

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE MEDECINE ET PHARMACIE

NOUVELLES APPROCHES THERAPEUTIQUES DES OSTEOSARCOMES

THESE DE DOCTORAT

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

présentée
et soutenue publiquement par

WITTRANT Yohann

le vendredi 21 Octobre 2005, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs

JURDIC Pierre
CARLE Georges

Directeur de Recherche INSERM, Ecole Normale Supérieure de Lyon
Directeur de Recherche CNRS, Faculté de Médecine de Nice

Examineurs

GREGOIRE Marc
HEYMANN Dominique

Directeur de Recherche INSERM, U601
Maître de Conférence Universitaire, Faculté de Médecine de Nantes

Directeur de thèse

Mme REDINI Françoise

Chargée de Recherche INSERM, Faculté de Médecine de Nantes.

Table des matières

Remerciements	2
Table des matières	5
Liste des abréviations	8
Introduction :	10
Généralités - l'os : une structure organique minéralisée et dynamique	10
Les acteurs de la résorption osseuse	14
Les ostéoclastes	14
La triade OPG / RANK / RANKL	17
Les pathologies	20
Généralités : déséquilibre de la balance résorption/apposition	20
Les ostéolyses tumorales	22
L'ostéosarcome	24
Approches thérapeutiques conventionnelles de l'ostéosarcome	26
Les traitements chirurgicaux	27
Les traitements non chirurgicaux	27
Limites	28
Les nouvelles approches thérapeutiques des ostéosarcomes	29
Potentiels thérapeutiques de la triade OPG/RANK/RANKL	29
Immunothérapies	30
Objectifs de la thèse	35
Introduction à la première partie.	37
Article I.	39
Complément de discussion à l'article I.	47

Article II.	50
Complément de discussion à l'article II.	56
Article III.	59
Complément de discussion à l'article III.	70
Article IV.	73
Complément de discussion à l'article IV.	81
Synthèse et conclusions de la première partie.	84
Introduction à la seconde partie.	86
Article V.	87
Complément de discussion à l'article V.	88
Influence de la surexpression systémique des protéines recombinantes RANK-Fc et OPG sur le développement de tumeurs osseuses primitives.	92
Introduction	92
Matériels et Méthodes	94
Résultats	97
Discussion / conclusion	100
Synthèse et conclusions de la seconde partie.	106
Introduction à la troisième partie.	109
Immunothérapie active par l'utilisation de cellules dendritiques cytotoxiques dans un modèle d'ostéosarcome de rat.	112
Introduction	112
Matériels et méthodes.....	113
Résultats	118
Discussion / conclusion.....	121

Immunothérapie active par l'utilisation de cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse dans un modèle d'ostéosarcome de souris.	125
Introduction	125
Matériels et méthodes.....	126
Résultats	133
Discussion / conclusion	138
Synthèse et conclusions de la troisième partie.	142
Conclusions générales et perspectives.	145
Références Bibliographiques.....	150

Liste des abréviations

AKT/PKB : Protéine Kinase B

CTLA-4 : Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4

CTLs : Cytotoxic T-Lymphocytes

DHFR : DiHydroxy-Folate Reductase

dNTP: desoxyribo-Nucléotide TriPhosphate

DTT: Dithiothréitol

EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétate

ERK : Extracellular signal-Regulated protein Kinase

FGF : Fibroblast Growth Factor

GM-CSF : Granulocyte and Macrophage Colony Stimulating Factor

IL-4 : Interleukine-4

IFN : Interferon

JNK : c-jun N-terminal kinase

MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase

MMLV-RT: Murine Moloney Leukemia Virus-Reverse Transcriptase

NFkB : Nuclear Factor kappa B

PBMCs : Peripheral blood mononuclear cells

PBS : Phosphate Buffered Saline

PEG2 : Protaglandin E2

PI3K : Phospho-Inositol 3 Kinase

PMSF: Phenylmethylsulfonyl

PTHrP : Para-Thyroïd Hormone related Peptide

PVDF: Polyfluorure de Vinylidène

SART-3 : Squamous Antigen Rejection Tumor 3

TAB2 : TAK1-binding protein 2

TILs : Tumor Infiltrating T Lymphocytes

TRAF6 : Tumor necrosis factor Receptor Associated Factor 6

Introduction :

Généralités - l'os : une structure organique minéralisée et dynamique

Le squelette représente la charpente ou structure interne que partagent tous les membres de l'ordre des vertébrés. Celui-ci peut-être minéralisé ou non et permet la distinction de sous-catégories de vertébrés. Les mammifères comptent parmi les membres des vertébrés possédant une ossature minéralisable. De fait, le squelette humain constitue tout d'abord une structure organique cartilagineuse qui se minéralise avec l'âge [Cancedda et coll. (2000) ; Mundy et coll. (1995) ; Dasmin et coll. (1996)]. On distingue alors l'os en formation de l'os mature. La formation du tissu osseux entraîne l'augmentation de longueur par ossification enchondrale et en épaisseur par ossification périostée, soit un gain de taille et de poids. La maturation, en revanche, est la transformation des pièces cartilagineuses ou membraneuses en structures osseuses, c'est-à-dire un remodelage sans élaboration d'un tissu osseux nouveau. Cette minéralisation tardive permet la croissance et l'augmentation de la masse de matière vivante qui accompagne le développement de l'individu depuis la conception. La croissance des os, et par conséquent de l'organisme, débute précocement chez l'embryon de 3 à 4 semaines et se termine vers 17 ou 18 ans lorsque les derniers cartilages de croissance encore actifs se ferment. A l'âge adulte, l'individu possède un tissu osseux minéralisé sur lequel seules subsistent des zones de cartilage articulaire [Peyron et coll. (1994)]. La minéralisation confère à l'os des propriétés particulières, notamment mécaniques et métaboliques. L'os minéralisé est rigide et permet le maintien de la stature de l'organisme. Il a notamment permis à l'homme de défier la gravité terrestre pour se tenir debout et ainsi assurer son évolution. Outre la station debout, le squelette humain assure une fonction de protection des organes vitaux. Ceci est particulièrement vérifiable pour le système nerveux central entouré

par les os du crâne pour les hémisphères cérébraux, le tronc et le cervelet et par le rachis vertébral pour la moelle épinière. C'est également le cas pour le cœur et les poumons protégés par la cage thoracique. Le tissu osseux intervient également dans le déplacement de l'individu et constitue un élément central de l'appareil locomoteur. Il sert de point d'ancrage aux différents plans musculaires et fonctionne tour à tour tel un levier, un pivot ou un référentiel dans la conception d'un mouvement. Souvent moins cité dans la liste des différents rôles du tissu minéralisé, celui-ci est également impliqué dans la digestion, notamment la mastication. Celle-ci fait intervenir des entités spécialisées du tissu osseux que sont les dents. D'autre part, par sa composition le tissu minéralisé participe à la régulation de la calcémie. Il renferme plus de 99% des stocks de calcium de l'organisme sous forme de cristaux d'hydroxyapatite [Chavassieux et coll. (2003)]. Il est le siège d'activités de résorption et d'apposition coordonnées dans le temps correspondant au remodelage osseux [Chenu et coll. (1994)]. Ce processus est le fait de deux types cellulaires, les ostéoclastes et les ostéoblastes qui en réponse à différents stimuli assurent la croissance, le renouvellement du tissu osseux et le maintien de l'homéostasie phospho-calcique [Karsenty et coll. (1999) ; Roodman et coll. (1996)].

Le squelette humain compte plus de deux cents os d'aspects et de propriétés variables. L'ensemble de ces os constitue le tissu osseux et dérive du mésenchyme embryonnaire [Shindo et coll. (2003)]. Il s'agit d'un tissu conjonctif dont la composition, l'organisation et la dynamique assurent sa fonction mécanique de soutien et son rôle dans l'homéostasie minérale. En outre, le tissu osseux renferme la moelle osseuse, siège de l'hématopoïèse [Chavassieux et coll. (2003)]. Tout au long de la vie, l'os est constamment détruit puis reconstruit au cours des différentes phases du remodelage osseux. L'équilibre entre les phases de résorption et de formation permet à l'os de conserver ses propriétés ([Figure 1](#)).

Pour assurer son remodelage, le tissu osseux évolue au rythme des interactions de ses différentes composantes minérale, organique et cellulaire. A cet effet, le tissu osseux est le siège d'une réorganisation permanente de la proportion de chacune de ses différentes fractions, en réponse à de multiples stimuli, afin d'assurer les fonctions précédemment citées. Ce remodelage osseux est régulé par l'action de nombreux facteurs locaux et systémiques tels que des cytokines, des hormones mais aussi par des interactions cellulaires. Il est le résultat de l'équilibre entre les activités ostéoblastique et ostéoclastique respectivement responsables des phénomènes d'apposition et de résorption au sein du tissu osseux.

Le tissu osseux est constitué d'une trame protéique sur laquelle se fixe la phase minérale. Elle se compose essentiellement de fibres de collagène de type I (qui représentent environ 90 % de la phase organique de l'os) entourées d'une substance fondamentale interfibrillaire [Chavassieux et coll. (2003)]. Les fibres de collagène sont arrangées parallèlement au sein d'une même lamelle osseuse, mais leur orientation varie d'une lamelle à l'autre, ce qui confère à l'os sa structure lamellaire. La substance fondamentale interfibrillaire est constituée de composants variés tels que des glycoprotéines (ostéonectine, ostéopontine, sialoprotéine osseuse), des protéines contenant des résidus d'acide glutamique carboxylé (ostéocalcine), des phosphoprotéines, des phospholipides, des protéoglycanes, des cytokines et des facteurs de croissance. La plus abondante des protéines non collagéniques est l'ostéocalcine qui représente 10 à 20 % de l'ensemble de ces protéines [Swaminathan et coll. (2001)]. Elle jouerait un rôle dans l'attraction des ostéoclastes dans les foyers de résorption et dans la minéralisation [Glowacki et coll. (1991)]. Plusieurs protéines non collagéniques telles l'ostéopontine, la sialoprotéine, la thrombospondine et la fibronectine renferment une séquence arginine-glycine-acide aspartique (RGD). Cette séquence RGD caractérise les protéines d'adhésion cellulaire et est reconnue par certaines protéines membranaires appelées intégrines. Ainsi, les intégrines présentes à la surface des ostéoblastes permettraient leur

attachement à la matrice extracellulaire et leur différenciation [Cavalcant-Adam et coll. (2002)]. Des facteurs de croissance et des cytokines (transforming growth factor β ou TGF β , insulin-like growth factor ou IGF, tumor necrosis factor ou TNF, les interleukines et les bone morphogenetic proteins ou BMP) sont également présents dans la matrice osseuse [Hauschka et coll. (1986)]. Ces facteurs protéiques jouent un rôle important dans l'activation et la différenciation cellulaire et interviennent dans le couplage entre la formation et la résorption osseuse [Horwood et coll. (1998)]. La phase inorganique de la matrice osseuse confère à l'os sa rigidité et sa résistance mécanique et représente aussi une importante réserve minérale. En effet, environ 99% du calcium de l'organisme, 85% du phosphore, entre 40 et 60% du sodium et du magnésium sont incorporés dans les cristaux qui constituent la substance minérale osseuse. Elle est essentiellement composée de phosphate de calcium cristallisé sous forme d'hydroxyapatite. Les cristaux d'hydroxyapatite ont une forme hexagonale, aplatie et sont disposés dans les espaces interfibrillaires. Leur nombre et leur taille s'accroissent lentement au cours du processus lent de minéralisation secondaire succédant à la minéralisation primaire qui suit immédiatement la synthèse de matrice par les ostéoblastes et qui n'apporte d'emblée qu'environ 60 % de la charge tissulaire minérale.

L'os est le siège d'une collaboration étroite entre la matière minérale et la matière organique. Cette collaboration est le fruit de l'activité cohérente et coordonnée de quatre types de cellules d'origine mésenchymateuse ou hématopoïétique appartenant au tissu osseux.

Le mésenchyme donne naissance à la majorité de la fraction cellulaire osseuse, à savoir : les ostéoblastes, les ostéocytes et les cellules bordantes ; elles sont principalement impliquées dans la construction osseuse. L'ostéoblaste est la cellule sécrétrice des constituants de la matrice organique. Il dérive d'une cellule souche pluripotente commune aux chondrocytes, fibroblastes, myocytes et adipocytes [Karsenty et coll. (2001)]. De forme allongée ou cuboïdale, les ostéoblastes tapissent la surface osseuse en cours de formation. Leur fonction

principale est la synthèse de la trame protéique de l'os (collagène et protéines non collagéniques). Les ostéocytes quant à eux, proviennent de la transformation de certains ostéoblastes emmurés dans le tissu osseux, à l'intérieur d'une lacune périostéocytaire [Aarden et coll. (1994)]. Ils possèdent de nombreux et fins prolongements cytoplasmiques qui leur permettent d'établir des contacts avec les autres ostéocytes et les cellules bordantes. Les ostéocytes interviennent essentiellement dans la transmission des signaux mécanosensoriels et dans les échanges entre les cellules et le microenvironnement [Iqbal et coll. (2005)]. Recouvrant les surfaces osseuses en phase quiescente, les cellules mésenchymales bordantes permettent d'assurer la communication entre la surface osseuse, l'environnement cellulaire et les ostéocytes emmurés dans la matrice osseuse. Elles jouent également un rôle durant la phase initiale du remodelage osseux. Sous l'effet de certains stimuli tels que la présence de Para-thyroïde hormone (PTH), elles libèrent la surface osseuse permettant ainsi l'action des ostéoclastes [Murray et coll. (1994)].

Les acteurs de la résorption osseuse.

Les ostéoclastes

Le remodelage osseux est le résultat de l'activité coordonnée des ostéoblastes et ostéoclastes. Ainsi, la résorption osseuse est l'étape préalable indispensable à la reconstruction osseuse. Elle est assurée par les ostéoclastes qui représentent le quatrième groupe de cellules présentes au sein de la matrice osseuse. Différant des autres cellules osseuses par leur origine hématopoïétique, les ostéoclastes dérivent d'un précurseur commun de la lignée monocyttaire et sont en charge de la dégradation du tissu osseux ([Figure 2](#)). Des expériences de transplantation de moelle osseuse chez l'homme et de caractérisation cellulaire chez l'animal ont montré que les ostéoclastes dérivent d'une cellule souche multipotente présente dans la

moelle osseuse [Loutit et coll. (1982) ; McMahon et coll. (2001) ; Takeshita et coll. (2000)]. Cependant d'autres travaux mettent en évidence l'obtention d'ostéoclastes à partir de cellules souches hématopoïétiques du tissu splénique. Ainsi, l'identité de la lignée cellulaire spécifique, à l'origine de l'ostéoclaste, reste controversée. L'origine hématopoïétique des ostéoclastes a été mise en évidence par des études *in vivo* et plus récemment à l'aide de systèmes de culture de moelle osseuse ou de splénocytes *in vitro*, dans lesquels des cellules ostéoclastiques se forment à partir des précurseurs contenus dans ces deux organes [Hayashi et coll. (2003)]. Les travaux réalisés par Scheven et coll ont suggéré que l'ostéoclaste dériverait d'un précurseur hématopoïétique en amont de la lignée monocyttaire en raison d'une corrélation entre la formation ostéoclastique et le degré de pureté des populations de cellules souches hématopoïétiques [Scheven et coll. (1986)].

Cependant, un certain nombre de données attestent que les ostéoclastes dérivent de la lignée monocyttaire-macrophagique et divergent des monocytes à un moment qui coïncide avec leur différenciation. En effet, Udagawa et coll. ont mis en évidence que des macrophages alvéolaires ou issus du péritoine, cocultivés avec des cellules stromales de la moelle osseuse, pouvaient se différencier en ostéoclastes [Udagawa et coll. (1990) ; Yasuda et coll. (1998)]. D'autre part, Cecchini et coll. ont montré que des souris ostéopétrotiques, incapables de produire le « macrophage colony stimulating factor » (M-CSF), étaient déficientes en monocytes et ostéoclastes mais pas en d'autres cellules hématopoïétiques [Cecchini et coll. (1997)]. Récemment, les travaux de l'équipe de Jurdic et coll. ont mis en évidence la possibilité de transdifférencier des cellules dendritiques immatures en ostéoclastes démontrant ainsi la plasticité des cellules myéloïdes [Rivollier et coll. (2004)] ([Figure 3](#)).

Par ailleurs, Blin-Wakkach et coll. ont montré *in vitro* que l'ostéoclaste pouvait également dériver d'une population bipotente de progéniteurs hématopoïétiques capables de s'engager dans une voie de différenciation lymphoïde ou myéloïde [Blin-Wakkach et coll. (2004)]. Il

semble donc que les ostéoclastes soient issus de plusieurs voies de différenciation possibles, de précurseurs hématopoïétiques précoces ou bipotents ainsi que de cellules myéloïdes plus différenciées.

L'ostéoclaste est une grosse cellule multinucléée pouvant renfermer de 2 à 30 noyaux et riche en enzymes lysosomales telles la phosphatase acide résistante au tartrate (TRAP) ou la cathepsine K et des collagénases [Kurata et coll. (2001)]. L'ostéoclaste est visible au fond des lacunes de résorption appelées lacunes de Howship, au contact de la matrice osseuse calcifiée. La zone de contact est caractérisée par la présence de nombreuses vacuoles intracytoplasmiques et d'une bordure plissée. À ce niveau, l'ostéoclaste est capable d'acidifier le milieu extracellulaire grâce à une pompe à protons, ce qui permet la solubilisation de la fraction minérale. La digestion de la trame organique s'effectue ensuite sous l'action des enzymes protéolytiques contenues dans les lysosomes ([Figures 4 et 5](#)).

