules tumorales. De plus, nous avons pu mettre en évidence que la prolifération des TIL de rat pouvait être restimulée par des antigènes tumoraux autologues apportés par des cellules tumorales autologues irradiées. Ces résultats révèlent qu'une stimulation par des antigènes tumoraux

pourrait être une technique efficace pour l'amplification des TIL en vue de leur utilisation en immunothérapie.

Durant la dernière décennie, différentes publications ont soulignées la possibilité d'utiliser la thérapie cellulaire dans le traitement des ostéosarcomes. L'identification d'antigènes tumoraux humains a ouvert de nouveaux horizons pour l'immunothérapie des cancers basée en particulier sur le ciblage de ces antigènes. En effet, plusieurs antigènes tumoraux tels que MAGE-1, 2, 3, 6 (Sudo et al, 1997), SART-1 (Ishida et al, 2000), SART-3 (Tsuda et al, 2001) et PBF (papillomavirus binding factor) (Tsukahara et al, 2004), sont exprimés dans les ostéosarcomes ce qui représente un argument fort pour développer des thérapies cellulaires pour cette pathologie. SART-3 est fortement exprimé dans les ostéosarcomes. De plus, il est capable d'induire des lymphocytes T cytotoxiques restreints au HLA-A2 spécifiques de la tumeur (Tsuda et al, 2001). Ces données mettent en avant l'utilisation potentielle de peptides dérivés de SART-3 pour une immunothérapie spécifique des patients souffrant d'ostéosarcome et exprimant les molécules HLA-A2. En tenant compte de ces résultats et de la prévalence des molécules HLA-A2 et HLA-A24⁺, cette stratégie pourrait être applicable à environ 60% des patients atteints d'ostéosarcomes. De plus, des essais cliniques utilisant des peptides dérivés de SART-3 chez des patients HLA-A24⁺ atteints de cancer du colon, ont montré l'existence d'une augmentation significative de la réponse immunitaire cellulaire, contre les cellules tumorales, associée à une absence d'effets secondaires sévères (Miyagi et al, 2001). Ceci encourage l'utilisation d'une telle stratégie pour le traitement des ostéosarcomes. Trieb et al ont par ailleurs mis en évidence l'implication de la molécule Hsp72 (Heat-Shock protein 72) dans l'interaction entre les lymphocytes T et les cellules ostéosarcomateuses exprimant cette molécule (Trieb et al, 2000). Grâce au potentiel cytotoxique de ces lymphocytes, l'induction de la Hsp72 dans les ostéosarcomes pourrait induire une augmentation de la réponse immunitaire et donc une régression de la

tumeur. Ces données prises dans leur ensemble, ainsi que certaines expériences complémentaires réalisées chez l'animal, révèlent que l'utilisation de lymphocytes spécifiques d'antigènes tumoraux serait une stratégie thérapeutique plus efficace que l'immunothérapie basée sur l'injection de TIL polyclonaux.

Les résultats présentés dans la deuxième partie de ce travail indiquent que des TIL, possédant une importante activité cytotoxique, peuvent être facilement extraits à partir de biopsies d'ostéosarcomes de l'adulte. Ceci laisse envisager la possible utilisation des TIL pour le traitement des patients atteints d'ostéosarcome. Cependant, la caractérisation de ces cellules dans les ostéosarcomes humains doit être poursuivie. Des lignées tumorales autologues seront par ailleurs développées afin de caractériser les capacités fonctionnelles des TIL ainsi isolés. Enfin, la présence d'antigènes tumoraux sera également recherchée chez ces patients, dans le but de mieux caractériser les tumeurs, mais aussi de sélectionner des TIL spécifiques de ces antigènes.

Des TIL, présentant une activité lytique élevée, ont également pu être obtenus à partir d'un modèle d'ostéosarcome chez le rat. Les conditions d'amplification de ces cellules doivent être encore améliorées afin d'en obtenir un nombre suffisant pour effectuer des expériences d'immunothérapie. Différentes études réalisées chez l'homme, ont montré que des molécules telles que les anticorps anti-CD3 et anti-CD28 (Flens et al, 1993 ; Hellstrom et al, 2001), l'IL7 (Ditunno et al, 1992) ou l'IL12 (Zeh HJ 3rd et al, 1993), sont capables de stimuler la prolifération des TIL. Les effets de ces molécules sur l'expansion des TIL d'ostéosarcome de rat pourront donc être analysés. Des essais d'immunothérapie seront alors envisagés : les différents traitements seront étudiés sur une période moyenne de 6 semaines après exérèse des tumeurs primitives chez les rats. L'efficacité de ces cellules sur la réponse tumorale sera analysée en suivant l'évolution de paramètres biologiques (réponse cellulaire

induite, étude histologique, marqueurs du remodelage osseux), cliniques (survie des animaux, évolution des métastases pulmonaires) et radiologiques.

CONCLUSION GÉNÉRALE

L'ensemble de ce travail a permis de montrer que l'OPG n'est pas seulement un récepteur leurre, inhibiteur de la fixation de RANK-L sur RANK, mais qu'elle peut avoir un effet direct sur l'activité des cellules ostéoclastiques (transcription, activité enzymatique, signalisation intracellulaire). Nous avons également mis en évidence la formation d'un complexe ternaire RANK / RANK-L / OPG, ainsi qu'une régulation de la biodisponibilité de l'OPG par les protéoglycanes.

Les fonctions biologiques de ces molécules sont donc très complexes et diversifiées, et ne sont, de plus, pas restreintes au tissu osseux. En effet, la triade RANK / RANK-L / OPG constitue une sorte de pont moléculaire entre les systèmes osseux et immunitaire, donnant ainsi naissance à un nouveau concept : l'ostéoimmunologie (Walsh et Choi, 2003). Une connaissance globale des fonctions biologiques de ces molécules représente donc l'objectif à atteindre dans les années futures. Cette connaissance est primordiale afin d'évaluer l'ensemble des effets de l'OPG, ou de RANK-Fc, dont l'utilisation constitue un réel espoir pour le traitement des pathologies tumorales osseuses. D'autres approches thérapeutiques sont également très encourageantes. En particulier nous avons pu montrer que des TIL, possédant une forte activité cytotoxique, pouvaient être obtenus à partir de biopsies d'ostéosarcome. Leur utilisation, dans des protocoles d'immunothérapie adoptive, semble donc envisageable. Il est cependant très probable que le traitement le plus efficace des tumeurs osseuses corresponde à l'association de ces différentes approches. En effet, la mise en place d'une bi-thérapie associant un traitement anti-tumoral (thérapie cellulaire, chimiothérapie...) à un traitement anti-résorption (OPG, RANK-Fc, bisphosphonates...) permettra d'améliorer la réponse thérapeutique et ainsi la survie des patients.

BIBLIOGRAPHIE

Ahmad R, Mayol BR, Davis M, Rougraff BT. Extraskelatal Ewing's sarcoma. *Cancer*. 1999. 85:725-31.

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.

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.

Antony PA, Piccirillo CA, Akpinarli A, Finkelstein SE, Speiss PJ, Surman DR, Palmer DC, Chan CC, Klebanoff CA, Overwijk WW, Rosenberg SA, Restifo NP. CD8+ T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4+ T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells. *J Immunol*. 2005. 174:2591-601.

Armstrong AC, Eaton D, Ewing JC. Science, medicine, and the future: Cellular immunotherapy for cancer. *BMJ*. 2001. 323:1289-93.

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, Kudo A. Tumor necrosis factor-alpha induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts. *J Biol Chem*. 2000. 275:4858-64.

Bacci G, Briccoli A, Rocca M, Ferrari S, Donati D, Longhi A, Bertoni F, Bacchini P, Giacomini S, Forni C, Manfrini M, Galletti S. Neoadjuvant chemotherapy for osteosarcoma of the extremities with metastases at presentation: recent experience at the Rizzoli Institute in 57 patients treated with cisplatin, doxorubicin, and a high dose of methotrexate and ifosfamide. *Ann Oncol*. 2003. 14:1126-34.

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.

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.

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.

Blair HC, Sidonio RF, Friedberg RC, Khan NN, Dong SS. Proteinase expression during differentiation of human osteoclasts in vitro. *J Cell Biochem.* 2000. 78:627-37.

Blavier L, Delaisse JM. Matrix metalloproteinases are obligatory for the migration of preosteoclasts to the developing marrow cavity of primitive long bones. *J Cell Sci.* 1995. 108:3649-59.

Body JJ, Greipp P, Coleman RE, Facon T, Geurs F, Fermand JP, Harousseau JL, Lipton A, Mariette X, Williams CD, Nakanishi A, Holloway D, Martin SW, Dunstan CR, Bekker PJ. A phase I study of AMGN-0007, a recombinant osteoprotegerin construct, in patients with multiple myeloma or breast carcinoma related bone metastases. *Cancer.* 2003. 97:887-92.

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.

Breuil V, Schmid-Antomarchi H, Schmid-Alliana A, Rezzonico R, Euler-Ziegler L, Rossi B. The receptor activator of nuclear factor (NF)-kappaB ligand (RANKL) is a new chemotactic factor for human monocytes. *FASEB J.* 2003. 17:1751-3.

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.

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

Choi HU, Johnson TL, Pal S, Tang LH, Rosenberg L, Neame PJ. Characterization of the dermatan sulfate proteoglycans, DS-PGI and DS-PGII, from bovine articular cartilage and skin isolated by octyl-sepharose chromatography. *J Biol Chem.* 1989. 264:2876-84.

Collin P, Guenther HL, Fleisch H. Constitutive expression of osteoclast-stimulating activity by normal clonal osteoblast-like cells: effects of parathyroid hormone and 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Endocrinology.* 1992. 131:1181-7.

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.

Corsi A, Xu T, Chen XD, Boyde A, Liang J, Mankani M, Sommer B, Iozzo RV, Eichstetter I, Robey PG, Bianco P, Young MF. Phenotypic effects of biglycan deficiency are linked to collagen fibril abnormalities, are synergized by decorin deficiency, and mimic Ehlers-Danlos-like changes in bone and other connective tissues. *J Bone Miner Res.* 2002. 17:1180-9.

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.

Davis ID, Jefford M, Parente P, Cebon J. Rational approaches to human cancer immunotherapy. *J Leukoc Biol.* 2003. 73:3-29.

Deepa SS, Yamada S, Zako M, Goldberger O, Sugahara K. Chondroitin sulfate chains on syndecan-1 and syndecan-4 from normal murine mammary gland epithelial cells are structurally and functionally distinct and cooperate with heparan sulfate chains to bind growth factors. A novel function to control binding of midkine, pleiotrophin, and basic fibroblast growth factor. *J Biol Chem.* 2004. 279:37368-76.

Delaisse JM, Engsig MT, Everts V, del Carmen Ovejero M, Ferreras M, Lund L, Vu TH, Werb Z, Winding B, Lochter A, Karsdal MA, Troen T, Kirkegaard T, Lenhard T, Heegaard AM, Neff L, Baron R, Foged NT. Proteinases in bone resorption: obvious and less obvious roles. *Clin Chim Acta.* 2000. 291:223-34.

Dempster DW, Hughes-Begos CE, Plavetic-Chee K, Brandao-Burch A, Cosman F, Nieves J, Neubort S, Lu SS, Iida-Klein A, Arnett T, Lindsay R. Normal human osteoclasts formed from peripheral blood monocytes express PTH type 1 receptors and are stimulated by PTH in the absence of osteoblasts. *J Cell Biochem.* 2005. 95:139-48.

Dhodapkar MV, Abe E, Theus A, Lacy M, Langford JK, Barlogie B, Sanderson RD. Syndecan-1 is a multifunctional regulator of myeloma pathobiology: control of tumor cell survival, growth, and bone cell differentiation. *Blood.* 1998. 91:2679-88.

Diederichsen AC, Zeuthen J, Christensen PB, Kristensen T. Characterisation of tumour infiltrating lymphocytes and correlations with immunological surface molecules in colorectal cancer. *Eur J Cancer.* 1999. 35:721-6.

Ditonno P, Tso CL, Sakata T, deKernion JB, Beldegrun A. Regulatory effects of interleukin-7 on renal tumor infiltrating lymphocytes. *Urol Res.* 1992. 20:205-10.