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 [Delaissé et coll (2000) ; Blair et coll. (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. Cependant, outre leur implication dans cette dégradation, le rôle précis de ces protéases reste mal connu. Les MMPs interviennent notamment dans la libération du Receptor Activator of NFkB Ligand soluble (RANKLs) par le clivage de la forme membranaire de celui-ci (32). La MMP9, connue pour être la gélatinase la plus abondamment exprimée par l'ostéoclaste, participe à la migration des cellules ostéoclastiques et les résultats divergent quant à son implication directe dans le processus de résorption osseuse [Delaissé et coll (2000)]. L'activité des MMPs est contrebalancée par la présence au sein de l'environnement osseux de leurs inhibiteurs naturels, les Tissue Inhibitors of Matrix Metallo-Proteinase (TIMPs) [Rifas et

coll. (1994)]. La cathepsine K quant à elle, 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 coll. (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) ou au contraire la maladie de Gaucher, due à une surexpression de la cathepsine K [Motyckova et coll. (2001)]. En outre, des ostéopétroses sévères sont observées dans des modèles animaux invalidés pour le gène de cette enzyme [Saftig et coll. (1998)].

La triade OPG / RANK / RANKL

La plupart des hormones et des facteurs locaux qui affectent la résorption osseuse agissent à la fois sur l'équilibre formation/différenciation des ostéoclastes ainsi que sur leur activité. Le développement de techniques *in vitro* d'isolement des ostéoclastes et l'étude de leur formation à partir des précurseurs hématopoïétiques ont permis l'identification et la détermination du mode d'action d'un grand nombre de facteurs qui régulent l'activité des ostéoclastes. Les mécanismes d'action de tous ces facteurs sur la résorption osseuse diffèrent selon qu'ils agissent directement ou non sur les ostéoclastes. Il est maintenant admis que l'activation des ostéoclastes par certaines hormones ou facteurs locaux serait médiée par les cellules ostéoblastiques qui répondent à ces facteurs en envoyant un second signal (facteur soluble ou contact cellulaire) à l'ostéoclaste. En effet, la présence de récepteurs à un grand nombre d'hormones et de cytokines impliquées dans la résorption osseuse à la surface des ostéoblastes, a confirmé le concept de régulation indirecte de la résorption osseuse par ceux-ci [Martin et coll. (1994)]. La nécessité d'une interaction directe entre les ostéoblastes et les progéniteurs ostéoclastiques pour la formation des ostéoclastes a été mise en évidence chez la souris grâce au développement de modèles de cocultures [Udagawa et coll. (1990)]. Dans ces systèmes, les populations ostéoblastiques sont cultivées avec des cellules spléniques ou de moelle osseuse

contenant les progéniteurs hématopoïétiques, en présence de 1,25-dihydroxyvitamine D₃ (1,25(OH)₂D₃) et conduisent à la formation d'ostéoclastes. La résorption ostéoclastique nécessite donc la maturation et l'activation de précurseurs hématopoïétiques via des interactions ostéoblastes/ostéoclastes, lesquelles sont régulées par une triade de molécules récemment découvertes : Receptor Activator of NFκB / RANK Ligand / Ostéoprotégérine (RANK / RANKL / OPG) [Hofbauer et coll. (2001) ; Khosla et coll. (2001)]. Ces cytokines appartiennent à la superfamille des Tumor Necrosis Factors (TNF) et de leurs récepteurs et représentent un pivot moléculaire vers lequel convergent la plupart des systèmes régulateurs de la résorption osseuse connus à ce jour ([Figures 6 et 7](#)). RANKL aussi appelé ODF, OPGL, TRANCE est un facteur pro-résorptif synthétisé par les cellules mésenchymateuses ostéoblastiques et les lymphocytes T activés [Kong et coll. (1999)]. Ces différentes appellations sont dues à sa découverte par plusieurs équipes dans la même période, cependant la nomenclature officielle est TNFSF11 (11^{ème} membre de la super famille du TNF). RANKL est une protéine présentant trois isoformes résultant de l'épissage alternatif d'un même gène [Ikeda et coll. (2001)]. Ces trois isoformes diffèrent par leur partie N-terminale, mais possèdent néanmoins une structure commune en C-terminal pour la partie extracellulaire contenant le domaine homologue à la famille du TNFα. RANKL1 et RANKL2 sont des protéines membranaires trimériques respectivement de 316 et 287 acides aminés dont seule RANKL1 possède un domaine intra-cytoplasmique en N-terminal lui permettant d'interagir avec des molécules du cytoplasme. A l'inverse, RANKL3 est une protéine soluble monomérique de 199 acides aminés, déletée en N-terminal pour les 118 premiers acides aminés correspondant aux domaines intra-cytoplasmique et transmembranaire de RANKL1. Ainsi présent dans l'environnement osseux sous forme membranaire ou soluble, RANKL se fixe à son récepteur RANK soit à la surface des précurseurs ostéoclastiques pour induire leur différenciation en ostéoclastes matures, soit à la surface d'ostéoclastes quiescents pour les

activer en ostéoclastes matures, capables de résorber l'os. La fixation de RANKL à son récepteur entraîne une cascade de voies de signalisation via TRAF6 dont l'activation de kinases telles que TAB2, PI3K ou AKT [Kim et coll (1999)]. L'augmentation de l'activité de phosphorylation des MAPKinases, active à son tour des effecteurs plus en aval responsables de l'induction des propriétés résorptives des ostéoclastes, tels que p38, ERK, JNK ou le facteur de transcription NFkB. Ces médiateurs intra-cellulaires modulent l'expression de marqueurs ostéoclastiques ainsi que la survie, la mobilité et le réarrangement du cytosquelette de l'ostéoclaste [Amstrong et coll. (2002)]. Au niveau du système immunitaire, RANKL produit par les lymphocytes T agit sur les cellules dendritiques en prolongeant leur survie et en augmentant leur activité.

L'OPG (FRCR-1, OCIF, TR-1 ou TNFRSF11B), synthétisée par les ostéoblastes ou les cellules dendritiques [Yun et coll (1998)], est un facteur anti-résorptif de 55 kD qui agit en tant que récepteur compétiteur soluble en se liant à RANK [Simonet et coll. (1997) ; Shalhoub et coll. (1999)]. Il s'agit d'une protéine soluble de 401 acides aminés présente sous forme monomérique ou dimérique dans l'environnement osseux et possédant à l'extrémité C-terminale un « domaine de mort » et un site de liaison à l'héparine. L'OPG empêche ainsi la fixation de RANKL à son récepteur RANK. Cependant, son rôle pourrait ne pas se limiter à sa seule fonction de leurre puisque Hakeda et coll. ont suggéré une fixation directe de l'OPG sur les cellules ostéoclastiques [Hakeda et coll. (1998)]. Le rôle majeur joué par les molécules RANKL et OPG dans la résorption osseuse a été mis en évidence par des expériences d'inactivation de ces gènes. Les modèles d'animaux invalidés pour le gène de RANKL ou pour celui de l'OPG présentent des troubles du remodelage osseux tels que des ostéopétroses ou des ostéoporoses sévères respectivement [Odgren et coll. (2001) ; Bucay et coll. (1998)]. La régulation de l'expression de chacun des acteurs de cette triade est complexe et fait intervenir un grand nombre de facteurs de croissance, d'hormones, de cytokines voire même

de facteurs mécaniques. Ainsi, l'expression de RANKL est stimulée par les PGE2, les glucocorticoïdes, la PTH et PTHrP, l'IGF-1, l'IL-6, le TNF α , la dexaméthasone ou la 1,25(OH) $_2$ vitamine D3, et à l'inverse, celle de l'OPG est augmentée en présence notamment de 17 α β Estradiol, de BMP-2, d'IL-13, de RANKL, de FGF2 et de NO [Theoleyre et coll. (2004)]. Ces facteurs intègrent d'autres boucles de rétrocontrôle de mécanismes physiologiques (tels que la glycémie ou la reproduction, respectivement pour IGF-1 et le 17 α β Estradiol) [Hussain et coll. (1995) ; Aiello et coll. (2005)], démontrant l'interaction de l'équilibre apposition/résorption osseuse avec l'ensemble des systèmes régulateurs de l'organisme. Ainsi, par leur présence au sein du micro-environnement osseux, cytokines, hormones et facteurs de croissance influencent le ratio OPG/RANKL et par conséquent régulent le remodelage osseux.

Les pathologies

Généralités : déséquilibre de la balance résorption/apposition

Chacune des différentes étapes précédemment citées, maturation et activation des précurseurs ostéoclastiques mais aussi expression cohérente et coordonnée des acteurs protéolytiques ou de la triade moléculaire OPG/RANK/RANKL, peut faire l'objet d'une dérégulation. Ce dysfonctionnement du micro-environnement osseux aboutit à l'apparition de diverses pathologies, ostéo-condensantes, ostéolytiques, bénignes ou malignes.

Parmi les pathologies ostéo-condensantes non tumorales, l'ostéopétrose, la pycnodysostose, et les ostéomalacies sont les plus fréquentes. Il s'agit pour la pycnodysostose ou l'ostéopétrose d'une variation du niveau d'expression d'enzymes protéolytiques notamment d'un défaut d'expression de la cathepsine K [Motyckova et coll. (2001) ; Saftig et coll. (1998)].

Dans ce cas, la balance du remodelage osseux est déséquilibrée au niveau des effecteurs terminaux en faveur de la formation osseuse. L'os subit un défaut de résorption du fait de la non expression d'une enzyme majeure de la résorption osseuse. 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 peu esthétique.

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 [Weber et coll. (2000) ; Eilon et coll. (1978) ; Guise et coll. (1998)]. Les pathologies ostéolytiques non tumorales sont d'origine variée mais présentent toutes une dérégulation directe ou induite du système OPG/RANK/RANKL, conduisant soit à une diminution de l'expression de l'OPG soit à une augmentation de l'expression de RANKL [Grimaud et coll. (2003)]. La plus fréquente de ces affections est l'ostéoporose. Juvénile ou sénile, elle se caractérise sous sa forme constitutionnelle par une perte du capital osseux résultant de la diminution de l'expression de l'OPG. Le terme d'ostéopénie est employée pour les formes les plus légères de la maladie. L'ostéoporose peut également être secondaire. Ainsi, chez la femme ménopausée, la diminution de la production d'estrogènes provoque une baisse de la masse osseuse consécutive au défaut de stimulation de l'expression de l'OPG.

Les ostéopathies endocriniennes telles que l'hypogonadisme, les affections hypophysaires, le diabète de type I, l'hyperparathyroïdisme ou encore les affections surrénaliennes telle que la maladie de Cushing, favorisent également l'apparition de lésions osseuses. Ces ostéopathies impliquent une modulation du niveau de synthèse d'hormones et peuvent induire une variation d'expression des molécules OPG-RANK-RANKL ou agir directement sur les

cellules osseuses. Dans le cas d'un patient atteint d'hyperparathyroïdisme, la surexpression de la calcitonine entraîne un échappement des fonctions ostéoclastiques à cette régulation, conduisant à une activité de résorption accrue [Udelsman et coll. (2001)].

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

Les ostéolyses tumorales

Dans la majorité des cas cliniques, les manifestations ostéolytiques ne sont pas associées à une tumeur. Cependant, les lésions osseuses constituent parfois des zones douloureuses à l'origine du diagnostic d'un développement tumoral et, exceptées certaines formes d'ostéosarcomes ou de métastases ostéocondensantes ostéoblastiques prédominantes chez les patients atteints d'adéno-carcinome prostatique, la quasi-totalité des tumeurs osseuses sont associées au développement de lésions ostéolytiques. On distingue alors selon l'origine de la tumeur, les ostéolyses tumorales primaires ou secondaires [Wittrant et coll. (2004) ; Dubousset et coll. (2001)].

Les tumeurs primaires 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 [Dubousset et coll. (2001)]. 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. Parmi les tumeurs à histogenèse osseuse, la Tumeur à Cellules Géantes se définit par son caractère généralement agressif et purement lytique. Cette tumeur bénigne

touche principalement les épiphyses des os longs. A l'inverse, le sarcome d'Ewing est une tumeur primitive maligne avec un développement souvent important dans les parties molles d'amas de petites cellules rondes sans différenciation cellulaire. Il s'agit aussi d'une lésion lytique agressive avec apparition de métastases à distance, pulmonaires et osseuses. Parmi les tumeurs osseuses primitives d'origine non hématologique, l'ostéosarcome est la pathologie la plus fréquente. Cette tumeur maligne se caractérise par l'alternance de secteurs lytiques et de plages ostéoformatrices (indispensable au diagnostic mais parfois minoritaires). Avec le chondrosarcome, le fibrosarcome, l'histiocytofibrome, et le myélome, ces lésions malignes touchent principalement une population jeune et constituent malheureusement encore aujourd'hui un pool tumoral de pauvre pronostic [Guinebretière et coll. (2001)].

A l'inverse des affections tumorales osseuses primitives, les tumeurs osseuses secondaires sont issues de la dissémination métastatique d'une tumeur primaire développée à partir d'un tissu différent de l'os. Le tissu osseux présente pour certains cancers, un tropisme fort pour le développement de métastases. C'est le cas des carcinomes prostatique et mammaire [Weber et coll. (2000) ; Eilon et coll. (1978) ; Guise et coll. (1998)]. L'analyse histologique des métastases ostéolytiques du cancer du sein indique que la destruction de l'os est médiée par les ostéoclastes plus que par les cellules tumorales elles-mêmes. L'interaction entre les cellules tumorales, les facteurs synthétisés par ces cellules et le microenvironnement osseux est nécessaire pour l'initiation et le développement des atteintes tumorales osseuses secondaires. Ainsi, le concept de « cercle vicieux » conduisant à la formation d'ostéolyses tumorales a été suggéré. Les cellules tumorales secrètent des facteurs solubles dans l'environnement osseux, tels que des cytokines, des facteurs de croissance, ou des hormones, dont la PTH-rP, laquelle stimule la résorption ostéoclastique indirectement par l'induction de la production de RANKL par les cellules stromales ([Figure 8](#)). Cependant, certaines données montrent que les cellules tumorales elles-mêmes peuvent produire RANKL, et ainsi, agir

directement sur la différenciation et l'activation ostéoclastique. C'est notamment le cas pour le myélome multiple, les carcinomes prostatiques, et le neuroblastome humain [Michigami et coll. (2001)]. RANKL exprimé par les cellules stromales ou directement par les cellules tumorales se lie à RANK à la surface des précurseurs ostéoclastiques et, en présence de M-CSF induit la différenciation et la fusion de ces cellules en ostéoclastes matures multinucléés et fonctionnels [Udagawa et coll. (1990)]. La résorption ostéoclastique, en retour, libère par érosion de l'os, des facteurs de croissance stockés dans la matrice osseuse tels que le TGF β , qui vont alors activer les cellules tumorales. La matrice osseuse contient des quantités importantes de TGF β mais également de BMP-2, FGF et IGF-1 [Hauschka et coll. (1986)]. Dans ce modèle, RANKL est décrit comme l'effecteur final de l'ostéoclastogénèse. Les conséquences de ce cercle vicieux sont d'une part la prolifération des cellules tumorales et d'autre part, un déséquilibre de la balance apposition/résorption en faveur d'une dégradation osseuse. Paget repris par Fidler et coll. avait déjà résumé ce concept de cercle vicieux dans sa théorie du « seed and soil » [Fidler (2003)].

L'ostéosarcome

Plusieurs appellations ont été utilisées dans le passé : sarcome squelettogène, sarcome ostéogène qui a été le plus usité et progressivement remplacé, dans la nomenclature internationale, par celui d'ostéosarcome. L'Organisation mondiale de la santé (OMS) définit l'ostéosarcome comme une « tumeur maligne caractérisée par l'élaboration d'os ou de substance ostéoïde par les cellules tumorales » et recouvre une grande variété de lésions de présentation clinique et radiographique, d'aspect microscopique et de comportement très différents [Guinebretière et coll. (2001)].

L'ostéosarcome 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 non hématologique la plus fréquente. Il représente environ 20 % des tumeurs malignes et près du double des cas de sarcomes d'Ewing et de chondrosarcomes. L'ostéosarcome 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. Il est rare avant 10 ans, exceptionnel avant 5 ans, mais aussi très rare après 60 ans où il survient généralement sur terrain prédisposé [Guinebretière et coll. (2001)].

L'étiologie de l'ostéosarcome est à ce jour inconnue. En revanche, il est plus fréquemment rencontré chez des sujets de grande taille, après irradiation, suite au développement de tumeurs préexistantes, dysplasie fibreuse, tumeur à cellules géantes, ou bien de maladie osseuse sous-jacente comme l'ostéogenèse imparfaite, la mélorhéostose et surtout la maladie de Paget pour laquelle, l'ostéosarcome apparaît suite à une modification pathologique du remodelage osseux. Trois groupes d'ostéosarcomes peuvent être distingués : les ostéosarcomes qui se développent à la surface de l'os, ceux de siège intracortical et les ostéosarcomes intramédullaires ou centraux, les plus fréquents. Les ostéosarcomes intracorticaux sont extrêmement rares et seules des observations isolées sont rapportées. Les ostéosarcomes développés à la surface de l'os sont généralement de bon pronostic (les formes périostées, d'aspect cartilagineux, les formes paraostéales ou juxtacorticales, très ostéoformatrices) et à l'inverse, ceux de forme commune sont plus agressifs.

Les ostéosarcomes centraux sont les plus fréquents et regroupent différentes variantes histologiques qui, à l'exception de la forme dite « bien différenciée intramédullaire », sont toutes de haute malignité ([Tableau 1](#)).

Radiographiquement, la tumeur occupe la cavité médullaire, érode et détruit la corticale et envahit les tissus mous, son extension étant au mieux appréciée par l'imagerie par résonance magnétique. Sur les clichés standard, elle associe généralement des secteurs lytiques et sclérosants traduisant son polymorphisme. Sur un plan histologique, l'ostéosarcome montre

des plages ostéoformatrices, indispensables au diagnostic, parfois minoritaires ([Figure 9](#)).

Microscopiquement, cette tumeur mêle différents composants, cartilagineux, fusiforme, ostéoblastique et anaplasique, dont l'importance respective varie d'un patient à l'autre et d'un secteur de la tumeur à un autre.

La survie vis-à-vis de cette tumeur osseuse primitive a été complètement modifiée grâce à la polychimiothérapie. La réduction tumorale qu'elle induit rend possible la préservation du membre aux moyens de techniques de chirurgie conservatrice parfois complexes, tout en assurant une résection carcinologiquement satisfaisante. Cette prise en charge permet aujourd'hui d'obtenir des taux de survie de près de 70 % à 5 ans, tout en préservant la fonction du membre atteint et la qualité de vie. Cependant, l'ostéosarcome conduit à l'apparition de métastases pulmonaires dans les cas les plus avancés de la maladie et le taux de survie chute à seulement 30 % à 5 ans lorsque celles-ci sont présentes lors du diagnostic. De plus, ces traitements sont lourds, souvent mal tolérés et inefficaces [Trieb et coll. (2001) ; Bramwell (2000)]. Les espoirs reposent aujourd'hui sur la recherche de facteurs de chimiosensibilité qui permettraient, au stade initial, d'augmenter la réponse aux drogues, mais ils portent également sur la mise en place de nouveaux protocoles de thérapie génique utilisant des agents anti-résorptifs recombinants ou des cytokines du système immunitaire de même que sur l'emploi de protocoles d'immunothérapie cellulaire.

Approches thérapeutiques conventionnelles de l'ostéosarcome

La prise en charge actuelle des tumeurs osseuses se conçoit dans un cadre pluridisciplinaire. Outre les protocoles de chimiothérapie ou de radiothérapie, la biopsie tumorale est fondamentale pour le diagnostic lésionnel exact et déterminante pour les possibilités chirurgicales et les possibilités de thérapeutiques adjuvantes ultérieures.

Les traitements chirurgicaux

Les principes du traitement chirurgical des tumeurs reposent à l'heure actuelle essentiellement sur la classification de Enneking qui utilise les notions de compartiment et de capsule [Enneking et coll. (1980)]. Enneking déduit de ces notions différents types de chirurgie selon la distance séparant le geste chirurgical de la délimitation anatomique de la lésion tumorale. Ainsi, on peut distinguer le curetage, la résection qui se définit sous une forme marginale, large ou radicale et l'amputation. L'amputation reste un geste rare. Elle n'apporte pas, en elle-même, plus de sécurité carcinologique.

Les traitements non chirurgicaux

La chimiothérapie et la radiothérapie sont, en plus de la chirurgie, les armes essentielles du traitement multidisciplinaire des ostéosarcomes, des sarcomes d'Ewing et des autres tumeurs osseuses primitives. La chimiothérapie cytotoxique administrée par voie générale est destinée à détruire la tumeur en place mais également la maladie métastatique infraclinique. Les objectifs de l'administration d'une chimiothérapie vont alors être multiples en permettant un traitement précoce de la maladie micrométastatique, qui peut être ultérieurement responsable de la rechute et du décès du patient ainsi que d'une réduction de la taille de la tumeur facilitant le geste du chirurgien. Quatre médicaments sont actifs pour le traitement des sarcomes ostéogéniques : le méthotrexate à hautes doses, la doxorubicine, l'ifosfamide et le cisplatine [Alapetite et coll. (2001)]. L'activité antitumorale des cytotoxiques varie selon les tumeurs osseuses. Plusieurs autres médicaments sont actifs dans les sarcomes d'Ewing, notamment le cyclophosphamide, l'actinomycine D, la vincristine et le melphalan.

La radiothérapie est souvent indiquée après chimiothérapie et chirurgie, elle a pour but de réduire le risque de récurrence locale et de contribuer au contrôle de la maladie générale.

Limites

La chimiothérapie représente le grand progrès des 20 dernières années en matière de traitement des tumeurs malignes des os. Elle a permis de multiplier par trois ou quatre le pourcentage des guérisons de la plupart de ces affections. Par ailleurs, la radiothérapie est une discipline en pleine évolution qui a largement bénéficié des développements techniques des 10 dernières années. Cependant, les tumeurs osseuses représentent un groupe hétérogène en terme de radio- ou de chimiosensibilité.

Les mécanismes de résistance aux agents cytotoxiques employés pour le traitement des tumeurs osseuses sont multiples. Ils ont essentiellement été documentés *in vitro* et sont classés selon leur mode d'action. On distingue ainsi, les résistances membranaires, nucléaires ou métaboliques. Par ailleurs, lorsque la tumeur est métastatique, la chimiothérapie est considérée le plus souvent comme un traitement strictement palliatif, bien que 10 à 20 % des patients puissent bénéficier dans cette situation de rémissions complètes.

En ce qui concerne la radiothérapie, le risque le plus important concerne l'induction de tumeurs secondaires. L'amélioration des taux de survie est associée à la mise en évidence d'un risque de sarcomes osseux secondaires, principalement des ostéosarcomes, d'autant plus élevé que l'irradiation est forte et qu'elle a eu lieu sur un sujet jeune.

Même si les traitements conventionnels des ostéosarcomes sus-décrits ont largement contribué à l'augmentation du taux de survie des patients, ceux-ci montrent leurs limites et appellent au moins à être renforcés et au mieux à être suppléés par de nouveaux protocoles thérapeutiques. Ainsi, il devient nécessaire de développer de nouvelles thérapies basées sur une meilleure connaissance de la biologie de l'os, et sur l'utilisation de nouveaux outils génétiques et cellulaires.

Les nouvelles approches thérapeutiques des ostéosarcomes

Potentiels thérapeutiques de la triade OPG/RANK/RANKL

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. Dans la plupart des cas, la manifestation de la malignité de la tumeur osseuse se caractérise par une ostéolyse associée au développement tumoral. Cette perte d'équilibre au profit de la résorption peut résulter de l'acquisition de nouvelles propriétés par les cellules osseuses, comme l'augmentation de l'activité protéolytique, ou la modification de l'expression de facteurs locaux ou systémiques [Grimaud et coll. (2003)]. Une première hypothèse prend en compte l'instabilité génomique des cellules tumorales, laquelle pourrait induire des mutations responsables de la modification des propriétés des cellules osseuses. Une hypothèse alternative repose sur le concept du « cercle vicieux », c'est-à-dire la mise en place d'un environnement favorable à la résorption osseuse, elle-même responsable de la libération de facteurs locaux et ainsi de la création d'un environnement favorable à la croissance tumorale [Weber et coll. (2000) ; Eilon et coll. (1978) ; Guise et coll. (1998)].

La balance apposition/résorption est essentiellement régulée par la triade moléculaire OPG/RANK/RANKL. Le système OPG/RANK/RANKL a été décrit pour être dérégulé dans plusieurs pathologies ostéolytiques d'origine tumorale telles que le myélome multiple [Grimaud et coll. (2003) ; Guiliani et coll. (2001) ; Roux et coll. (2002)]. En effet, l'augmentation de l'expression de RANKL, directement par les cellules tumorales ou indirectement par les cellules stromales ou les lymphocytes T, joue un rôle prépondérant dans la destruction osseuse consécutive à cette affection. A l'inverse, la production endogène d'OPG est soit inhibée soit trop faible pour compenser l'augmentation de l'expression de RANKL. Par conséquent, la triade OPG/RANK/RANKL pourrait devenir une cible moléculaire privilégiée pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques dans le

cas d'ostéolyses d'origine tumorale mais également non tumorale. 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 coll. (2000) ; Luger et coll. (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 coll. (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 [Hang et coll. (2003) ; Sordillo et coll. (2003) ; Oyajobi et coll. (2003)]. Si les effets observés chez les modèles animaux se révèlent être transposables à l'homme en terme de bénéfices cliniques, l'utilisation de constructions recombinantes RANK-Fc et OPG pourrait devenir un champ d'application présentant des potentiels thérapeutiques nouveaux dans le suivi de patients atteints de tumeurs osseuses pour lesquels les traitements conventionnels ont échoué.

Immunothérapies

Le système immunitaire permet la reconnaissance d'antigènes étrangers et ainsi de faire la différence entre le soi et le non soi. Il s'organise en deux compartiments selon la rapidité et la spécificité de la réponse immunitaire. On distingue alors l'immunité innée et l'immunité adaptative. L'immunité innée est la première ligne de défense de l'organisme. Celle-ci met en place des mécanismes d'action rapides mais peu spécifiques. Elle fait appel à des facteurs solubles tels que le complément, mais aussi différents effecteurs cellulaires tels que les granulocytes, mastocytes, macrophages et les cellules natural killer. A l'inverse, la réponse adaptative requiert la mise en place de mécanismes spécifiques et présente donc un délai d'application. Elle intervient lorsque la réponse innée ne suffit pas à éradiquer un pathogène,

et fait appel à l'activation des lymphocytes T et B ainsi qu'à la production d'anticorps [Janeway et coll. (1996)].

L'utilité du système immunitaire dans la défense anti-tumorale a été mise en évidence à la fin du XIX^{ème} siècle par William B. Coley, chirurgien à New York [Amstrong et coll. (2001)]. Celui-ci avait observé une régression tumorale chez certains patients atteints d'infections cutanées par *Streptococcus pyogenes* et entreprit des recherches sur les relations entre le système immunitaire et le développement tumoral. De fait, 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 subit une transformation, avec modification de ses propriétés biologiques, notamment une perte de ses capacités de différenciation au profit de la prolifération [Sung et coll. (2002)]. La cellule tumorale 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 coll (2001) ; Davis et coll. (2003)]. Cependant, la malignité d'une tumeur réside dans sa capacité à échapper à la réponse immunitaire [Finke et coll. (1999)]. En effet, la tumeur met en place des mécanismes de résistance qui lui permettent de proliférer malgré son potentiel immunogène. Ces mécanismes se caractérisent par (i) la diminution de l'expression des molécules du Complexe Majeure d'Histocompatibilité (CMH) [Cabrera et coll. (1998)], (ii) la production de signaux inhibiteurs régulant la prolifération, la différenciation, l'activation ou la survie des cellules du système immunitaire, tels que la production de FAS-Ligand [Kontny et coll. (1998)], d'IL-10 [O'Hara et coll. (1998)] ou de CTLA-4 [Nagamori et coll. (2002)] (iii) ou la perte de sensibilité aux effets anti-prolifératifs du TGF- β [Matsushita et coll. (1999)] et conduisent, en l'absence de traitement, à l'extension tumorale dans un premier temps, puis au décès du patient.

Ces phénomènes sont particulièrement bien étudiés dans le cas du mélanome malin et du carcinome rénal. En effet, en raison de leur malignité, de leur résistance aux agents de chimiothérapies et de l'expression d'antigènes tumoraux, ces carcinomes représentent les deux prototypes pour l'élaboration de protocoles d'immunothérapie [Hsueh et coll. (1998) ; Rosenberg et coll (1998) ; Elhilali et coll. (2000) ; Lens et coll. (2002)]. Lors de la carcinogenèse, les mélanocytes tumoraux acquièrent l'expression d'antigènes tels que Melan-A/MART-1 ou la gp100/Pmel17 [Panelli et coll. (2000)] et cependant le taux de survie à long terme est nul en l'absence de prise en charge du malade. 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, 2, 3 [Sudo et coll. (1997)], HER2/erbB2 [Bramwell et coll. (2000)], SART-1 et SART-3 [Ishida et coll. (2000) ; Tsuda et coll. (2001)]. Ces antigènes sont normalement absents de l'environnement cellulaire osseux dans des conditions physiologiques normales et représente 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 antitumorale [Dudley et coll. (2003)] (CTLs dirigés contre des antigènes tumoraux, TILs 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 coll. (1999) ; Elhilali et coll. (2000) ; Lens et coll. (2002)] ou de cellules présentatrices

d'antigènes destinées à orienter et à stimuler les effecteurs de la réponse immunitaire contre les cellules tumorales.

A l'interface entre la réponse innée et adaptative, la cellule dendritique (DC) est une cellule présentatrice d'antigène dite professionnelle [Janeway et coll. (1996)]. D'origine hématopoïétique, on distingue chez l'homme différents types de cellules dendritiques selon qu'elles dérivent d'un précurseur myéloïde pour les Myeloid Dendritic Cells (MDC) 1 et 2, ou d'un précurseur lymphoïde pour les cellules dendritiques plasmacytoïdes [Ito et coll (2005)]. L'ensemble des rôles des cellules dendritiques n'est pas connu, cependant les DCs sont classiquement décrites dans la littérature pour leur capacité à capter des antigènes en périphérie de l'organisme. Ainsi chargées, elles migrent vers les organes lymphoïdes secondaires pour présenter ces antigènes aux lymphocytes et initier la réponse immunitaire adaptative [Spisek et coll. (2001) ; Brugger et coll. (2001)] ([Figure 10](#)). Au cours de leur migration vers les nœuds lymphatiques, leurs propriétés changent. D'abord immatures lorsqu'elles circulent dans les tissus périphériques, elles possèdent alors une activité de phagocytose importante leur permettant de capter un grand nombre d'antigènes qu'elles présentent peu, et n'expriment pas ou peu de molécules de co-stimulation à l'origine de l'activation lymphocytaire [Spisek et coll. (2001) ; Brugger et coll. (2001)]. La capture d'antigènes étrangers (éventuellement issus de cellules tumorales), associée à un contexte cytokinique inflammatoire entraîne la maturation des DCs et ainsi leur migration vers les centres lymphoïdes. Les DCs perdent alors peu à peu leur fonction de phagocytose au profit de l'expression accrue des molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I et II (CMH I et II) sur lesquelles sont présentés les antigènes ingérés en périphérie, et des molécules de co-stimulation telles que B7.1 et B7.2 [Spisek et coll. (2001) ; Brugger et coll. (2001)]. Leur forme change également, ronde à l'état immature, elles acquièrent un aspect étoilé afin d'augmenter les contacts cellulaires avec les lymphocytes. Au sein des tissus

lymphoïdes secondaires, les lymphocytes reconnaissent via leurs récepteurs de surface les antigènes présentés par les DCs et reçoivent les signaux de co-stimulation, de prolifération et d'éducation nécessaires à l'initiation et à l'orientation de la réponse immunitaire antitumorale.

Dans le cadre du mélanome malin humain, des protocoles d'immunothérapie active par l'utilisation de DCs ont été amorcés [Panelli et coll. (2000)]. Une étude récente montre que des patients ayant reçu des DCs, chargées soit avec un lysat de cellules tumorales soit un cocktail composé de différents peptides, présentent une induction de la prolifération de lymphocytes cytotoxiques (CTLs) spécifiques [Castelli et coll. (2000)]. Cette prolifération lymphocytaire indique l'efficacité de ce traitement à générer une réponse immunitaire spécifique de l'antigène. Dans cet essai clinique de phase I les DCs dérivées de la moelle osseuse sont chargées avec les antigènes tumoraux tyrosinase et gp100 et injectées par voie intraveineuse chez des malades atteints de mélanome. Parmi 16 patients traités, 11 patients présentent une réponse spécifique d'antigène, dont 1 est en phase de rémission métastatique complète, 2 en état stationnaire et 2 présentent une réponse mixte. Les cellules dendritiques sont obtenues à partir de précurseurs issus de la moelle osseuse cultivés en présence d'antigènes tumoraux et de différentes cytokines permettant la différenciation des précurseurs et la maturation des DCs. L'efficacité du traitement est alors évalué en fonction de différents paramètres de la réponse immunitaire et de l'évolution tumorale. Dans une autre série utilisant un mélange des antigènes tumoraux Melan-A/MART-1, tyrosinase, MAGE-3 et gp100, 10 des 18 patients traités répondent à au moins 2 antigènes de mélanome et 7 présentent une régression tumorale. Compte tenu des résultats encourageants obtenus par l'immunothérapie active sur le mélanome, il apparaît essentiel d'étendre la faisabilité d'un tel projet à d'autres pathologies tumorales notamment l'ostéosarcome.

D'autre part, le linéage de la population des DCs n'est, à l'heure actuelle, pas encore entièrement défini et les descriptions de sous-populations sont nombreuses. Parmi celles-ci, les cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse, dites « classiques » occupent une place prédominante dans les protocoles d'immunothérapie active. Plus récemment, l'équipe de Régis Josien a mis en évidence une puissante activité cytotoxique directe d'une sous-population de DC issues du tissu splénique de rat contre des lignées tumorales *in vitro* mais pas contre des cellules normales [Trinité et coll. (2000) ; Voisine et coll. (2002)]. Ces DCs ouvrent une voie nouvelles dans la conception des protocoles, à mi-chemin entre l'immunothérapie passive et active.