Dong Z, Bonfil RD, Chinni S, Deng X, Trindade Filho JC, Bernardo M, Vaishampayan U, Che M, Sloane BF, Sheng S, Fridman R, Cher ML. Matrix metalloproteinase activity and osteoclasts in experimental prostate cancer bone metastasis tissue. *Am J Pathol.* 2005. 166:1173-86.

Drake FH, Dodds RA, James IE, Connor JR, Debouck C, Richardson S, Lee-Rykaczewski E, Coleman L, Rieman D, Barthlow R, Hastings G, Gowen M.J. Cathepsin K, but not cathepsins B, L, or S, is abundantly expressed in human osteoclasts. *J Biol Chem.* 1996. 271:12511-16.

Dudley ME, Wunderlich JR, Shelton TE, Even J, Rosenberg SA. Generation of tumor-infiltrating lymphocyte cultures for use in adoptive transfer therapy for melanoma patients. *J Immunother.* 2003. 26:332-42.

Eilon G, Mundy GR. Direct resorption of bone by human breast cancer cells in vitro. *Nature.* 1978. 276:726-8.

Elhilali MM, Gleave M, Fradet Y, Davis I, Venner P, Saad F, Klotz L, Moore R, Ernst S, Paton V. Placebo-associated remissions in a multicentre, randomized, double-blind trial of interferon gamma-1b for the treatment of metastatic renal cell carcinoma. *The Canadian Urologic Oncology Group. BJU Int.* 2000. 86:613-8.

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.

Encyclopédie Médico-Chirurgicale. Ostéosarcome de forme commune. 14-704.

Encyclopédie Médico-Chirurgicale. Chondrosarcomes intraosseux. 14-716.

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

Encyclopédie Médico-Chirurgicale. Tumeurs à cellules géantes. 14-772.

Engsig MT, Chen QJ, Vu TH, Pedersen AC, Therkidsen B, Lund LR, Henriksen K, Lenhard T, Foged NT, Werb Z, Delaisse JM. Matrix metalloproteinase 9 and vascular endothelial growth factor are essential for osteoclast recruitment into developing long bones. *J Cell Biol.* 2000. 151:879-89.

Erdman SE, Sohn JJ, Rao VP, Nambiar PR, Ge Z, Fox JG, Schauer DB. CD4+CD25+ regulatory lymphocytes induce regression of intestinal tumors in ApcMin/+ mice. *Cancer Res.* 2005. 65:3998-4004.

Everts V, Delaisse JM, Korper W, Beertsen W. Cysteine proteinases and matrix metalloproteinases play distinct roles in the subosteoclastic resorption zone. *J Bone Miner Res.* 1998. 13:1420-30.

Fata JE, Kong YY, Li J, Sasaki T, Irie-Sasaki J, Moorehead RA, Elliott R, Scully S, Voura EB, Lacey DL, Boyle WJ, Khokha R, Penninger JM. The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. *Cell.* 2000. 103:41-50.

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

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.

Flens MJ, Mulder WM, Bril H, von Blomberg van de Flier MB, Scheper RJ, van Lier RA. Efficient expansion of tumor-infiltrating lymphocytes from solid tumors by stimulation with combined CD3 and CD28 monoclonal antibodies. *Cancer Immunol Immunother.* 1993. 37:323-8.

Fransson LA, Carlstedt I, Coster L, Malmstrom A. The functions of the heparan sulphate proteoglycans. *Ciba Found Symp.* 1986. 124:125-42.

Franzoso G, Carlson L, Xing L, Poljak L, Shores EW, Brown KD, Leonardi A, Tran T, Boyce BF, Siebenlist U. Requirement for NF-kappaB in osteoclast and B-cell development. *Genes Dev.* 1997. 11:3482-96.

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

Funderburgh JL. Keratan sulfate: structure, biosynthesis, and function. *Glycobiology.* 2000. 10:951-8.

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.

Garg HG, Yu L, Hales CA, Toida T, Islam T, Linhardt RJ. Sulfation patterns in heparin and heparan sulfate: effects on the proliferation of bovine pulmonary artery smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta.* 2003. 1639:225-31.

Ge B, Gram H, Di Padova F, Huang B, New L, Ulevitch RJ, Luo Y, Han J. MAPKK-independent activation of p38alpha mediated by TAB1-dependent autophosphorylation of p38alpha. *Science.* 2002. 295:1291-4.

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.

Goger B, Halden Y, Rek A, Mosl R, Pye D, Gallagher J, Kungl AJ. Different affinities of glycosaminoglycan oligosaccharides for monomeric and dimeric interleukin-8: a model for chemokine regulation at inflammatory sites. *Biochemistry.* 2002. 41:1640-6.

Gohda J, Akiyama T, Koga T, Takayanagi H, Tanaka S, Inoue J. RANK-mediated amplification of TRAF6 signaling leads to NFATc1 induction during osteoclastogenesis. *EMBO J.* 2005. 24:790-9.

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

Grigoriadis AE, Wang ZQ, Cecchini MG, Hofstetter W, Felix R, Fleisch HA, Wagner EF. c-Fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling. *Science.* 1994. 266:443-8.

Grimaud E, Soubigou L, Couillaud S, Coipeau P, Moreau A, Passuti N, Gouin 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.

Guise TA, Mundy GR. Cancer and bone. *Endocr Rev.* 1998. 19:18-54.

Gutierrez J, Osses N, Brandan E. Changes in secreted and cell associated proteoglycan synthesis during conversion of myoblasts to osteoblasts in response to bone morphogenetic protein-2: Role of decorin in cell response to BMP-2. *J Cell Physiol.* 2005. Sous presse.

Haanen JB, Baars A, Gomez R, Weber P, Smits M, de Gruijl TD, von Blumberg BM, Bloemena E, Scheper RJ, van Ham SM, Pinedo HM, van den Eertwegh AJ. Melanoma-specific tumor-infiltrating lymphocytes but not circulating melanoma-specific T cells may predict survival in resected advanced-stage melanoma patients. *Cancer Immunol Immunother.* 2005. Sous presse.

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.