Objectifs de la thèse

Récemment découverte, la triade OPG/RANK/RANKL représente les effecteurs finaux dans la régulation de la balance apposition/ résorption osseuse. Cependant, la compréhension de l'intégralité des mécanismes de ce système reste incertaine et nécessite de nouvelles investigations. L'équipe d'Hakeda et collaborateurs fut la seule à supporter l'idée en 1998 que l'OPG, en plus de son action inhibitrice indirecte sur l'ostéoclastogenèse *via* la fixation de RANKL, pourrait agir directement sur l'ostéoclaste [Hakeda et coll. (1998)]. Afin de préciser les mécanismes d'action *in vitro* des facteurs RANKL et OPG sur l'ostéoclaste, nous avons entrepris d'étendre cette étude préliminaire, d'abord dans un modèle d'ostéoclastes purifiés de lapereaux, puis dans un modèle de précurseurs ostéoclastiques par l'utilisation de la lignée murine RAW 264.7.

L'équilibre apposition/résorption osseuse, sous le contrôle de la triade moléculaire OPG/RANK/RANKL, est largement affecté lors de pathologies tumorales telles que l'ostéosarcome. Un des objectifs de cette thèse a été de développer de nouvelles approches thérapeutiques des tumeurs osseuses primitives en utilisant des modèles expérimentaux spécifiques, tel que le modèle murin d'ostéosarcome POS-1. Les résultats obtenus nous ont

permis de caractériser ce modèle sur le plan phénotypique et d'évaluer les effets d'acteurs de la triade sur l'activité biologique de ces cellules tumorales, notamment RANKL via RANK. Les données recueillies ont été confrontées à d'autres données plus larges, nous permettant ainsi de définir des orientations potentielles, quant à l'utilisation de ces cytokines en tant que cibles thérapeutiques. Afin de définir ces orientations, la mise au point de protocoles de thérapie génique a été entreprise au moyen de constructions recombinantes virales contenant des transgènes d'intérêt tels que RANK-Fc et OPG.

Bien que les traitements conventionnels des ostéosarcomes aient largement contribué à l'augmentation du taux de survie des patients, ceux-ci montrent désormais leurs limites. De fait, la nécessité de développer de nouvelles thérapies apparaît de plus en plus clairement ; thérapies géniques telles que nous les avons mentionnées ci-dessus mais également thérapies cellulaires par l'utilisation de l'immunothérapie passive ou active. Nous avons donc entrepris la mise en place de protocoles d'immunothérapie active par l'utilisation de cellules dendritiques, dérivées soit de la moelle osseuse dans le modèle d'ostéosarcome murin POS-1, soit du tissu splénique dans le modèle OSRGa d'ostéosarcome de rat. En effet, outre l'utilisation de DCs dites « classiques », l'équipe de Régis Josien a récemment mis en évidence une puissante activité cytotoxique directe d'une sous-population de DC issues du tissu splénique de rat contre des lignées tumorales *in vitro* mais pas contre des cellules normales. L'influence de ces cellules dendritiques CD4⁺ pourrait alors être évaluée sur la progression tumorale dans un modèle d'ostéosarcome initialement radio-induit chez le rat, transplantable et dont l'évolution clinique est transposable à celle observée chez l'homme.

Introduction à la première partie.

Dans les conditions physiologiques, la succession des phases d'apposition et de résorption contribue au remodelage du tissu osseux. Il s'instaure ainsi un équilibre fragile, entre la formation et la dégradation de l'os, régulé par une triade de molécules récemment découverte que sont OPG, RANK et RANKL. La dérégulation de l'expression d'un de ces facteurs aboutit à un déséquilibre entre ces phases et contribue au développement de pathologies osseuses. Parmi les pathologies présentant un défaut de remodelage osseux, les tumeurs osseuses primitives constituent un ensemble d'affections malignes associées au développement de plages ostéolytiques. Cependant, les données concernant l'implication de la triade dans les pathologies ostéolytiques tumorales primaires restent rares.

L'amélioration des connaissances des activités biologiques et des mécanismes par lesquels les acteurs de la triade régulent l'enchaînement des phases d'apposition et de résorption est par conséquent une étape clé, nécessaire au développement de nouvelles orientations de recherche et à l'élaboration de nouveaux protocoles thérapeutiques. Ainsi, nous avons étudié dans un premier temps, l'activité biologique de l'OPG et de RANKL dans des ostéoclastes, en utilisant un modèle de culture d'ostéoclastes purifiés de lapereaux. Ce modèle de culture primaire développé au sein du laboratoire présente des conditions proches de l'état physiologique, nécessaires pour l'obtention d'une population d'ostéoclastes purifiés et matures en nombre suffisant pour l'analyse des activités biologiques de l'OPG et de RANKL (articles I et II). Cependant, la rareté des outils biologiques chez le lapin nous a imposé l'utilisation d'un autre modèle ostéoclastique (souris) afin de compléter les données recueillies chez le lapin. Ainsi, les articles III et IV de cette première partie rapportent les travaux réalisés sur la lignée de précurseurs macrophagiques murins RAW264.7 pour l'étude

de l'activité biologique ainsi que les mécanismes par lesquels l'OPG et RANKL exercent leurs effets (articles III et IV).

Article I.

Les cystéine-protéases et les matrix-métalloprotéinases (MMPs) sont des protéases majeures impliquées dans la dégradation des composants organiques de la matrice osseuse. L'ostéoprotégérine (OPG) est un récepteur leurre sécrété par les ostéoblastes qui inhibe la différenciation et l'activation des ostéoclastes. Cette étude porte sur les effets directs de l'OPG humaine sur l'expression des principaux acteurs de la résorption osseuse : Cathepsine K, MMP-9, MMP-2, et les Tissue Inhibitors of Metallo-Proteinases (TIMP-1 et TIMP-2) par les ostéoclastes purifiés de lapereaux. Les résultats de ce travail mettent en évidence une inhibition de l'expression de deux marqueurs ostéoclastiques dont la tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) et la Cathepsine K par l'OPG humaine (hOPG) à 100 ng/ml, alors que l'expression de la MMP-9 est augmentée pour la même concentration d'OPG. L'activité des MMPs est analysée par zymographie sur un substrat de collagène dénaturé (gélatine). Cette technique a permis de révéler une stimulation de l'activité de la pro-MMP-9 et de la MMP-2 en présence de 100ng/ml de hOPG. En parallèle, une augmentation de l'expression du TIMP-1 par l'hOPG a également été mise en évidence, alors que le niveau transcriptionnel du TIMP-2 n'était pas modifié. En résumé, ces résultats constituent la première mise en évidence de la capacité de l'hOPG à réguler de façon différentielle l'expression de protéases majeures de la résorption osseuse dans une culture d'ostéoclastes purifiés, mais surtout, il s'agit de la première démonstration d'un effet direct de l'OPG sur la régulation de l'activité protéasique ostéoclastique. Ainsi, l'OPG ne doit plus être considérée comme simple récepteur antagoniste de l'interaction RANKL-RANK mais comme une cytokine à part entière.



ACADEMIC
PRESS

Biochemical and Biophysical Research Communications 293 (2002) 38–44

BBRC

www.academicpress.com

Osteoprotegerin differentially regulates protease expression in osteoclast cultures

Y. Wittrant,^a S. Couillaud,^a S. Theoleyre,^a C. Dunstan,^b D. Heymann,^a and F. R  dini^{a,*}

^a *Faculté de Médecine, Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse, 1 rue Gaston Veil, 44035 Nantes cedex 01, France*

^b *Amgen Inc., One Amgen Center Drive, Thousand Oaks, CA 91320, USA*

Received 14 March 2002

Abstract

Cysteine proteases and matrix metalloproteinases (MMPs) are important factors in the degradation of organic matrix components of bone. Osteoprotegerin (OPG) is an osteoblast-secreted decoy receptor that inhibits osteoclast differentiation and activation. This study investigated the direct effects of human OPG on cathepsin K, MMP-9, MMP-2, and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP1 and TIMP2) expressed by purified rabbit osteoclasts. The expression of two osteoclast markers, namely tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and cathepsin K, was inhibited by 100 ng/mL hOPG, whereas MMP-9 expression was enhanced. Gelatinase activities were measured using a zymographic assay, and hOPG was shown to enhance both pro-MMP-9 and MMP-2 activities. Concomitantly, TIMP1 expression was greatly stimulated by hOPG, whereas TIMP2 mRNA levels were not modulated. Overall, these results show that hOPG regulates the proteases produced by purified osteoclasts differentially, producing a marked inhibitory effect on the expression of cathepsin K, the main enzyme involved in bone resorption.    2002 Elsevier Science (USA). All rights reserved.

Keywords: Osteoclast; Bone resorption; Osteoprotegerin; Metalloproteinases; Tissue inhibitors of metalloproteinases; Cathepsin K

Osteoclasts are large multinucleated cells originating from bone marrow and are involved in bone demineralization and resorption. In normal bone physiology, resorption, matrix synthesis, and mineralization are associated processes that appear to be dysregulated in various metabolic bone diseases, resulting in excessive bone loss (osteoporosis, osteolytic bone tumours) or excessive bone formation (osteopetrosis, osteosclerosis).

The key substances regulating osteoclast differentiation and activation have recently been identified. Receptor activator of NF-  B ligand (RANKL), a member of the tumour necrosis factor (TNF) cytokine family, is a downstream regulator of osteoclast formation and activation, inducing many hormones and cytokines to produce osteoresorptive effects [1]. Within the bone system, RANKL is expressed on osteoblast lineage cells and exerts its biological effect by binding to the RANK receptor at the surface of osteoclasts [2]. The third

protagonist, osteoprotegerin (OPG), is produced by osteoblastic/stromal cells and acts as a decoy receptor for RANKL, preventing it from binding to and activating RANK on the osteoclast surface [3]. Thus, the biological effects of OPG on bone cells include the inhibition of terminal stages of osteoclast differentiation, suppression of the activation of mature osteoclasts, and induction of apoptosis.

Once activated, the osteoclasts secrete both protons and proteinases at their attachment site, resulting in dissolution of bone mineral and degradation of the matrix (mainly composed of type I collagen) [4]. Several studies indicate that the proteinases involved in solubilization of this collagenous matrix belong to the cysteine proteinase and matrix metalloproteinase (MMP) groups [5,6]. The identity of the specific MMPs responsible for collagen degradation in the resorption zone is unknown, although some MMPs have been immunolocalized in this resorption compartment [7]. It seems that MMP-9 at least, which is known to be the most abundant gelatinolytic MMP in osteoclasts, is not rate-limiting [8]. The zinc-dependent endopeptidase activities of the

* Corresponding author. Fax: +33-2-40-41-28-60.

E-mail address: francoise.redini@sante.univ-nantes.fr (F. Rédini).

MMP-9 and -2 are inhibited specifically by their intrinsic inhibitors called tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP)-1 and -2, respectively [9].

In contrast, there is increasing evidence that the cysteine proteinase crucial for matrix solubilization in the resorption compartment is cathepsin K (Cat K) [10]. This enzyme has rate-limiting activity for bone resorption, as evidenced by the deficiency induced in patients bearing a mutation in the cathepsin K gene (pseudosclerosis) as well as in cathepsin K knockout mice [11] and tissue cultures were performed in the presence of cathepsin K anti-sense oligonucleotides [12]. The importance of cathepsin K in collagen degradation is related to its ability to cleave the native triple helix of collagen in multiple sites [13]. The triple helix rapidly unwinds and becomes susceptible to any proteinase showing gelatinolytic activity. Moreover, the gelatinolytic activity of cathepsin K is extremely high as compared to that of other cysteine proteinases [14].

These observations indicate that cathepsin K and MMPs are key proteinases in the resorption process, which led us to study the effects of OPG on the expression and activities of these enzymes in primary cultures of rabbit osteoclasts, together with TIMP-1 and -2 expression.

Materials and methods

Reagents. Recombinant human osteoprotegerin/Fc chimera (rhOPG-Fc) was kindly provided by Amgen (Dr. C. Dunstan, USA). α -Minimal essential medium (α -MEM), foetal bovine serum, antibiotic mixture, phosphate-buffered saline (PBS), MMLV-RT, DNase I, and Trizol reagent were purchased from Invitrogen (Eragny, France), and Taq polymerase from Promega (Charbonnières, France). Pronase E was purchased from Sigma (St. Quentin Fallavier, France).

Cell culture. Neonatal rabbit bone cells were isolated using a previously reported method [15]. Briefly, 11-day-old rabbits were killed by cervical dislocation, and their long bones were isolated and freed from soft tissue, minced with scissors, and placed in vortex in 20 mL α -MEM medium for 30 s. After sedimentation for 2 min, the cell suspension was harvested (repeated twice). The cells were washed in α -MEM in a centrifuge (400 rpm for 3 min) and resuspended in α -MEM supplemented with 10% foetal bovine serum and antibiotic mixture (100 U/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin). The cells were then seeded into 75 or 25 cm² flasks at a density of 2.5×10^5 cell/cm², and the cultures were maintained in a humidified 95% air, 5% CO₂ atmosphere at 37 °C for 3 days.

Purified osteoclasts (purity of 95%) were obtained after total rabbit bone cells (cultured three days in complete medium) were washed with serum-free α -MEM and treated with 0.001% pronase E and 0.02% EDTA in PBS for approximately 5 min. After purification, the osteoclasts were washed and cultured in serum-free α -MEM for 24 h in the absence or presence of hOPG (10, 50, and 100 ng/mL). The purity and cell morphology of isolated mature osteoclasts were characterized after May Grünwald Giemsa (MGG) staining and studied for Tartrate-Resistant Acid Phosphatase (TRAP) activity (data not shown).

Measurement of matrix metalloproteinase activities. Matrix metalloproteinase activities were determined by zymography as previously reported [16]. After the culture period (24 h in serum-free α -MEM in the presence or absence of OPG), MMP activities were detected in cell

culture supernatants. Electrophoresis gel was composed of 10% polyacrylamide gel containing 0.2% gelatin. Proteinase activity was apparent as unstained regions. The stained polyacrylamide gels were observed with a video camera that allowed transfer to software for image processing (ImageQuant software program) and isolation of migration bands. Gelatinase activity was expressed as a percentage (shades of grey compared to the control). The same experiment was performed by adding 10 μ M EDTA, a chelating agent of bivalent ions, to inhibit MMP activities. In addition, as protein levels were not modified by the different treatments, the same volume of supernatant was assayed in all experiments, allowing strict comparison of the results.

RNA extraction. Rabbit osteoclasts were lysed with Trizol reagent. Extraction was performed after addition of 0.1 vol chloroform followed by centrifugation. RNA was recovered from the aqueous phase by precipitation with 0.5 vol isopropyl alcohol. Total RNA was quantified by measuring the OD₂₆₀, and integrity was checked by 1% agarose/formaldehyde gel electrophoresis. RNA samples were then treated with DNase I (0.1 U/ μ L) before the reverse-transcription step, to exclude the possibility of interference with contaminating genomic DNA.

Expression of MMPs, TRAP, Cat K, and TIMPs by semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). First-strand cDNA was synthesized by incubating 5 μ g of total RNA with 50 μ L of RT mixture [containing 0.5 μ g oligo-dT, $5 \times$ RT buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 10 mM MnCl₂, 500 mM KCl, and 40 mM DTT), 5 μ L of 0.1 M DTT, 2.5 μ L of 10 mM dNTP mix, 400 U MMLV-RT, and 0.5 μ L of 40 U/ μ L RNasein] at 42 °C for 30 min, 5 min at 95 °C, and then ice-chilled for 5 min. Two microlitres of the RT reaction mixture were subjected to PCR using upstream and downstream primers (30 pmoles each, Table 1), 5 μ L of $10 \times$ PCR buffer (100 mM Tris-HCl, pH 9, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, and 1% Triton X-100), 3 μ L of 25 mM MgCl₂, 2 μ L of 10 mM dNTP, 31.7 μ L of DTT (1.25 μ L of DTT 0.1 M with 1.411 mL of RNase-free water), and 0.25 μ L of 5 U/ μ L Taq polymerase.

Analysis of PCR products. PCR products were analysed in 1% agarose gels, stained with ethidium bromide, and photographed. Band densities were measured using the ImageQuant computer software program. Relative expression of the different genes (TRAP, Cat K, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, and TIMP-2) was calculated as the ratio to 18S signal. After the number of PCR cycles was increased, a plot was done for each sample, and the cycle values corresponding to the linear part of the amplification curve were determined (Table 1) and used to quantify the messages versus the 18S signal determined in the same way.

Three separate experiments (4 rabbits each) were performed for each gene studied. A representative experiment is shown in Results section.

Results

A semi-quantitative RT-PCR method was used to compare the message levels of each gene of interest (TRAP, Cat K, MMP-2, MMP-9, TIMP1, and TIMP2) between OPG-treated osteoclasts and control cultures. Data were normalized versus the 18S mRNA level of each sample, on the assumption that the message of this conventionally accepted house-keeping gene was relatively constant on a per cell basis. It was also determined that the amplification efficiency for each message was the same in control versus OPG-treated cultures (data not shown). A serial number of cycles were performed to establish the amplification linear portion of the curve for each gene,

Table 1

Oligonucleotide primers used for RT-PCR. Primers are represented in a 5' to 3' orientation, with that for the coding strand (+) and the non-coding strand (–). The location of each primer within the cDNA sequence is indicated, together with the product size generated by reverse transcription and PCR amplification of the authentic mRNA

Molecule	Primers	Strand	Location	Size (bp)	Conditions (T_m ; cycle number)
18S	TCAAGAACGAAAGTCGGAGGTTTCG	+	1025–1048	462	62 °C
	TTATTGCTCAATCTCGGGTGGCTG	–	1487–1464		26 cycles
TRAP	AAGGAGGACTACGTGCTCGTGCCGGC	+	621–647	189	61 °C
	TCCACTCAGCACGTAGCCACGCCGTT	–	808–786		28 cycles
Cat K	AGCTGGGGAGAAAGCTGGGGAAACAAAG	+	913–940	244	68 °C
	AGGCACAAACAATGGGGAAACCAACA	–	1157–1130		26 cycles
MMP-2	AAGGCCAAGTGGTCCGTGTGAA	+	603–624	370	49 °C
	AACAGTGGACATGGCGGTCTCAG	–	973–951		28 cycles
MMP-9	TGGCCGGCCACTGTGCGCCCCTCCGAG	+	1416–1442	662	49 °C
	CACTAGGTTACCTCGTTCGGGTACT	–	2078–2052		28 cycles
TIMP1	GCAACTCCGACCTTGTCATC	+	61–80	413	58 °C
	AGCGTAGGTTCTTGGTGAAGC	–	474–455		28 cycles
TIMP2	GATCCAGTATGAGATCAAGC	+	78–97	126	61 °C
	ATACTCCTTCTTGCCCTCCAC	–	204–184		28 cycles

and the levels of TRAP, TIMP1, TIMP2, MMP-2, and MMP-9 messages were quantitated for 28 cycles and Cat K for 26 cycles (Table 1), before calculation of the ratio to the 18S signal determined at 26 cycles.

hOPG decreases TRAP and Cathepsin K mRNA expression in purified cultured rabbit osteoclasts

Expressions of TRAP and Cat K mRNA were studied as markers of bone resorption, and comparisons were made between control and OPG-treated osteoclast cultures. Typical results are shown in Fig. 1 (one experiment out of four), which indicates that the levels of both TRAP and Cat K messages (studied respectively at 28 and 26 cycles) were down-regulated in a dose-dependent manner in the presence of OPG. In both cases, 10 ng/mL of OPG stimulated marker expression, while OPG 50 ng/mL had no effect, and 100 ng/mL decreased TRAP and Cat K message levels significantly (respectively: +43%, –14%, and –32% for TRAP and +27%, –9%, and –41% for Cat K expressions; Fig. 1B). This is the first evidence for a direct inhibitory effect of hOPG on cathepsin K mRNA expression in osteoclast cultures.

MMP-9 expression and pro-MMP-9 activity are stimulated by hOPG in rabbit osteoclasts

In addition to cathepsin K expression, which is highly involved in the control of bone resorption, our experiments investigated the effects of hOPG on MMP expression and activities. Concerning MMP expression, no significant signal could be detected for an MMP-2 message in purified osteoclast cultures, although MMP-

9 was highly expressed at the mRNA level (Fig. 2A). These results correlate with data obtained for protease activity. Zymography experiments showed that conditioned media from purified rabbit osteoclasts contained gelatinase activities, i.e., a major band occurred at 92 kDa and a minor, barely detectable at 62 kDa. Data in the literature indicate that the main 92 kDa band corresponds to gelatinase B (known as MMP-9 or type IV collagenase in its latent form), while the 62 kDa band is associated with gelatinase A, corresponding to MMP-2 in its active form.

The results shown in Figs. 2A and B demonstrate a dose-dependent enhancing effect of hOPG on MMP-9 expression and pro-MMP-9 activity. The level of the MMP-9 signal in RT-PCR experiments was increased by 25% with the highest concentration used (Fig. 2A), whereas the corresponding protease activity evidenced by the 92 kDa band in zymography was also highly stimulated by 100 ng/mL hOPG (Fig. 2B). The zymogram also revealed the weak intensification of the 62 kDa band, corresponding to the active form of MMP-2, in the presence of 100 ng/mL of hOPG.

Our results clearly show a differential effect of hOPG on MMP-9 activities and expression, on the one hand, and on cathepsin K expression, on the other hand.

hOPG regulates TIMP1 and TIMP2 expression differentially in rabbit purified osteoclasts

In an attempt to compare the effect of hOPG on the expression of metalloproteinases and their respective inhibitors in osteoclast cultures, our studies were extended to TIMP1 and TIMP2 expression. The results

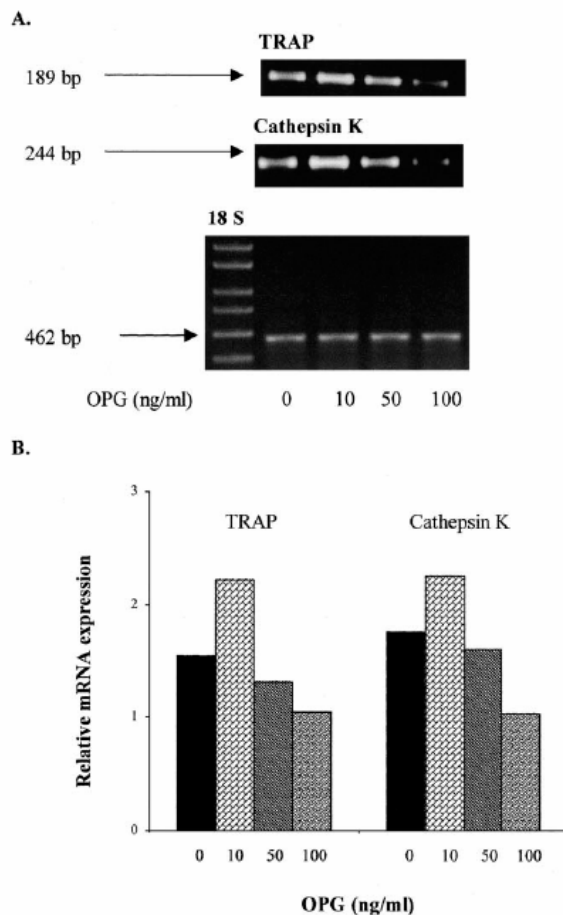


Fig. 1. hOPG dose-dependently inhibits cathepsin K and TRAP mRNA expression in rabbit purified osteoclasts. (A) A representative RT-PCR analysis of cathepsin K and TRAP message levels in the presence or not of 10, 50, and 100 ng/mL hOPG during the last 24 h of osteoclast culture. The relative mRNA levels of cathepsin K and TRAP were determined at 26 and 28 cycles, which correspond to the linear part of the respective amplification curve, and normalized to the 18S message (26 cycles). (B) The relative amounts of each signal corresponding to one representative study (out of three) were determined by scanning the bands and normalized to the 18S message level.

shown in Fig. 3 indicate that hOPG induced differential regulation of TIMP1 and TIMP2 message levels (both studied at 28 cycles). TIMP1 mRNA expression was enhanced with the highest hOPG concentration studied (100 ng/mL, +69%), whereas no significant effect was detected on a TIMP2 message level, regardless of the hOPG concentration used.

Discussion

Proteinases act not only as solubilizers of bone matrix, but also as regulators of the initiation of bone re-

sorption and associated bone formation. This has been demonstrated through the use of specific inhibitors that prevent bone resorption by inducing inhibition of extracellular matrix degradation in resorption lacunae. The key proteinases involved in the bone resorption process are cathepsin K and MMPs [15]. The data presented here provide the first evidence that hOPG exerts a differential effect on MMP and cathepsin K expression in purified cultured osteoclasts.

The conditioned media of purified osteoclast cultures showed a major metalloproteinase activity, which was identified in zymography experiments as a single band at 92 kDa corresponding to the latent form of MMP-9. No detectable activity was evidenced for MMP-2, although this enzyme can be clearly observed in total bone cell cultures [16]. In these circumstances, it is tempting to suppose that the MMP-2 activity is associated with the osteoblast/stromal cells. The MMP-9 activity in the supernatants of purified osteoclasts represents the latent form of the protease that may be activated in the physiological environment of cells, particularly by plasmin or stromelysin [17,18], which can be produced by bone cells [19,20].

The present study shows that hOPG induces a differential effect on proteases produced by purified osteoclasts through stimulation of MMP-9 activity and expression and inhibition of cathepsin K expression. Both enzymes play different roles relative to the mechanisms involved in bone resorption. MMP-9 and collagenase are essential for the initiation of bone resorption, whereas cathepsin K seems to be predominantly involved in matrix solubilization [15]. The decreased cathepsin K expression observed in our osteoclast cultures in the presence of hOPG may have been related to the strong inhibitory effect already described on osteoclastogenesis [21]. A previous report from Hakeda et al. [22] showed that OPG (30 ng/mL) reduced or disrupted the cytoskeletal structure of osteoclasts (which is correlated with bone resorption), but had no impact on mRNA cathepsin K levels. As the concentration of rhOPG used by Hakeda et al. was 30 ng/mL, our results are consistent with theirs. In our study, 50 ng/mL hOPG had no significant effect on mRNA cathepsin K levels, whereas 100 ng/mL increased those levels considerably. Therefore, our experiments indicate that hOPG decreases the *in vitro* expression of cathepsin K, the primary enzyme active in the osteoclastic bone resorption process. Although it would be quite interesting to measure the effect of hOPG on the cathepsin K activity released by osteoclasts, our culture conditions did not allow the quantification of cathepsin K activity in the presence of Z-Leu-Arg-NH-Mec as synthetic substrate.

Other than the effect of hOPG on cathepsin K expression, nothing is known about the regulation of MMP and TIMP mRNA expression by this factor. The stimulation of MMP-9 expression and activity and the

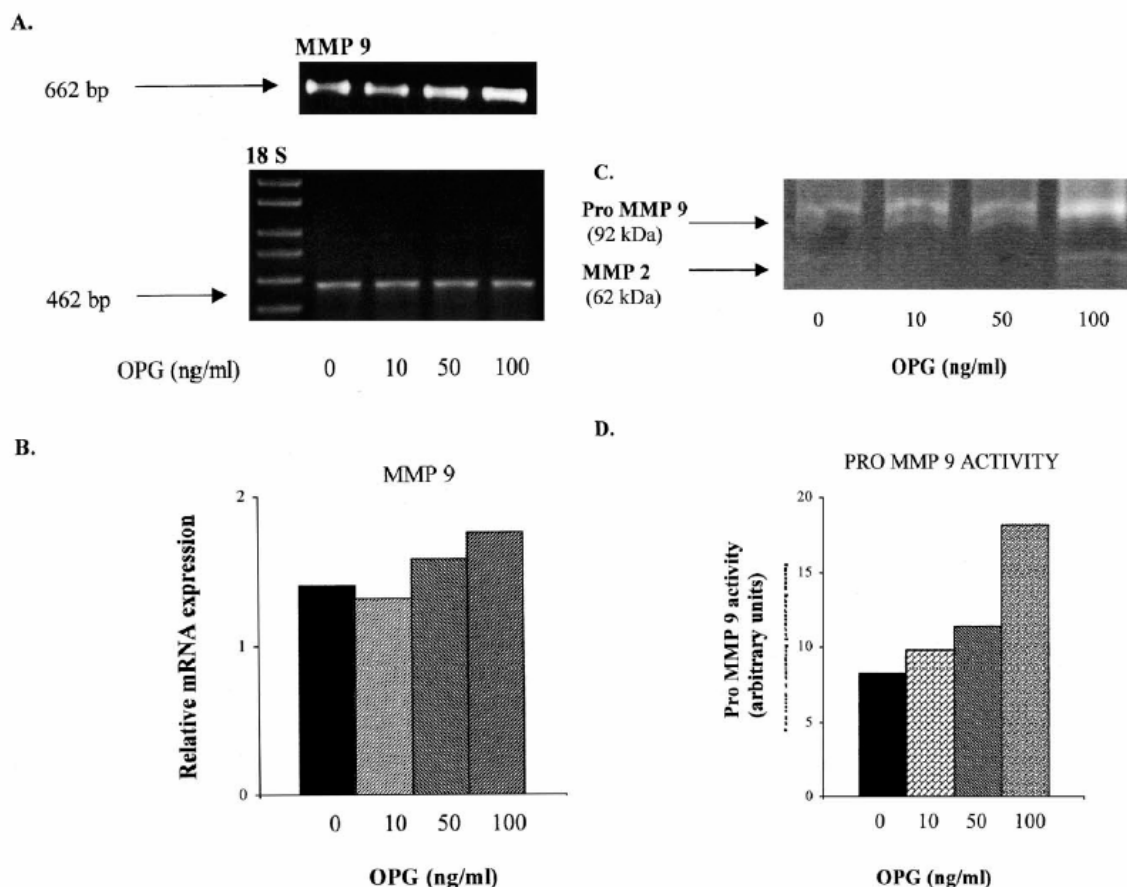


Fig. 2. hOPG Stimulates MMP-9 expression and MMP-2 and pro-MMP-9 activities in purified osteoclasts. (A) A representative RT-PCR analysis of MMP-9 message levels in the presence or not of 10, 50, and 100 ng/mL hOPG during the last 24 h of osteoclast culture. The relative mRNA levels of MMP-9 were determined at 28 cycles and normalized to the 18S message (26 cycles). The relative amounts of each signal corresponding to one representative study (out of three) were determined by scanning the bands and normalized to the 18S message level (B). (C) Metalloproteinase activities were determined using a zymographic assay. Same volumes of the culture supernatant were used for metalloproteinase activity measurements with an electrophoresis gel composed of 10% polyacrylamide gel containing 0.2% gelatin. Pro-MMP-9 and MMP-2 activities were detected, respectively, at 92 and 62 kDa. The bands were scanned and the intensity is represented in the histogram as arbitrary units (D).

induction of MMP-2 activity in the presence of 100 ng/mL hOPG are quite surprising, considering the known inhibitory effect of hOPG on bone resorption. MMPs are not only involved in different bone resorption steps, but are also required for the resorption of non-mineralized collagen. In fact, inhibition of MMP activity completely prevented the degradation of demineralized bone collagen left by osteoclasts [23]. Moreover, MMP-9 is involved in the invasive activity of osteoclasts [24]. The effects of MMP-9 deficiency on invasion occur without causing any apparent effect on osteoclast resorptive activity itself. The role of MMP-9 in invasion rather than in resorption is consistent with its early expression during differentiation of osteoclast-like cells [25]. It has been clearly established that MMPs expressed by osteoclasts themselves are responsible for the

migratory and attachment activities of mature osteoclasts through the dissolution of osteoid matrix components, but are not responsible for the pit formation itself [26]. The upregulation of MMPs by hOPG observed in our study may therefore modulate the initiation of bone resorption.

However, the activity of MMPs measured *in vitro* does not reflect the *in vivo* situation in which regulation occurs through the presence of natural inhibitors. *In vivo*, the balance between MMP and TIMP activities is believed to determine the rate of matrix degradation. TIMP1 and TIMP2 have been detected in isolated osteoclasts [18,27], and they have been shown to inhibit osteoclastic bone resorption [28]. These observations led us to study the influence of hOPG on both MMP and TIMP mRNA expression. Our results indicate that

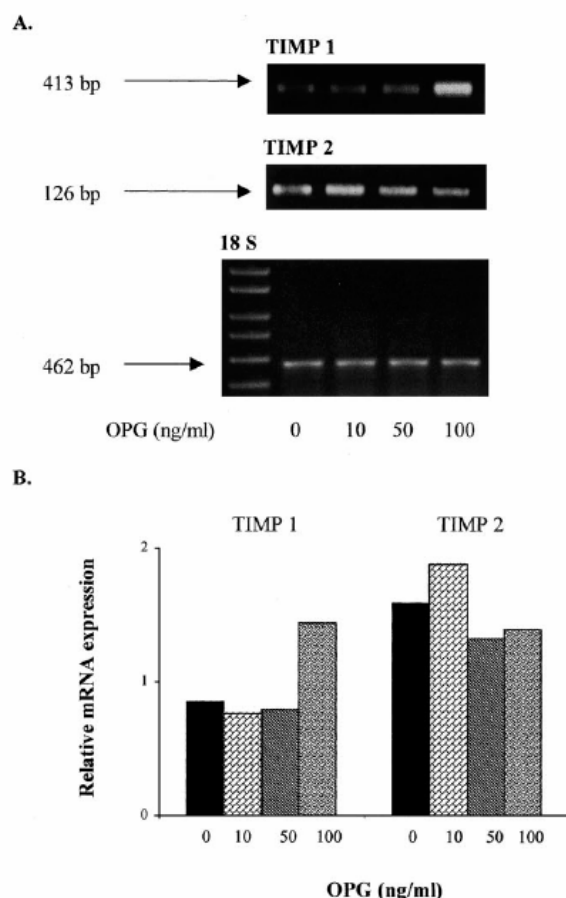


Fig. 3. hOPG increases TIMP1 expression in rabbit purified osteoclasts. (A) A representative RT-PCR analysis of TIMP1 and TIMP2 message levels in the presence or not of 10, 50, and 100 ng/mL hOPG during the last 24 h of osteoclast culture. The relative mRNA levels of TIMP1 and TIMP2 were determined at 28 cycles each, and normalized to the 18S message (26 cycles). (B) The relative amounts of each signal corresponding to one representative study (out of three) were determined by scanning the bands and normalized to the 18S message level.

hOPG stimulated TIMP1 mRNA expression highly, but had no significant effect on TIMP2 expression. Taken together, the effects of hOPG on MMP and TIMP expression suggest that the balance between MMPs and TIMPs could be equilibrated in the presence of this factor. Increased TIMP1 expression could counteract the stimulatory effect of hOPG on MMP expression and activity. As TIMP activities cannot be determined at the present time, it is difficult to determine the precise overall effect of hOPG on net proteolytic activity. The upregulation of TIMP1 expression by hOPG may also modulate pro-MMP-9 activation. TIMP-1 has been shown to form a specific complex with pro-MMP-9 [29], but the role of this complex remains unclear. By analogy with the TIMP2/MMP-2 complex, it is possible that TIMP1 plays a role in pro-MMP-9 activation [30].