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

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

Hellstrom I, Ledbetter JA, Scholler N, Yang Y, Ye Z, Goodman G, Pullman J, Hayden-Ledbetter M, Hellstrom KE. CD3-mediated activation of tumor-reactive lymphocytes from patients with advanced cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001. 98:6783-8.

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, Murphy G, Docherty AJ, Hembry RM, Millican TA, Reynolds JJ, Meikle MC. The effects of selective inhibitors of matrix metalloproteinases (MMP) on bone resorption and the identification of MMPs and TIMP-1 in isolated osteoclasts. *J Cell Sci.* 1994. 107:3055-64.

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.

Holmes MW, Bayliss MT, Muir H. Hyaluronic acid in human articular cartilage. Age-related changes in content and size. *Biochem J.* 1988. 250:435-41.

Holtrop ME, King GJ. The ultrastructure of the osteoclast and its functional implications. *Clin Orthop Relat Res.* 1977. 123:177-96.

Horwood NJ, Elliott J, Martin TJ, Gillespie MT. Osteotropic agents regulate the expression of osteoclast differentiation factor and osteoprotegerin in osteoblastic stromal cells. *Endocrinology.* 1998. 139:4743-6.

Hotokezaka H, Sakai E, Kanaoka K, Saito K, Matsuo K, Kitaura H, Yoshida N, Nakayama K. U0126 and PD98059, specific inhibitors of MEK, accelerate differentiation of RAW264.7 cells into osteoclast-like cells. *J Biol Chem.* 2002. 277:47366-72.

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.

Hsueh EC, Gupta RK, Qi K, Morton DL. Correlation of specific immune responses with survival in melanoma patients with distant metastases receiving polyvalent melanoma cell vaccine. *J Clin Oncol.* 1998. 16:2913-20.

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.

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 F, Nishimura R, Matsubara T, Tanaka S, Inoue J, Reddy SV, Hata K, Yamashita K, Hiraga T, Watanabe T, Kukita T, Yoshioka K, Rao A, Yoneda T. Critical roles of c-Jun signaling in regulation of NFAT family and RANKL-regulated osteoclast differentiation. *J Clin Invest.* 2004. 114:475-84.

Ingram RT, Clarke BL, Fisher LW, Fitzpatrick LA. Distribution of noncollagenous proteins in the matrix of adult human bone: evidence of anatomic and functional heterogeneity. *J Bone Miner Res.* 1993. 8:1019-29.

Ishida H, Komiya S, Inoue Y, Yutani S, Inoue A, Itoh K. Expression of the SART1 tumor-rejection antigen in human osteosarcomas. *Int J Oncol.* 2000. 17:29-32.

Ishida N, Hayashi K, Hoshijima M, Ogawa T, Koga S, Miyatake Y, Kumegawa M, Kimura T, Takeya T. Large scale gene expression analysis of osteoclastogenesis in vitro and elucidation of NFAT2 as a key regulator. *J Biol Chem.* 2002. 277:41147-56.

Ishikawa S, Arase N, Suenaga T, Saita Y, Noda M, Kuriyama T, Arase H, Saito T. Involvement of FcRgamma in signal transduction of osteoclast-associated receptor (OSCAR). *Int Immunol.* 2004. 16:1019-25.

Jasmin C, Allouche M, Jude JG, Klein B, Thiery JP, Perdereau B, Gongora R, Gongora G, Mazabraud A. Un modèle expérimental d'ostéosarcome chez le rat. II L'ostéosarcome greffable du rat. *Sem Hop. Paris.* 1982. 58:1684-9.

Jimi E, Nakamura I, Amano H, Taguchi Y, Tsurukai T, Tamura M, Takahashi N, Suda T. Osteoclast function is activated by osteoblastic cells through a mechanism involving cell-to-cell contact. *Endocrinology.* 1996. 137:2187-90.

Jimi E, Nakamura I, Ikebe T, Akiyama S, Takahashi N, Suda T. Activation of NF-kappaB is involved in the survival of osteoclasts promoted by interleukin-1. *J Biol Chem.* 1998. 273:8799-805.

Jimi E, Nakamura I, Duong LT, Ikebe T, Takahashi N, Rodan GA, Suda T. Interleukin 1 induces multinucleation and bone-resorbing activity of osteoclasts in the absence of osteoblasts/stromal cells. *Exp Cell Res.* 1999. 247:84-93.

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.

Klein B, Pals S, Masse R, Lafuma J, Morin M, Binart N, Jasmin JR, Jasmin C. Studies of bone and soft-tissue tumours induced in rats with radioactive cerium chloride. *Int J Cancer*. 197. 20:112-9.

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, Suda T. Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *J Exp Med*. 2000. 191:275-86.

Koga T, Inui M, Inoue K, Kim S, Suematsu A, Kobayashi E, Iwata T, Ohnishi H, Matozaki T, Kodama T, Taniguchi T, Takayanagi H, Takai T. Costimulatory signals mediated by the ITAM motif cooperate with RANKL for bone homeostasis. *Nature*. 2004. 428:758-63.

Kojima H, Kanno Y, Hase H, Kobata T. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells attenuate the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in antigen-primed immature CD8⁺ CTLs during functional maturation. *J Immunol*. 2005. 174:5959-67.

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

Kong YY, Feige U, Sarosi I, Bolon B, Tafuri A, Morony S, Capparelli C, Li J, Elliott R, McCabe S, Wong T, Campagnuolo G, Moran E, Bogoch ER, Van G, Nguyen LT, Ohashi PS, Lacey DL, Fish E, Boyle WJ, Penninger JM. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature*. 1999b. 402:304-9.

Kowalczyk D, Skorupski W, Kwias Z, Nowak J. Flow cytometric analysis of tumour-infiltrating lymphocytes in patients with renal cell carcinoma. *Br J Urol*. 1997. 80:543-7.

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

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

Kwon BS, Wang S, Udagawa N, Haridas V, Lee ZH, Kim KK, Oh KO, Greene J, Li Y, Su J, Gentz R, Aggarwal BB, Ni J. TR1, a new member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, induces fibroblast proliferation and inhibits osteoclastogenesis and bone resorption. *FASEB J*. 1998. 12:845-54.

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.

Lakkakorpi PT, Helfrich MH, Horton MA, Vaananen HK. Spatial organization of microfilaments and vitronectin receptor, alpha v beta 3, in osteoclasts. A study using confocal laser scanning microscopy. *J Cell Sci.* 1993. 104:663-70.

Lakkakorpi PT, Vaananen HK. Cytoskeletal changes in osteoclasts during the resorption cycle. *Microsc Res Tech.* 1996. 33:171-81.

Langford JK, Yang Y, Kieber-Emmons T, Sanderson RD. Identification of an invasion regulatory domain within the core protein of syndecan-1. *J Biol Chem.* 2005. 280:3467-73.

Lee SE, Chung WJ, Kwak HB, Chung CH, Kwack KB, Lee ZH, Kim HH. Tumor necrosis factor-alpha supports the survival of osteoclasts through the activation of Akt and ERK. *J Biol Chem.* 2001. 276:49343-9.

Lee SE, Woo KM, Kim SY, Kim HM, Kwack K, Lee ZH, Kim HH. The phosphatidylinositol 3-kinase, p38, and extracellular signal-regulated kinase pathways are involved in osteoclast differentiation. *Bone.* 2002b. 30:71-7.

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 SW, Han SI, Kim HH, Lee ZH. TAK1-dependent activation of AP-1 and c-Jun N-terminal kinase by receptor activator of NF-kappaB. *J Biochem Mol Biol.* 2002a. 35:371-6.

Lens MB, Dawes M. Interferon alfa therapy for malignant melanoma: a systematic review of randomized controlled trials. *J Clin Oncol.* 2002. 20:1818-25.

Lerner UH, Johansson L, Ranjso M, Rosenquist JB, Reinholt FP, Grubb A. Cystatin C, and inhibitor of bone resorption produced by osteoblasts. *Acta Physiol Scand.* 1997. 161:81-92.

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.

Liu BY, Guo J, Lanske B, Divieti P, Kronenberg HM, Bringhurst FR. Conditionally immortalized murine bone marrow stromal cells mediate parathyroid hormone-dependent osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology.* 1998. 139:1952-64.

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.

Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell.* 2001.104:487-501.

Lomaga MA, Yeh WC, Sarosi I, Duncan GS, Furlonger C, Ho A, Morony S, Capparelli C, Van G, Kaufman S, van der Heiden A, Itie A, Wakeham A, Khoo W, Sasaki T, Cao Z, Penninger JM, Paige CJ, Lacey DL, Dunstan CR, Boyle WJ, Goeddel DV, Mak TW. TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling. *Genes Dev.* 1999. 13:1015-24.

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.

Lynch DH, Miller RE. Immunotherapeutic elimination of syngeneic tumors in vivo by cytotoxic T lymphocytes generated in vitro from lymphocytes from the draining lymph nodes of tumor-bearing mice. *Eur J Immunol*. 1991. 21:1403-10.

Lyon M, Rushton G, Askari JA, Humphries MJ, Gallagher JT. Elucidation of the structural features of heparan sulfate important for interaction with the Hep-2 domain of fibronectin. *J Biol Chem*. 2000. 275:4599-606.

Mansky KC, Sankar U, Han J, Ostrowski MC. Microphthalmia transcription factor is a target of the p38 MAPK pathway in response to receptor activator of NF-kappa B ligand signaling. *J Biol Chem*. 2002. 277:11077-83.

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

Matsumoto M, Sudo T, Saito T, Osada H, Tsujimoto M. Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway in osteoclastogenesis mediated by receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL). *J Biol Chem*. 2000. 275:31155-61.

Melief CJ, Kast WM. T-cell immunotherapy of tumors by adoptive transfer of cytotoxic T lymphocytes and by vaccination with minimal essential epitopes. *Immunol Rev*. 1995. 145:167-77.

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.

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.

Miyagi Y, Imai N, Sasatomi T, Yamada A, Mine T, Katagiri K, Nakagawa M, Muto A, Okouchi S, Isomoto H, Shirouzu K, Yamana H, Itoh K. Induction of cellular immune responses to tumor cells and peptides in colorectal cancer patients by vaccination with SART3 peptides. *Clin Cancer Res.* 2001. 7:3950-62.

Miyazaki T, Katagiri H, Kanegae Y, Takayanagi H, Sawada Y, Yamamoto A, Pando MP, Asano T, Verma IM, Oda H, Nakamura K, Tanaka S. Reciprocal role of ERK and NF-kappaB pathways in survival and activation of osteoclasts. *J Cell Biol.* 2000. 148:333-42.

Mizukami J, Takaesu G, Akatsuka H, Sakurai H, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K and Sakurai N. Receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) activates TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase through a signaling complex containing RANK, TAB2 and TRAF6. *Mol. Cell. Biol.* 2002. 22:992-1000.

Mocsai A, Humphrey MB, Van Ziffle JA, Hu Y, Burghardt A, Spusta SC, Majumdar S, Lanier LL, Lowell CA, Nakamura MC. The immunomodulatory adapter proteins DAP12 and Fc receptor gamma-chain (FcRgamma) regulate development of functional osteoclasts through the Syk tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004. 101:6158-63.

Modrowski D, Orosco A, Thevenard J, Fromigue O, Marie PJ. Syndecan-2 overexpression induces osteosarcoma cell apoptosis: Implication of syndecan-2 cytoplasmic domain and JNK signaling. *Bone.* 2005. 37:180-9.

Moran MT, Schofield JP, Hayman AR, Shi GP, Young E, Cox TM. Pathologic gene expression in Gaucher disease: up-regulation of cysteine proteinases including osteoclastic cathepsin K. *Blood.* 2000. 96:1969-78.

Morinaga T, Nakagawa N, Yasuda H, Tsuda E, Higashio K. Cloning and characterization of the gene encoding human osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor. *Eur J Biochem.* 1998. 254:685-91.

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.

Motyckova G, Weilbaecher KN, Horstmann M, Rieman DJ, Fisher DZ, Fisher DE. Linking osteopetrosis and pycnodysostosis: regulation of cathepsin K expression by the microphthalmia transcription factor family. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001. 98:5798-803.

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.

Nakashima T, Wada T, Penninger JM. RANKL and RANK as novel therapeutic targets for arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2003. 15:280-7.

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.