Previous experiments have determined that RANKL has an enhancing effect on cathepsin K expression in osteoclasts [31], which suggests that RANKL enhances bone resorption, at least in part, by inducing cathepsin K gene expression. The present study showed that hOPG (100 ng/mL) exerts an inhibitory effect on cathepsin K expression in purified osteoclasts. A direct effect of hOPG on purified osteoclasts was also observed, which related not only to cathepsin K expression, as previously reported [22], but also to MMP and TIMP mRNA expression and MMP activity.

Earlier studies conducted in our laboratory found a stimulatory effect of RANKL on MMP-2 and -9 activities in the same cellular model (not shown). Together with the present results, this suggests that OPG and RANKL have a differential effect on cathepsin K expression directly related to bone resorption, whereas MMP activities seem to be stimulated similarly by both factors. Cathepsin K is clearly involved in bone resorption, whereas MMPs are likely to play different roles in bone cell metabolism. The regulation of these proteases by OPG and RANKL appears to be complex, and further experiments are needed to improve our understanding of the molecular mechanisms involved in osteoclast functions.

Acknowledgments

This work has been supported by a Contrat de Recherche Stratégique (CreS) INSERM no 4CR06F and the Loire Atlantique Committee of the Ligue Nationale Contre le Cancer.

References

- [1] D.L. Lacey, E. Timms, H.-L. Tan, M.J. Kelley, C.R. Dunstan, T. Burgess, R. Elliott, A. Colombero, G. Elliott, S. Scully, H. Hsu, J. Sullivan, N. Hawkins, E. Davy, C. Capparelli, A. Eli, Y.-X. Qian, S. Kaufman, I. Sarosi, V. Shalhoub, G. Senaldi, J. Guo, J. Delaney, W.J. Boyle, Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation, *Cell* 93 (1998) 165–176.
- [2] H. Hsu, D.L. Lacey, C.R. Dunstan, I. Solovyev, A. Colombero, E. Timms, H.-L. Tan, G. Elliott, M.J. Kelley, I. Sarosi, L. Wang, X.-Z. Xia, R. Elliott, L. Chiu, T. Black, S. Scully, C. Capparelli, S. Morony, G. Shimamoto, M.B. Bass, W.J. Boyle, Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 3540–3545.
- [3] W.S. Simonet, D.L. Lacey, C.R. Dunstan, M. Kelley, M.-S. Chang, R. Luthy, H.Q. Nguyen, S. Wooden, L. Bennett, T. Boone, G. Shimamoto, M. DeRose, R. Elliott, A. Colombero, H.-L. Tan, G. Trail, J. Sullivan, E. Davy, N. Bucay, L. Renshaw-Gegg, T.M. Hughes, D. Hill, W. Pattison, P. Campbell, S. Sander, G. Van, J. Tarpley, P. Derby, R. Lee, Amgen EST Program, W.J. Boyle, Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density, *Cell* 89 (1997) 309–319.
- [4] H.K. Vaananen, Mechanism of bone turnover, *Ann. Med.* 25 (1993) 353–359.

- [5] J.M. Delaissé, G. Vaes, Mechanism of mineral solubilization and matrix degradation in osteoclastic bone resorption, in: B.R. Rifkin, C.V. Gay (Eds.), *Biology and Physiology of the Osteoclast*, CRC Press, Boca Raton, 1992, pp. 289–314.
- [6] V. Everts, J.M. Delaissé, W. Korper, A. Niehof, G. Vaes, W. Beertsen, Degradation of collagen in the bone-resorbing compartment underlying the osteoclast involves both cysteine-proteinases and matrix metalloproteinases, *J. Cell. Physiol.* 150 (1992) 221–231.
- [7] Y. Okada, K. Naka, K. Kawamura, T. Matsumoto, I. Nakanishi, N. Fujimoto, H. Sato, M. Seiki, Localization of matrix-metalloproteinase 9 (92-kilodalton gelatinase/type IV collagenase = gelatinase B) in osteoclasts: Implications for bone resorption, *Lab. Invest.* 72 (1995) 311–322.
- [8] K. Tezuka, K. Nemoto, Y. Tezuka, T. Sato, Y. Ikeda, M. Kobori, H. Kawashima, H. Eguchi, Y. Hakeda, M. Kumegawa, Identification of matrix metalloproteinase 9 in rabbit osteoclasts, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 15006–15009.
- [9] D.E. Gomez, D.F. Alonso, H. Yoshiji, U.P. Thorgeirsson, Tissue inhibitors of metalloproteinases: Structure regulation and biological functions, *Eur. J. Cell Biol.* 7 (1997) 111–122.
- [10] K. Tezuka, Y. Tezuka, A. Maejima, T. Sato, K. Nemoto, H. Kamioka, Y. Hakeda, M. Kumegawa, Molecular cloning of a possible cysteine proteinase predominantly expressed in osteoclasts, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 1106–1109.
- [11] R.A. Dodds, F. Cristiano, J. Field, R. Kapadia, X. Liang, C. Debouck, I. Kola, M. Gowen, Cathepsin K knockout mice develop osteopetrosis due to lack of full function in their osteoclasts, *Bone* 23 (1988) S164.
- [12] T. Inui, O. Ishibashi, T. Inaoka, Y. Origane, M. Kumegawa, T. Kobuko, T. Yamamura, Cathepsin K antisense oligodeoxynucleotide inhibits osteoclastic bone resorption, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 8109–8112.
- [13] P. Garnero, O. Borel, I. Byrjalsen, M. Ferreras, F.H. Drake, M.S. McQueney, N.T. Foged, P.D. Delmas, J.M. Delaissé, The collagenolytic activity of cathepsin K is unique amongst mammalian proteinases, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 32347–32352.
- [14] D. Brömme, K. Okamoto, B.B. Wang, S. Biroc, Human cathepsin O2, a matrix protein-degrading cysteine-protease expressed in osteoclasts. Functional expression of human cathepsin O2 in *Spodoptera frugiperda* and characterization of the enzyme, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 2126–2132.
- [15] J.-M. Delaissé, M.T. Engsig, V. Everts, M. del Carmen Ovejero, M. Ferreras, L. Lund, T.H. Vu, Z. Werb, B. Winding, A. Lochter, M.A. Karsdal, T. Troen, T. Kirkegaard, T. Lenhard, A.-M. Heegaard, L. Neff, R. Baron, N.T. Foged, Proteinases in bone resorption: Obvious and less obvious roles, *Clin. Chim. Acta* 291 (2000) 223–234.
- [16] A.V. Rousselle, C. Damiens, Y. Fortun, N. Passuti, M. Padriens, D. Heymann, Human growth hormone stimulates proteinase activities of rabbit bone cells via IGF-I, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268 (2000) 875–881.
- [17] P. Carmeliet, L. Moons, R. Lijnen, M. Baes, V. Lemaître, P. Tipping, A. Drew, Y. Eeckhout, S. Shapiro, F. Lupu, D. Collen, Urokinase-generated plasmin activates matrix metalloproteinases during aneurysm formation, *Nat. Genet.* 17 (1997) 439–444.
- [18] N. Ramos-DeSimone, E. Hahn-Dantona, J. Sipley, H. Nagase, D.L. French, J.-P. Quigley, Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) via a converging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 13066–13076.
- [19] G. Dew, G. Murphy, H. Stanton, R. Vallon, P. Angel, J.J. Reynolds, R.M. Hembry, Localisation of matrix metalloproteinases and TIMP-2 in resorbing mouse bone, *Cell Tissue Res.* 299 (2000) 385–394.
- [20] Y. Eeckhout, G. Vaes, Further studies on the activation of procollagenase the latent precursor of bone collagenase. Effects of lysosomal cathepsin B plasmin and kallikrein and spontaneous activation, *Biochem. J.* 166 (1977) 21–31.
- [21] E. Tsuda, M. Goto, S. Mochizuki, K. Yano, F. Kobayashi, T. Morigana, K. Higashino, Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 234 (1997) 137–142.
- [22] Y. Hakeda, Y. Kobayashi, K. Yamaguchi, H. Yasuda, E. Tsuda, K. Higashio, T. Miyata, M. Kumegawa, Osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) directly inhibits bone-resorbing activity of isolated mature osteoclasts, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251 (1998) 796–801.
- [23] V. Everts, J.-M. Delaissé, W. Korper, D.C. Jansen, W. Tigchelaar-Gutter, P. Saftig, W. Beertsen, The bone lining cell: Its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation, *J. Bone Min. Res.* 17 (2002) 77–90.
- [24] Q.J. Chen, L. Lund, T. Lenhard, M. Engsig, B. Winding, B. Therkildsen, A.C. Pedersen, D. Larsen, Z. Werb, N.T. Foged, J.-M. Delaissé, MMP-9 is a regulator of osteoclast recruitment as demonstrated by targeted mutagenesis, *Bone* 23 (1998) S548.
- [25] P. Reponen, C. Sahlberg, C. Munaut, I. Thesleff, K. Tryggvason, High expression of 92-kDa type IV collagenase (gelatinase B) in the osteoclast lineage during mouse development, *J. Cell. Biol.* 124 (1994) 1091–1102.
- [26] T. Sato, N.T. Foged, J.-M. Delaissé, The migration of purified osteoclasts through collagen is inhibited by matrix metalloproteinase inhibitors, *J. Bone Min. Res.* 13 (1998) 59–66.
- [27] P.A. Hill, G. Murphy, A.J. Docherty, R.M. Hembry, T.A. Millican, J.J. Reynolds, M.C. Meikle, The effects of selective inhibitors of matrix metalloproteinases (MMPs) on bone resorption and the identification of MMPs and TIMP-1 in isolated osteoclasts, *J. Cell Sci.* 107 (1994) 3055–3064.
- [28] P.A. Hill, J.J. Reynolds, M.C. Meikle, Inhibition of stimulated bone resorption in vitro by TIMP-1 and TIMP-2, *Biochim. Biophys. Acta* 1171 (1993) 71–74.
- [29] S.M. Wilhelm, I.E. Collier, B.L. Marmer, A.Z. Eisen, G.A. Grant, G.I. Goldberg, SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 17213–17221.
- [30] G.S. Butler, M.J. Butler, S.J. Atkinson, H. Will, T. Tamura, S.S. van Westrum, T. Crabbe, J. Clements, M.P. d'Ortho, G. Murphy, The TIMP2 membrane type I metalloproteinase receptor regulates the concentration and efficient activation of progelatinase A. A kinetic study, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 871–880.
- [31] S. Corisdeo, M. Gyda, M. Zaidi, B.S. Moonga, B.R. Troen, New insights into the regulation of cathepsin K gene expression by osteoprotegerin ligand, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285 (2001) 335–339.

Complément de discussion à l'article I.

Les protéinases agissent non seulement en tant qu'agents de solubilisation de la matrice osseuse, mais également en tant que régulateurs de l'équilibre résorption/apposition osseuse. Parmi les enzymes clé de ces mécanismes, la Cathepsine K et les MMPs sont les plus importantes. Les résultats présentés dans cet article mettent en évidence pour la première fois un effet direct et différentiel de l'hOPG sur l'expression de MMPs et de la Cathepsine K dans des cultures d'ostéoclastes purifiés de lapereaux, notamment par la stimulation de l'expression et de l'activité de la pro-MMP-9 et l'inhibition de l'expression de la Cathepsine K. Chacune des deux enzymes joue un rôle différent au sein de l'environnement osseux. La MMP-9 en particulier est essentielle pour l'initiation de la résorption, alors que la Cathepsine K est principalement impliquée dans la solubilisation de la matrice organique osseuse. Ainsi, l'inhibition de l'expression de la Cathepsine K pourrait être corrélée à l'effet inhibiteur de l'OPG sur l'ostéoclastogenèse. Dans une étude précédente, l'équipe d'Hakeda montre que l'hOPG à 30ng/ml est capable de désorganiser le cytosquelette de l'ostéoclaste, donc d'interférer avec la résorption osseuse, mais sans agir sur le niveau transcriptionnel de la Cathepsine K. Ces résultats concordent avec les nôtres, puisque dans notre étude l'hOPG à 50 ng/ml (contrairement à l'hOPG 100 ng/ml) n'a pas d'effet significatif sur l'expression de cette enzyme.

Par ailleurs, rien n'était connu de la régulation des MMPs et de leurs inhibiteurs naturels (les TIMPs) par l'OPG. La stimulation de l'expression et de l'activité de la proMMP-9 et l'induction de la MMP-2 en présence de hOPG à 100 ng/ml est contradictoire avec le rôle inhibiteur de l'OPG sur la résorption osseuse. Cependant, les MMPs ne sont pas seulement impliquées dans la dégradation de la matrice osseuse. En effet, la MMP-9 joue également un rôle dans l'activité invasive des ostéoclastes. Dong et coll. ont confirmé cette hypothèse par des expériences d'inactivation de gène, et démontré l'implication de la MMP-9 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 coll. (2005)]. Par conséquent, les MMPs 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 MMPs par l'hOPG pourrait être le reflet d'une régulation des mécanismes d'initiation de la résorption osseuse. Par ailleurs, l'étude de l'activité des MMPs *in vitro* par zymographie ne tient pas compte de la régulation de cette activité par la présence *in vivo* d'inhibiteurs naturels tels que les TIMPs. TIMP-1 et TIMP-2 sont exprimés par les ostéoclastes et inhibent la résorption osseuse. Nos résultats indiquent que l'hOPG stimule fortement l'expression de TIMP-1 sans affecter celle de TIMP-2. Ainsi, l'hOPG stimule à la fois l'expression de la MMP-9 et de son inhibiteur, cependant l'action de TIMP-1 restant difficile à déterminer (inhibition de l'activité MMP-9 et de l'activation de la proMMP-9), il n'est pour l'instant pas possible de préciser l'activité protéolytique nette de la MMP-9. La régulation de l'expression de ces protéases par OPG apparaît complexe et nécessite une étude plus approfondie.

Depuis la publication de cet article, deux équipes ont montré la possibilité d'une action directe de l'OPG sur l'activité cellulaire. En effet, l'équipe de Woo et coll. a mis en évidence l'expression d'OPG à la surface des précurseurs ostéoclastiques purifiés, la fixation de RANKL soluble à celle-ci, et suggéré un rôle direct de l'OPG dans la différenciation ostéoclastique [Woo et coll. (2002)]. Par ailleurs, dans autre modèle cellulaire, une étude récente montre que l'OPG est directement capable d'inhiber la prolifération, d'induire l'apoptose et d'augmenter l'activité de la MMP-9 dans des cultures primaires de cellules musculaires lisses de l'aorte [Moran et coll. (2005)] et confortent nos résultats sur le rôle actif de l'OPG, et non pas seulement celui de récepteur compétitif.

Néanmoins, cet article constitue la première mise en évidence de la capacité de l'hOPG à réguler de façon différentielle l'expression de protéases dans une culture d'ostéoclastes purifiés, mais cette étude montre avant tout, pour la première fois, un effet direct de l'OPG sur l'activité ostéoclastique suggérant la présence d'un récepteur pour cette cytokine à la surface de ces cellules.

Des résultats préliminaires au sein de notre laboratoire montrent que RANKL agit également directement pour moduler l'expression de ces protéinases mais cette fois, dans le sens d'une augmentation des paramètres de la résorption osseuse. Ces résultats sont présentés dans l'article suivant.

Article II.

Cette étude montre pour la première fois l'action directe de RANKL humain (hRANKL) sur l'expression et l'activité de protéases et de leurs inhibiteurs dans des cultures d'ostéoclastes de lapin. Ces résultats ont été obtenus par l'utilisation des techniques de RT-PCR semi-quantitative, de zymographie et de dosage fluorimétrique. Ce travail a permis de confirmer la fonction pro-résorptive de RANKL par l'augmentation de l'expression de marqueurs de la résorption ostéoclastique tels que l'enzyme Tartrate Resistant Acid Phosphatase (TRAP) et la Cathepsine K. En outre, RANKL stimule également l'activité pro-MMP-9 et à l'inverse de l'hOPG agit en synergie pour stimuler l'expression de la MMP-9 et diminuer celle de TIMP-1, permettant une augmentation du rapport MMP-9/TIMP-1.

Regulation of osteoclast protease expression by RANKL[☆]

Y. Wittrant, S. Theoleyre, S. Couillaud, C. Dunstan,¹ D. Heymann, and F. Rédini*

*Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives EE 99-01, Faculté de Médecine,
1 rue Gaston Veil, 44035 Nantes cedex 1, France*

Received 4 September 2003

Abstract

Receptor activator of NF-  B ligand (RANKL) is essential for osteoclast (OC) differentiation/activation and functions through its receptor RANK at the surface of the osteoclastic cells. This study investigated for the first time the direct effects of hRANKL on protease/protease inhibitor expressions and protease activities in purified rabbit osteoclast cultures, using semi-quantitative RT-PCR, gelatin zymography, and enzymatic assays. RANKL was shown to exert in vitro pro-resorptive effects by increasing osteoclast marker expressions (Tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) and cathepsin K), MMP-9 expression, and pro-MMP-9 activity and by diminishing TIMP-1 expression, leading to an up-regulation of the MMP-9/TIMP-1 ratio.

   2003 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: RANKL; Osteoclasts; Bone resorption; Metalloproteinase

Bone remodeling is a physiological process that involves the resorption of bone by osteoclasts and the synthesis of bone matrix by osteoblasts. Osteoclasts are specialized monocyte/macrophage family members that differentiate from hematopoietic precursors [1]. Recently, a new tumor necrosis factor-family molecule named Receptor activator of NF-  B ligand (RANKL) has been shown to both activate mature osteoclasts and mediate osteoclastogenesis in the presence of M-CSF [2,3]. RANKL is preferentially expressed on committed preosteoblastic cells, whereas its specific receptor RANK is expressed in hematopoietic osteoclast progenitors [4,5]. RANKL knockout mice have severe osteopetrosis and defective tooth eruption [6]. Thus, RANKL is the key osteoclast differentiation factor absolutely required for osteoclast development and bone modeling in vivo, and also functions as a survival factor for osteoclast precursors.

Proteinases play an important role in bone physiology not only because they are required for the solubilization of bone matrix, but also because they are key components of the mechanisms that determine where and when bone resorption will be initiated. Cysteine proteinases and matrix metalloproteinases (MMPs) have been identified as the main proteinases active in these processes. Among cysteine proteinases, cathepsin K plays an essential role in osteoclast-mediated degradation of bone organic matrix [7]. Knockout of the enzyme in mice, as well as lack of functional enzyme in the human pathological condition pycnodysostosis, results in osteopetrosis [8,9]. Among MMPs, MMP-9 is known as the most abundant gelatinolytic MMP in osteoclasts but is not rate limiting, since the resorbing activity of the osteoclasts in bone explants from MMP-9-null mice compares to that of wild-type mice [10]. MMP-9 was shown to be the main MMP involved in the invasive activity of osteoclasts [11]. The zinc-dependent endopeptidase activities of the MMP-9 and -2 are inhibited specifically by their intrinsic inhibitors called tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP)-1 and -2, respectively [12].

We previously demonstrated that osteoprotegerin (OPG) exerts differential effects on protease activities in osteoclast cultures [13], but a unique study reported the

^{  } Abbreviations: MMP, matrix metalloproteinase; OC, osteoclast; RANK, receptor activator of NF-  B; RANKL, RANK ligand; TRAP, tartrate resistant acid phosphatase; TIMP, tissue inhibitors of MMP.

* Corresponding author. Fax: +1-33-2-40-41-28-60.

E-mail address: francoise.redini@sante.univ-nantes.fr (F. Rédini).

¹ Amgen, One Amgen Center Drive, Thousand Oaks, CA 91320, USA.

effect of RANKL in mature osteoclasts by the stimulation of cathepsin K expression [14]. The aim of the present work was to extend this study to MMP-2 and -9 expression and activity, together with TIMP-1 and 2 expressions in purified osteoclasts.

Materials and methods

Cell culture. Rabbit bone cells were isolated and cultured on plastic surface as previously reported [13]. Purified osteoclasts (purity 95%) were obtained after washing the total rabbit bone cells (cultured three days in complete medium) with serum-free α -minimal essential medium (α -MEM, Invitrogen, Eragry, France) and treating with 0.001% pronase E and 0.02% EDTA in phosphate-buffered saline (PBS) for 2 min. The osteoclasts were then washed and cultured in serum-free α -MEM for 24 h in the absence or presence of RANKL (kindly provided by Amgen, Thousand Oaks, USA; 10, 50, and 100 ng/ml). The purity and cell morphology of isolated mature osteoclasts were characterized after May Grünwald Giemsa (MGG) staining and studied for tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) activity (data not shown). In some experiments, recombinant human RANK/Fc chimera (sRANK, R&D systems, Abington, UK; 20 and 200 ng/ml) was added to the osteoclasts for the last 24 h of culture together with RANKL.

Measurement of matrix metalloproteinase activities. Matrix metalloproteinase activities were detected by zymography as previously reported [15], in cell culture supernatants corresponding to the cells used for mRNA extraction. Electrophoresis gel was composed of 10% polyacrylamide containing 0.2% gelatin. As protein levels (determined by the BCA method, Sigma, St. Quentin Fallavier, France) were not modified by the different treatments, the same volume of supernatant was assayed in all experiments, allowing strict comparison of the results. The same experiment was performed by adding 10 μ M EDTA, a chelating agent of bivalent ions, to inhibit MMP activities (not shown).

Measurement of cathepsin K activity. The enzymatic assay was performed using fresh supernatants from purified rabbit osteoclasts (that correspond to the same cells used for mRNA extraction) and a synthetic fluorogenic dipeptide as substrate: Z-Leu-Arg-AMC (7-N-benzoyloxycarbonyl-L-leucyl-L-arginylamide-4-methylcoumarin; Calbiochem, Fontenay-sous-Bois, France), that presents the best specificity for cathepsin K [16]. The reaction mixture is composed of 140 μ l of 0.1 M sodium acetate, pH 5.5/1 mM EDTA/0.1 mM DTT, 50 μ l of culture supernatant, and 10 μ l of 500 μ M substrate. After incubation for 24 h at 37 °C, the reaction is stopped by adding 100 μ l of 0.1 M Tris, pH 8/0.1 M iodoacetate buffer. The methyl coumarinamide group is excited at 365 nm and its fluorescence intensity is detected at 465 nm. Cathepsin K activity is expressed as μ mol of substrate transformed per μ g protein per 24 h. The results were compared to a standard curve. Total protein content was determined in each case by the BCA method, as previously mentioned.

RNA extraction and RT-PCR. Total RNA was isolated from rabbit osteoclasts using Trizol reagent (Invitrogen) and then treated with DNase I to exclude the possibility of interference with contaminating genomic DNA. RNA was reverse-transcribed. Two microliters of the RT reaction mixture were subjected to PCR using upstream and downstream primers (30 pmol each) to determine the expression of TRAP [5'-AAG GAG GAC TAC GTG CTC GTG GCC GGC-3' (forward) and 5'-TCC ACT CAG CAC GTA GCC CAC GCC GTT-3' (reverse)], cathepsin K [5'-AGC TGG GGA GAA AGC TGG GGA AAC AAA G-3' and 5'-AGG CAC AAA CAA ATG GGG AAA CCA AAC A-3'], MMP-2 [5'-AAG GCC AAG TGG TCC GTG TGA A-3' and 5'-AAC AGT GGA CAT GGC GGT CTC AG-3'], MMP-9 [5'-TGG CCG GCC ACT GTG CGC CCC TCC GAG-3' and 5'-CAC TAG GTT CAC CTC GTT CCG GGT ACT-3'], TIMP-1 [5'-GCA ACT CCG ACC TTG TCA TC-3' and 5'-AGC GTA GGT CTT GGT

GAA GC-3'], and TIMP-2 [5'-GAT CCA GTA TGA GAT CAA GC-3' and 5'-ATA CTC CTT CTT GCC TCC CAC-3'].

Amplified products were analyzed by 1% agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining. Band densities were measured using the ImageQuant computer software program. Relative expression of the different genes (TRAP, cathepsin K, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, and TIMP-2) was calculated as the ratio to 18S signal [5'-TCA AGA ACG AAA GTC GGA GGT TCG-3' (forward) and 5'-TTA TTG CTC AAT CTC GGG TGG CTG-3' (reverse)]. Three separate experiments were performed for each gene studied. A representative experiment is shown in the Results section.

Results

RANKL stimulates TRAP and cathepsin K expressions, but reduces cathepsin K activity in rabbit primary osteoclasts

Cathepsin K and TRAP are studied as markers of osteoclast differentiation. The results of semi-quantitative RT-PCR presented in Fig. 1A demonstrate that RANKL dose-dependently enhances the expression of TRAP and cathepsin K mRNAs by about +40 and +35%, respectively, at 100 ng/ml, as quantified by the software ImageQuant. Unexpectedly, the RANKL-induced enhancement of cathepsin K expression was not paralleled with a stimulation of the respective cathepsin K activity. A decrease of the cathepsin K activity was indeed evidenced (** $p < 0.005$) in the cell culture supernatants treated with RANKL, from 10 to 100 ng/ml (−31 to −40%, respectively, Fig. 1B).

RANKL enhances MMP-9 expression and proMMP-9 activity in purified osteoclasts

MMP-2 expression and activity were not detected in osteoclast cultures, while that of MMP-9 was clearly evidenced. MMP-9 expression was stimulated in a dose-dependent fashion by RANKL: +10, 38, and 50%, respectively, in the presence of 10, 50, and 100 ng/ml of the cytokine (Fig. 2A). This stimulation was paralleled by an enhancement of an unstained band at 92 kDa revealed by gelatin zymography, corresponding to the molecular weight of the latent form of MMP-9 (Fig. 2B). The identification of MMP-9 has been previously confirmed by Western-blot analysis (not shown). The stimulation of proMMP-9 activity reached 60, 80, and 150%, respectively, in the presence of 10, 50, and 100 ng/ml of RANKL (Fig. 2B). Significance of results was confirmed by Student's test: ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$. The effect of RANKL on proMMP-9 activity was investigated in the presence of 20–200 ng/ml sRANK. The results revealed that sRANK (20 ng/ml) prevents RANKL-induced stimulation of proMMP-9 activity in purified osteoclasts (Fig. 3), demonstrating that RANKL used RANK as a signalling receptor to

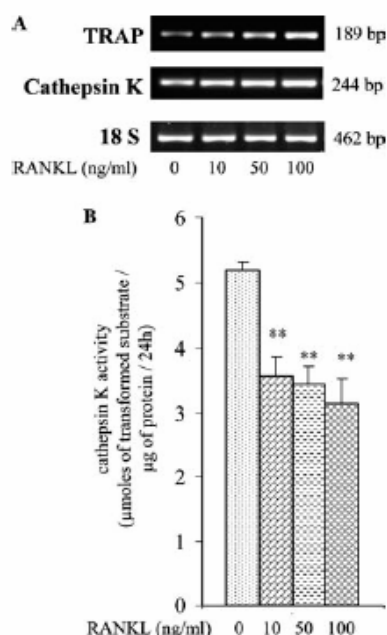


Fig. 1. RANKL dose-dependently increases TRAP and cathepsin K mRNA expressions, but decreases cathepsin K activity in purified osteoclasts. Purified rabbit osteoclasts were incubated with 10, 50, and 100 ng/ml RANKL for the last 24 h of culture, in serum-free conditions. (A) The relative mRNA levels of TRAP and cathepsin K were determined at 28 and 26 cycles, which correspond to the linear part of their respective amplification curves and normalized to the 18S message (26 cycles). A representative RT-PCR analysis out of three independent experiments is shown. (B) The cathepsin K assay was performed using the corresponding fresh supernatants and the synthetic fluorogenic dipeptide Z-Leu-Arg-AMC as substrate. RANKL significantly decreases cathepsin K activity in purified osteoclasts (** $p < 0.005$).

stimulate the proMMP-9 activity in purified osteoclasts (* $p < 0.01$; ** $p < 0.001$; and *** $p < 0.0001$). Same results were obtained in the presence of 200 ng/ml sRANK (not shown).

RANKL decreases TIMP-1 and -2 mRNA expressions in purified osteoclast cultures

As TIMP-1 and -2 are the respective physiological inhibitors of MMP-9 and -2, it was of interest to study in parallel the effect of RANKL on their expression by semi-quantitative RT-PCR. The results presented in Fig. 4 show that RANKL induced a dose-dependent inhibition of both TIMP expression, reaching 35 and 25% in the presence of 100 ng/ml RANKL, respectively, for TIMP-1 and -2.

These results put together with those observed on proteinase activity demonstrated the overall pro-resorptive effect of RANKL on the balance MMP-9/TIMP-1 expressions, with the stimulation of metallo-

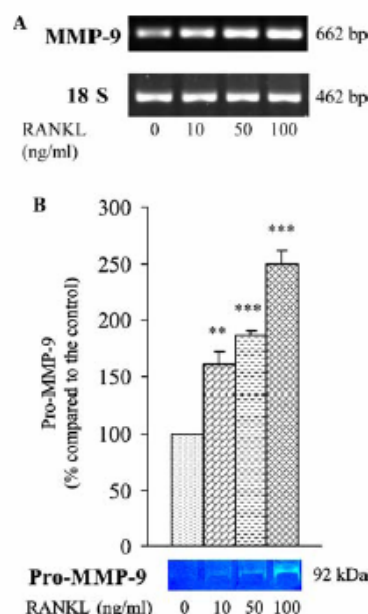


Fig. 2. RANKL stimulates MMP-9 expression and pro-MMP-9 activity in purified osteoclasts. The same experimental conditions as those described in Fig. 1 were used. (A) The relative mRNA levels of MMP-9 were determined at 28 cycles, normalized to the 18S message. (B) Metalloproteinase activities were analyzed using gelatin zymographic assay. As the protein levels were not modulated by RANKL treatment, the same volumes of culture supernatants were used for the assays. The bands corresponding to pro-MMP-9 activity (92 kDa) were scanned and the intensity is represented in the histogram as arbitrary units, expressed as percentage compared to the control. Significance of results was confirmed by Student's test: ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$.

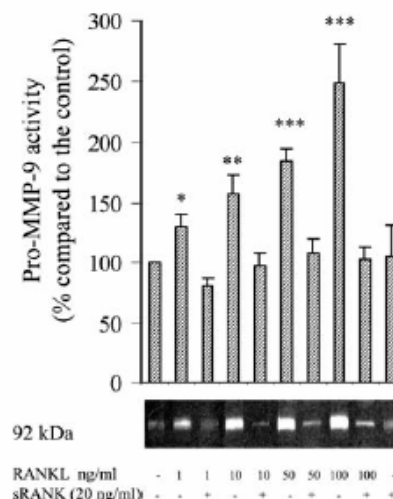


Fig. 3. sRANK abolishes the RANKL-induced stimulation of proMMP-9 activity. The same experimental conditions as those described in Fig. 2 were used, except that 20 ng/ml sRANK was added or not to RANKL for the last 24 h of culture. * $p < 0.01$; ** $p < 0.001$; and *** $p < 0.0001$.

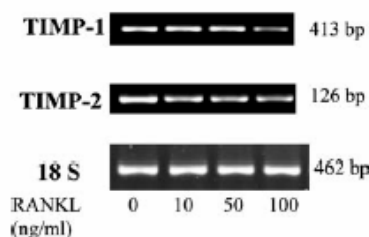


Fig. 4. RANKL dose-dependently decreases TIMP-1 and -2 expressions in purified osteoclasts. The same experimental conditions as those described in Fig. 1 were used. The relative mRNA levels of TIMP-1 and -2 were both determined at 28 cycles, which correspond to the linear part of their respective amplification curves. The relative mRNA expressions were normalized versus the 18S signal determined in the same way.

proteinase expression and activity and inhibition of its respective tissue inhibitor expression.

Discussion

The OPG/RANK/RANKL triad is an important therapeutical axis in pathologies involving a dysregulation in the ratio bone apposition/resorption. A number of studies provide evidence for the involvement of RANKL in the differentiation and activation of OC precursors into mature functional OCs, in which the biological action of RANKL has been characterized by the expression of OC markers and by ultrastructural studies [15]. The results presented in this paper described for the first time the *in vitro* effects of RANKL on protease expression/activities (MMP-9 and cathepsin K), together with some of their inhibitors: the TIMPs, in osteoclast cultures.

The results showed an overall enhancing effect of RANKL on OC marker expression that confirms the pro-resorbing activity previously described for RANKL. However, we demonstrate for the first time that RANKL induced an increase of the MMP-9/TIMP1 ratio in osteoclast cultures. Cathepsin K expression, studied as a marker of OC activation, has been previously shown to be induced or increased in the presence of RANKL [17]. We confirmed that RANKL-induced cathepsin K expression in purified osteoclasts, but when we examined the cathepsin K activity in OC cultures in the presence of RANKL, that has never been performed, a discrepancy between the expression and the activity of the cysteine protease was observed. As the substrate used to determine cathepsin activity indeed presents the best specificity for cathepsin K but is not cathepsin K-selective, the possibility that this activity may represent additional cysteine protease(s) exists: cathepsin B, L or S. Although these cathepsins are not detected in osteoclasts [18], they may be present in contaminant stromal cells/osteoblasts (less than 5% of

total cells). Another explanation for this discrepancy lies in the fact that mature cathepsin K protein and enzyme activity are localized within OCs, and that little or no cathepsin K was observed in the culture media of OC cultures [19]. Thus, the assays of cathepsin K activity in the culture supernatants may not reflect the entire cathepsin K activity expressed by the OCs. Moreover, studies of the corresponding cathepsin K inhibitor, cystatin C, must be conducted to better characterize the balance cathepsin K/cystatin C produced by osteoclasts under the effect of RANKL.

We have previously published the results of similar experiments performed in the presence of OPG [13]. Comparing these data with the present results, it appears that the two cytokines exert opposite effects on OC markers, confirming the reported pro-resorptive and anti-resorptive effects, respectively, for RANKL and OPG. Concerning the balance MMP-9/TIMP, both cytokines stimulate proMMP-9 activity and MMP-9 expression in purified osteoclasts, but their effects on TIMP-1 expression are opposite: inhibition by RANKL and stimulation by OPG. This enhancement may counteract the OPG-induced MMP-9 stimulation previously observed, whereas RANKL effects on MMP-9/TIMP-1 balance *in vitro* are in agreement with its previously reported pro-resorptive effect. In our experimental conditions, we also confirm that RANK is involved in RANKL-induced biological activity on osteoclasts, as the RANKL-induced stimulation of MMP-9 activity is inhibited by an excess of soluble RANK [20,21].