Nikitovic D, Zafiropoulos A, Tzanakakis GN, Karamanos NK, Tsatsakis AM. Effects of glycosaminoglycans on cell proliferation of normal osteoblasts and human osteosarcoma cells depend on their type and fine chemical compositions. *Anticancer Res.* 2005. 25:2851-6.

Ninomiya-Tsuji J, Kishimoto K, Hiyama A, Inoue J, Cao Z, Matsumoto K. The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature.* 1999. 398:252-6.

Nugent MA, Edelman ER. Kinetics of basic fibroblast growth factor binding to its receptor and heparan sulfate proteoglycan: a mechanism for cooperativity. *Biochemistry.* 1992. 31:8876-83.

Ormandy LA, Hillemann T, Wedemeyer H, Manns MP, Greten TF, Korangy F. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 2005. 65:2457-64.

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.

Paloneva J, Mandelin J, Kiialainen A, Bohling T, Prudlo J, Hakola P, Haltia M, Konttinen YT, Peltonen L. DAP12/TREM2 deficiency results in impaired osteoclast differentiation and osteoporotic features. *J Exp Med.* 2003. 198:669-75.

Panelli MC, Wunderlich J, Jeffries J, Wang E, Mixon A, Rosenberg SA, Marincola FM. Phase I study in patients with metastatic melanoma of immunization with dendritic cells presenting epitopes derived from the melanoma-associated antigens MART-1 and gp100. *J Immunother.* 2000. 23:487-98.

Parisuthiman D, Mochida Y, Duarte WR, Yamauchi M. Biglycan modulates osteoblast differentiation and matrix mineralization. *J Bone Miner Res.* 2005. 20:1878-86.

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

Ramos-DeSimone N, Hahn-Dantona E, Siple J, Nagase H, French DL, Quigley JP. Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) via a converging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion. *J Biol Chem.* 1999. 274:13066-76.

Pye DA, Vives RR, Hyde P, Gallagher JT. Regulation of FGF-1 mitogenic activity by heparan sulfate oligosaccharides is dependent on specific structural features: differential requirements for the modulation of FGF-1 and FGF-2. *Glycobiology.* 2000. 10:1183-92.

Reiland J, Ott VL, Lebakken CS, Yeaman C, McCarthy J, Rapraeger AC. Pervanadate activation of intracellular kinases leads to tyrosine phosphorylation and shedding of syndecan-1. *Biochem J.* 1996. 319:39-47.

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

Ricard-Blum S, Feraud O, Lortat-Jacob H, Rencurosi A, Fukai N, Dkhissi F, Vittet D, Imberty A, Olsen BR, van der Rest M. Characterization of endostatin binding to heparin and heparan sulfate by surface plasmon resonance and molecular modeling: role of divalent cations. *J Biol Chem.* 2004. 279:2927-36.

Rifas L, Fausto A, Scott MJ, Avioli LV, Welgus HG. Expression of metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human osteoblast-like cells: differentiation is associated with repression of metalloproteinase biosynthesis. *Endocrinology.* 1994. 134:213-21.

Rivoltini L, Arienti F, Orazi A, Cefalo G, Gasparini M, Gambacorti-Passerini C, Fossati-Bellani F, Parmiani G. Phenotypic and functional analysis of lymphocytes infiltrating paediatric tumours, with a characterization of the tumour phenotype. *Cancer Immunol Immunother.* 1992. 34:241-51.

Rodan GA, Martin TJ. Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption-a hypothesis. *Calcif Tissue Int.* 1981. 33:349-51.

Roden L, Ananth S, Campbell P, Curenton T, Ekborg G, Manzella S, Pillion D, Meezan E. Heparin--an introduction. *Adv Exp Med Biol.* 1992. 13:1-20.

Roghani M, Mansukhani A, Dell'Era P, Bellosta P, Basilico C, Rifkin DB, Moscatelli D. Heparin increases the affinity of basic fibroblast growth factor for its receptor but is not required for binding. *J Biol Chem.* 1994. 269:3976-84.

Rosenberg SA, Yang JC, Schwartzentruber DJ, Hwu P, Marincola FM, Topalian SL, Restifo NP, Sznol M, Schwarz SL, Spiess PJ, Wunderlich JR, Seipp CA, Einhorn JH, Rogers-Freezer L, White DE. Impact of cytokine administration on the generation of antitumor reactivity in patients with metastatic melanoma receiving a peptide vaccine. *J Immunol.* 1999. 163:1690-5.

Rosenberg SA. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature.* 2001. 411:380-4.

Rousselle AV, Damiens C, Fortun Y, Passuti N, Padrines M, Heymann D. Human growth hormone stimulates proteinase activities of rabbit bone cells via IGF-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000. 268:875-81.

Rousselle AV, Heymann D. Osteoclastic acidification pathways during bone resorption. *Bone.* 2002. 30:533-40.

Ruoslahti E. Structure and biology of proteoglycans. *Annu Rev Cell Biol.* 1988. 4:229-55.

Saftig P, Hunziger E, Wehmeyer O, Jones S, Boyde A, Romerskirch W, Moritz J, Schu P, von Figura K. Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin K-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998. 95:13453-58.

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.

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

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.

Seidel C, Borset M, Hjertner O, Cao D, Abildgaard N, Hjorth-Hansen H, Sanderson RD, Waage A, Sundan A. High levels of soluble syndecan-1 in myeloma-derived bone marrow: modulation of hepatocyte growth factor activity. *Blood*. 2000. 96:3139-46.

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.

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

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.

Suda T, Udagawa N, Nakamura I, Miyaura C, Takahashi N. Modulation of osteoclast differentiation by local factors. *Bone*. 1995. 17:87S-91S.

Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev*. 1999. 20:345-57.

Sudo T, Kuramoto T, Komiya S, Inoue A, Itoh K. Expression of MAGE genes in osteosarcoma. *J Orthop Res*. 1997. 15:128-32.

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.

Takahashi N, Akatsu T, Udagawa N, Sasaki T, Yamaguchi A, Moseley JM, Martin TJ, Suda T. Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. *Endocrinology*. 1988. 123:2600-2.

Takayanagi H, Kim S, Koga T, Nishina H, Isshiki M, Yoshida H, Saiura A, Isobe M, Yokochi T, Inoue J, Wagner EF, Mak TW, Kodama T, Taniguchi T. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell*. 2002. 3:889-901.

Takeda S, Yoshizawa T, Nagai Y, Yamato H, Fukumoto S, Sekine K, Kato S, Matsumoto T, Fujita T. Stimulation of osteoclast formation by 1,25-dihydroxyvitamin D requires its binding to vitamin D receptor (VDR) in osteoblastic cells: studies using VDR knockout mice. *Endocrinology*. 1999. 140:1005-8.

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.

Taylor KR, Rudisill JA, Gallo RL. Structural and sequence motifs in dermatan sulfate for promoting fibroblast growth factor-2 (FGF-2) and FGF-7 activity. *J Biol Chem*. 2005. 280:5300-6.

Tejedor F, Ballesta JP. Iodination of biological samples without loss of functional activity. *Anal Biochem*. 1982. 127:143-9.

Terpos E, Szydlo R, Apperley JF, Hatjiharissi E, Politou M, Meletis J, Viniou N, Yataganas X, Goldman JM, Rahemtulla A. Soluble receptor activator of nuclear factor kappaB ligand-osteoprotegerin ratio predicts survival in multiple myeloma: proposal for a novel prognostic index. *Blood*. 2003. 102:1064-9.

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, Mori K, Cherrier B, Passuti N, Gouin F, Redini F, Heymann D. Phenotypic and functional analysis of lymphocytes infiltrating osteolytic tumors: use as a possible therapeutic approach of osteosarcoma. *BMC Cancer*. 2005. 5:123 (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.

Topalian SL, Muul LM, Rosenberg SA. Growth and immunological characteristics of lymphocytes infiltrating human tumors. [Résumé] *Surg Forum.* 1987.

Trieb K, Lechleitner T, Lang S, Windhager R, Kotz R, Dirnhofer S. Evaluation of HLA-DR expression and T-lymphocyte infiltration in osteosarcoma. *Pathol Res Pract.* 1998. 194:679-84.

Trieb K, Lang S, Kotz R. Heat-shock protein 72 in human osteosarcoma: T-lymphocyte reactivity and cytotoxicity. *Pediatr Hematol Oncol.* 2000. 17:355-64.

Tsuda N, Murayama K, Ishida H, Matsunaga K, Komiya S, Itoh K, Yamada A. Expression of a newly defined tumor-rejection antigen SART3 in musculoskeletal tumors and induction of HLA class I-restricted cytotoxic T lymphocytes by SART3-derived peptides. *J Orthop Res.* 2001. 19:346-51.

Tsukahara T, Nabeta Y, Kawaguchi S, Ikeda H, Sato Y, Shimozawa K, Ida K, Asanuma H, Hirohashi Y, Torigoe T, Hiraga H, Nagoya S, Wada T, Yamashita T, Sato N. Identification of human autologous cytotoxic T-lymphocyte-defined osteosarcoma gene that encodes a transcriptional regulator, papillomavirus binding factor. *Cancer Res.* 2004. 64:5442-48.

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.

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.

Walsh MC, Choi Y. Biology of the TRANCE axis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003. 14:251-63.

Weber MH, Goltzman D, Kostenuik P, Rabbani S, Singh G, Duivenvoorden WC, Orr FW. Mechanisms of tumor metastasis to bone. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2000. 10:281-302.

Whelan JS. Osteosarcoma. *Eur J Cancer.* 1997. 33:1611-18

Wittrant Y, Couillaud S, Theoleyre S, Dunstan C, Heymann D, Redini F. Osteoprotegerin differentially regulates protease expression in osteoclast cultures. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002. 293:38-44.

Wittrant Y, Theoleyre S, Couillaud S, Dunstan C, Heymann D, Redini F. Regulation of osteoclast protease expression by RANKL. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003. 310:774-8.

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.

Wong BR, Besser D, Kim N, Arron JR, Vologodskaja M, Hanafusa H, Choi Y. TRANCE, a TNF family member, activates Akt/PKB through a signaling complex involving TRAF6 and c-Src. *Mol Cell.* 1999. 4:1041-9.

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.

Yakirevich E, Izhak OB, Rennert G, Kovacs ZG, Resnick MB. Cytotoxic phenotype of tumor infiltrating lymphocytes in medullary carcinoma of the breast. *Mod Pathol.* 1999. 12:1050-6.

Yamaguchi K, Kinosaki 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.

Yamaza T, Tsuji Y, Goto T, Kido MA, Nishijima K, Moroi R, Akamine A, Tanaka T. Comparison in localization between cystatin C and cathepsin K in osteoclasts and other cells in mouse tibia epiphysis by immunolight and immunoelectron microscopy. *Bone.* 2001. 29:42-53.

Yang Y, Yaccoby S, Liu W, Langford JK, Pumphrey CY, Theus A, Epstein J, Sanderson RD. Soluble syndecan-1 promotes growth of myeloma tumors in vivo. *Blood.* 2002. 100:610-7.

Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki 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.

Ye H, Arron JR, Lamothe B, Cirilli M, Kobayashi T, Shevde NK, Segal D, Dzivenu OK, Vologodskaja M, Yim M, Du K, Singh S, Pike JW, Darnay BG, Choi Y, Wu H. Distinct molecular mechanism for initiating TRAF6 signalling. *Nature*. 2002. 418:443-7.

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

Yu P, Lee Y, Liu W, Krausz T, Chong A, Schreiber H, Fu YX. Intratumor depletion of CD4+ cells unmasks tumor immunogenicity leading to the rejection of late-stage tumors. *J Exp Med*. 2005. 201:779-91.

Yu X, Huang Y, Collin-Osdoby P, Osdoby P. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) recruits osteoclast precursors by inducing chemotaxis, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity, and collagen transmigration. *J Bone Miner Res*. 2003. 18:1404-18.

Yu X, Huang Y, Collin-Osdoby P, Osdoby P. CCR1 chemokines promote the chemotactic recruitment, RANKL development, and motility of osteoclasts and are induced by inflammatory cytokines in osteoblasts. *J Bone Miner Res*. 2004. 19:2065-77.

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.

Zannettino AC, Holding CA, Diamond P, Atkins GJ, Kostakis P, Farrugia A, Gamble J, To LB, Findlay DM, Haynes DR. Osteoprotegerin (OPG) is localized to the Weibel-Palade bodies of human vascular endothelial cells and is physically associated with von Willebrand factor. *J Cell Physiol*. 2005. 204:714-23.

Zeh HJ 3rd, Hurd S, Storkus WJ, Lotze MT. Interleukin-12 promotes the proliferation and cytolytic maturation of immune effectors: implications for the immunotherapy of cancer. *J Immunother*. 1993. 14:155-61.

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.

ANNEXES

Solutions utilisées pour la zymographie :**❖ Gel à 10% d'acrylamide :**

Acrylamide / bis-acrylamide à 40 % (37,5/1)	5 ml
Tris 1,5 M pH 8,8	3,33 ml
SDS 10 %	250 µl
Gélatine 10 %	438 µl
Ammonium persulfate 10 %	125 µl
TEMED	41 µl
H ₂ O	qsp 20 ml

❖ Tampon d'échantillon :

Tris 0,5M pH 6,8	200 µl
SDS 10 %	400 µl
Glycérol	400 µl
Bleu de bromophénol	1 mg

❖ Tampon de migration pH 8,3 :

Tris	6 g
Glycine	28,8 g
SDS 10 %	10 ml
H ₂ O	qsp 1000 ml

❖ Solution de coloration :

Méthanol	500 ml
Acide acétique glacial	70 ml
Bleu brillant de Coomassie	1 g
H ₂ O	qsp 1000 ml

❖ Solution de décoloration :

Méthanol	200 ml
Acide acétique	70 ml
Glycérol	30 ml
H ₂ O	qsp 1000 ml

Solutions utilisées pour la biologie moléculaire :

Gel d'ARN

❖ Tampon de charge :

¾ Ficoll 25%
¼ Bleu de bromophénol saturé

❖ Gel d'électrophorèse :

Agarose	0,50 g
MOPS (3-(N-morpholino) propane-sulfonic acid) 10X	5 ml
Formaldehyde 37%	8 ml
Eau DEPC	qsp 50 ml

❖ Tampon de migration :

MOPS 1X

Gel d'ADN

❖ TAE 50X :

Tris	121 g
EDTA 0,5 M	50 ml
Acide acétique glacial 1 M	28,5 ml
Eau distillée	qsp 500 ml

❖ Tampon de charge :

Glycérol	700 µl
TAE 1X	700 µl
Bleu de bromophénol saturé	20 µl

❖ Tampon de migration :

TAE 1X

Solutions utilisées pour le western blot :

❖ Tampon de lyse (Ripa Buffer)

NaCl 150 mM
 Tris 50 mM, pH 7,4
 NP-40 (Nonidet P-40) 1%
 Sodium deoxycholate 0,25%
 NaF 1 mM
 NaVO₄ 1 mM
 Leupeptine 10 µg/ml
 Aprotinine 10 µg/ml
 PMSF (phenylmethylsulfonylfluoride) 0,5 mM
 Glycérol 10%
 H₂O

❖ Tampon de charge

Tris 0,5 M, pH 6,8	1,25 ml
Glycérol	2,5 ml
SDS (sodium dodecyl sulfate) à 10%	2 ml
Bleu de bromophénol à 0,5%	200 µl
β-mercaptoethanol	500 µl
H ₂ O	qsp 10 ml

❖ Gel dénaturant à 10% d'acrylamide

Acrylamide / bis-acrylamide à 30% (37,5 / 1)	3,3 ml
Tris 1,5 M, pH 8,8	2,5 ml
SDS à 10%	100 µl
Ammonium persulfate à 10%	100 µl
TEMED (N, N, N', N'- tetraméthyléthylènediamine)	4 µl
H ₂ O	qsp 10 ml

Mécanismes d'action de l'ostéoprotégérine et étude de ses interactions avec les protéoglycanes. Nouvelle approche thérapeutique des ostéosarcomes.

OPG, RANK, RANK-L, protéoglycane, ostéoclaste, ostéosarcome, TIL.

L'interaction entre RANK-L (Receptor Activator of NF- κ B Ligand), exprimé par les ostéoblastes, et RANK, présent à la surface des ostéoclastes, stimule l'activité ostéoclastique et donc la résorption osseuse. L'OPG (ostéoprotégérine), en se fixant à RANK-L, bloque cette interaction et joue ainsi un rôle d'inhibiteur de l'activité des ostéoclastes. Le travail présenté ici, révèle que l'OPG possède également un effet direct sur l'activité des cellules ostéoclastiques (transcription, activité enzymatique, signalisation intracellulaire). Cette activité biologique de l'OPG implique des interactions avec les protéoglycanes mais aussi la formation d'un complexe ternaire RANK / RANK-L / OPG. Par ailleurs, la caractérisation phénotypique et fonctionnelle de TIL (Tumor-infiltrating lymphocytes), obtenus à partir de diverses tumeurs osseuses, a été réalisée. Ces expériences ont mis en évidence l'intérêt des TIL issus d'ostéosarcome pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques.

Osteoprotegerin's mechanisms of action and study of its interactions with proteoglycans. New therapeutic approach of osteosarcoma.

OPG, RANK, RANK-L, proteoglycan, osteoclast, osteosarcoma, TIL.

The interaction between RANK-L (Receptor Activator of NF-KB Ligand), expressed by osteoblasts, and RANK, present at the surface of osteoclasts, stimulates the osteoclastic activity and thus the bone resorption. OPG (osteoprotegerin), through its binding to RANK-L, blocks this interaction and thus acts as a decoy receptor inhibiting osteoclast activities. The present work reveals that OPG also exerts a direct effect on the osteoclasts (transcription, enzymatic activity, intracellular signalling). These biological activities induced by OPG, imply interactions with proteoglycans but also the formation of a ternary complex RANK / RANK-L / OPG. In addition, the phenotypic and functional characterization of TIL (Tumor-infiltrating lymphocytes), obtained from various bone tumors, was carried out. These experiments highlighted the interest of TIL, resulting from osteosarcoma, for the development of new therapeutic approaches.

THEOLEYRE Sandrine

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

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