These overall results demonstrate for the first time a direct effect of RANKL on the balance MMP-9/TIMP1 in osteoclast cultures, that may represent one of the mechanisms involved in the initiation of bone resorption as MMP-9 was shown to be the main MMP involved in the invasive activity of osteoclasts [11].

Acknowledgments

This work was supported by INSERM (Contrat de Recherche Stratégique n°4CR06F), by the Ministère de la Recherche (ACI n°TS/02 2 0044), by the "Comité des Pays de Loire de la Ligue Contre le Cancer" (grant and fellowship for ST), and by the "Conseil Régional des Pays de la Loire" (fellowship for YW).

References

- [1] T. Suda, N. Takahashi, T.J. Martin, *Endocrinol. Rev.* 13 (1992) 66–80.
- [2] Y.Y. Kong, U. Feige, I. Sarosi, B. Bolon, A. Tafuri, S. Morony, C. Capparelli, J. Li, R. Elliott, S. McCabe, T. Wong, G. Campagnuolo, E. Moran, E.R. Bogoch, G. Van, L.T. Nguyen, P.S. Ohashi, D.L. Lacey, E. Fish, W.J. Boyle, J.M. Penninger, *Nature* 402 (1999) 304–309.

- [3] T.L. Burgess, Y. Qian, S. Kaufman, B.D. Ring, G. Van, C. Capparelli, M. Kelley, H. Hsu, W.J. Boyle, C. Dunstan, S. Hsu, D.L. Lacey, *J. Cell Biol.* 145 (1999) 527–538.
- [4] D.L. Lacey, E. Timms, H.L. Tan, M.J. Kelley, C.R. Dunstan, T.L. Burgess, R. Elliott, A. Colombero, G. Elliott, S. Scully, H. Hsu, J. Sullivan, N. Hawkins, E. Davy, C. Capparelli, A. Eli, Y.X. Qian, S. Kaufman, I. Sarosi, V. Shalhoub, G. Senaldi, J. Guo, J. Delaney, W.J. Boyle, *Cell* 93 (1998) 165–176.
- [5] H. Hsu, D.L. Lacey, C.R. Dunstan, I. Solovyev, A. Colombero, E. Timms, H.L. Tan, G. Elliott, M.J. Kelley, I. Sarosi, L. Wang, X.Z. Xia, R. Elliott, L. Chiu, T. Black, S. Scully, C. Capparelli, S. Morony, G. Shimamoto, M.B. Bass, W.J. Boyle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 3540–3545.
- [6] Y.-Y. Kong, H. Yoshida, I. Sarosi, H.-L. Tan, E. Timms, C. Capparelli, S. Morony, A. Oliveira-dos-santos, G. Van, A. Itie, W. Khoo, A. Wakeham, C.R. Dunstan, D. Lacey, T.W. Mak, W.J. Boyle, J.M. Penninger, *Nature* 397 (1999) 315–323.
- [7] K. Tezuka, Y. Tezuka, A. Maejima, T. Sato, K. Nemoto, H. Kamioka, Y. Hakeda, M. Kumegawa, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 1106–1109.
- [8] R.A. Dodds, F. Cristiano, J. Field, R. Kapadia, X. Liang, C. Debouck, I. Kola, M. Gowen, *Bone* 23 (1998) S164.
- [9] B.D. Gelb, G.P. Shi, H.A. Chapman, R.J. Desnick, *Science* 273 (1996) 1236–1238.
- [10] Q.J. Chen, L. Lund, T. Lenhard, M. Engsig, B. Winding, B. Therkildsen, A.C. Pedersen, D. Larsen, Z. Werb, N.T. Foged, J.-M. Delaissé, *Bone* 23 (1998) S548.
- [11] Q.J. Chen, L. Lund, T. Lenhard, M. Engsig, B. Winding, B. Therkildsen, A.C. Pedersen, D. Larsen, Z. Werb, N.T. Foged, J.-M. Delaissé, *Clin. Chim. Acta* 291 (2000) 223–234.
- [12] D.E. Gomez, D.F. Alonso, H. Yoshiji, U.P. Thorgeirsson, *Eur. J. Cell Biol.* 7 (1997) 111–122.
- [13] Y. Wittrant, S. Couillaud, S. Theoleyre, C. Dunstan, D. Heymann, F. Rédini, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293 (2002) 38–44.
- [14] S. Corisdeo, M. Gyda, M. Zaidi, B.S. Moonga, B.R. Troen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285 (2001) 335–339.
- [15] A.V. Rousselle, C. Damiens, Y. Fortun, N. Passuti, M. Padrines, D. Heymann, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268 (2000) 875–881.
- [16] D. Brömme, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 2126–2132.
- [17] A. Shiotani, M. Takami, K. Itoh, Y. Shibasaki, T. Sasaki, *Anat. Rec.* 268 (2002) 137–146.
- [18] F.H. Drake, R.A. Dodds, I.E. James, J.R. Connor, C. Debouck, S. Richardson, E. Lee-Rykaczewski, L. Coleman, D. Riegan, R. Barthlow, G. Hastings, M. Gowen, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 12511–12516.
- [19] D.J. Riegan, H.A. McClung, R.A. Dodds, S.M. Hwang, M.W. Holmes, I.E. James, F.H. Drake, M. Gowen, *Bone* 18 (2001) 282–289.
- [20] E. Jimi, S. Akiyama, T. Tsurukai, N. Okahashi, K. Kobayashi, N. Udagawa, T. Nishihara, N. Takahashi, T. Suda, *J. Immunol.* 163 (1999) 434–442.
- [21] M. Matsumoto, T. Sudo, T. Saito, H. Osada, M. Tsujimoto, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 31155–31161.

Complément de discussion à l'article II.

La triade OPG/RANK/RANKL constitue un axe thérapeutique important impliqué dans la dérégulation de l'équilibre de la formation et dégradation osseuse. L'implication de RANKL dans l'activation et la différenciation des précurseurs ostéoclastiques en ostéoclastes matures a été rapportée par de nombreuses équipes, notamment par la caractérisation de l'activité biologique de RANKL sur l'expression de marqueurs ostéoclastiques et la structure cellulaire. Les études présentées dans cet article décrivent pour la première fois les effets *in vitro* de RANKL sur l'expression et l'activité de protéases (MMP-9 et Cathepsine K) ainsi que l'inhibiteur de la MMP-9 : TIMP-1.

Les résultats montrent une stimulation globale par RANKL de l'expression de marqueurs ostéoclastiques confirmant ainsi le rôle pro-résorptif déjà décrit pour cette molécule. Cependant, nous avons démontré pour la première fois que RANKL pouvait augmenter le ratio MMP-9/TIMP-1 dans des cultures ostéoclastes purifiés de lapereaux. Lors de ce travail l'enzyme Cathepsine K a été étudiée en tant que marqueur de l'activité ostéoclastique, et la stimulation de son expression par RANKL, par ailleurs déjà décrite dans la littérature, a été confirmée. L'originalité de l'étude présentée ici réside en partie dans l'analyse des paramètres de l'activité enzymatique en présence de RANKL et l'obtention de résultats contradictoires entre la stimulation de l'expression et l'inhibition de l'activité Cathepsine K. Cette contradiction pourrait être expliquée par l'utilisation d'un substrat présentant la meilleure spécificité pour l'activité Cathepsine K mais non restreint à celle-ci. Ainsi, même si les ostéoclastes n'expriment ni la Cathepsine B, L ou S, une activité résiduelle de celles-ci pourrait expliquer en partie ces données, du fait de la présence de cellules stromales contaminantes (moins de 5 %) lors de la purification des ostéoclastes. D'autre part, l'enzyme Cathepsine K et son activité ont été décrites pour être restreintes à la chambre de résorption. Ainsi, l'activité observée dans le milieu de culture pourrait ne pas refléter l'activité

Cathepsine K globale. Cependant, Skoumal et coll. ont montré par dosage sérique une corrélation entre l'érosion osseuse de patients atteints d'arthrite rhumatoïde et l'augmentation de la concentration de la Cathepsine K [Skoumal et coll. (2005)]. Mandelin et coll. ont également pu mesurer l'activité de la Cathepsine K dans le milieu de culture de fibroblastes issus de biopsies péri-prothétiques [Mandelin et coll. (2005)]. Par ailleurs, il serait nécessaire d'analyser l'expression et l'activité de la cystatine C (inhibiteur naturel de la Cathepsine K) afin de déterminer les effets de RANKL sur le ratio cystatine C / Cathepsine K.

L'article précédent présente une méthodologie similaire en présence d'OPG et l'acquisition de nouvelles techniques a permis de mettre en évidence également une inhibition de l'activité Cathepsine K par l'OPG (données non présentées). Par conséquent, la comparaison des données concernant l'activité de ces deux cytokines sur des cultures primaires d'ostéoclastes montre que celles-ci exercent des effets opposés (expression de la Cathepsine K, de TRAP et de TIMP-1) confirmant leur rôle pro- et anti-résorptif respectivement pour RANKL et OPG, mais également des effets similaires (stimulation de l'expression de la MMP-9 et de l'activité de sa forme latente, la proMMP-9, inhibition de l'activité Cathepsine K). Cependant, OPG et RANKL ne semblent pas avoir un rôle exclusif dans la stimulation de l'expression de la MMP-9 par les ostéoclastes. En effet, Inoue et coll. ont démontré que la stimulation de l'expression de la MMP-9 par des précurseurs ostéoclastiques en présence de milieux conditionnés issus de culture de cellules d'adénome prostatique était indépendante de RANKL ou d'OPG [Inoue et coll. (2005)].

Lors de cette étude nous avons également pu mettre en évidence que la stimulation de l'activité pro-MMP-9 par RANKL est inhibée par RANK soluble en excès suggérant par conséquent que l'effet de RANKL est médié par RANK. Ces travaux démontrent pour la première fois un effet direct de RANKL sur la régulation de la balance MMP-9/TIMP-1 dans des cultures d'ostéoclastes primaires, et ainsi l'influence de cette cytokine sur une des

principales clés de l'initiation de la résorption osseuse et de l'activité invasive des ostéoclastes. Par ailleurs, une étude des paramètres de la résorption sur des souris *Ctsk* ^{-/-} invalidées pour le gène de la Cathepsine K révèle une corrélation entre l'augmentation de l'expression de RANKL, celle de la MMP-9 et le recrutement des ostéoclastes au niveau de l'os trabéculaire, tendant à compenser la déficience des souris ostéopétrotiques *Ctsk* ^{-/-} [Kiviranta et coll. (2005)].

Afin d'approfondir cette étude sur les effets directs de l'OPG et de RANKL sur la biologie de l'ostéoclaste, nous nous sommes orientés vers l'utilisation d'un modèle murin de différenciation ostéoclastique *in vitro* représenté par la lignée RAW264.7. Ce modèle remplace dans l'article suivant le modèle d'ostéoclastes purifiés de lapereaux et ce choix s'explique par la nécessité de disposer d'outils d'analyse disponibles chez la souris, qui ne l'étaient pas chez le lapin.

Article III.

Le sujet de ce travail a consisté à comparer les effets de RANKL et de l'OPG au cours de l'ostéoclastogenèse par l'utilisation de la lignée de monocytes murins RAW264.7 capable de se différencier en ostéoclastes *in vitro*. Les cellules RAW264.7 ont étéensemencées à une densité de 10000 cellules/cm² et cultivées pendant 4 jours en présence de RANKL. Ces conditions de culture permettaient d'obtenir un rendement optimum pour la différenciation des précurseurs en ostéoclastes matures avec une augmentation de l'expression des paramètres liés à la résorption osseuse : TRAP, le récepteur à la calcitonine (CTR), RANK, Cathepsine K et la MMP-9. Les résultats obtenus ont montré que les effets de RANKL et de l'OPG étaient dépendants du stade de différenciation des cellules. Lorsque les cellules présentent un phénotype indifférencié, OPG et RANKL diminuent l'expression de TRAP, OPG inhibe celle de RANK mais aucune variation significative des transcripts MMP-9 et Cathepsine K n'est observée. Lorsque les cellules sont différenciées en ostéoclastes chacune des cytokines OPG et RANKL exerce un effet inhibiteur sur l'expression de l'ensemble des paramètres étudiés. D'autre part, ces conditions expérimentales de différenciation ont montré que l'inhibition de l'expression de la MMP-9 induite par l'OPG était bloquée en présence d'un anticorps anti-RANKL, suggérant qu'une partie des effets de l'OPG pourrait être médiée par cette cytokine.

Relevance of an in vitro osteoclastogenesis system to study receptor activator of NF- κ B ligand and osteoprotegerin biological activities

Y. Wittrant,^a S. Theoleyre,^a S. Couillaud,^a C. Dunstan,^b D. Heymann,^a and F. R  dini^{a,*}

^aLaboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, EE 99-01,

Faculté de Médecine, 1 rue Gaston Veil, 44035 Nantes, France

^bAmgen Inc., One Amgen Center Drive, Thousand Oaks, CA 91320, USA

Received 6 May 2003; revised version received 10 September 2003

Abstract

Receptor activator of NF- κ B Ligand (RANKL) is an essential requirement for osteoclastogenesis and its activity is neutralized by binding to the soluble decoy receptor osteoprotegerin (OPG). The purpose of this work was to study the effects of RANKL and OPG during osteoclastogenesis using the murine monocytic cell line RAW 264.7 that can differentiate into osteoclasts in vitro. RAW 264.7 cells plated at 10^4 cells/cm² and cultured for 4 days in the presence of RANKL represent the optimal culture conditions for osteoclast differentiation, with an up-regulation of all parameters related to bone resorption: tartrate resistant acid phosphatase (TRAP), calcitonin receptor (CTR), RANK, cathepsin K, matrix metalloproteinase (MMP)-9 mRNA expressions. RANKL and OPG biological effects vary according to the differentiation state of the cells: in undifferentiated RAW 264.7 cells, TRAP expression was decreased by OPG and RANKL, RANK expression was inhibited by OPG, while MMP-9 and cathepsin K mRNA expressions were not modulated. In differentiated RAW 264.7 cells, RANKL and OPG both exert an overall inhibitory effect on the expression of all the parameters studied. In these experimental conditions, OPG-induced MMP-9 inhibition was abrogated in the presence of a blocking anti-RANKL antibody, suggesting that part of OPG effects are RANKL-dependent.

   2003 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Osteoclast; RANKL; Osteoprotegerin; Bone resorption; Metalloproteinase

Introduction

Bone remodeling is a physiological process that involves the resorption of bone by osteoclasts and the synthesis of bone matrix by osteoblasts. Osteoclasts are specialized monocyte/macrophage family members that differentiate from hematopoietic precursors [1]. Terminal differentiation in this lineage is characterized by acquisition of mature phenotypic markers such as the calcitonin receptor (CTR), tartrate resistant acid phosphatase (TRAP), integrin α v β 3, morphological conversion into large multinucleated cells and the capability to form resorption lacunae on bone. Several factors affect osteoclastogenesis at distinct stages of development, including colony-stimu-

lating factor-1 (CSF-1 or M-CSF), interleukin-1 (IL-1), transforming growth factor- β , tumor necrosis factor- α (TNF- α), IL-6, vitamin D3, and parathyroid hormone (PTH) [2,3]. However, it has been demonstrated that these factors are not sufficient for osteoclast differentiation and activation. Recently, a new TNF-family molecule named receptor activator of NF- κ B Ligand (RANKL) has been shown to both activate mature osteoclasts and mediate osteoclastogenesis in the presence of M-CSF [4,5]. RANKL is preferentially expressed on committed preosteoblastic cells, whereas its specific receptor RANK is expressed in hematopoietic osteoclast progenitors [6,7]. RANKL is the key osteoclast differentiation factor absolutely required for osteoclast development and bone remodeling in vivo that also acts as a survival factor for osteoclast precursors. Part of this mechanism is regulated by osteoprotegerin (OPG), a decoy receptor for RANKL also produced by osteoblast lineage cells, which functions as an inhibitor towards osteoclast development by blocking RANKL–RANK interaction [8,9]. Thus, the biological

* Corresponding author. Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, EE 99-01, Faculté de Médecine, 1 rue Gaston Veil, 44035 Nantes cedex 1, France. Fax: +33-2-40-41-28-60.

E-mail address: francoise.redini@sante.univ-nantes.fr (F. Rédini).

effects of OPG on bone cells include the inhibition of terminal stages of osteoclast differentiation, suppression of the activation of mature osteoclasts and induction of their apoptosis [10]. All genetic and functional experiments indicate that the balance between RANKL–RANK signaling and the levels of biologically active OPG regulates development and activation of osteoclasts and bone metabolism.

Proteinases play an important role in bone physiology. They are not only required for the degradation of bone and cartilage matrix, but they are also involved in the mechanisms initiating bone and cartilage matrix resorption. Cysteine proteinases and matrix metalloproteinases (MMPs) have been identified as the main active proteinases in these processes [11]. Among cysteine proteinases, cathepsin K plays an essential role in osteoclast-mediated degradation of the organic matrix of bone [12]. Knockout of the enzyme in mice, as well as lack of functional enzyme in pycnodysostosis, result in osteopetrosis [13,14]. Using proteinase inhibitors, several studies demonstrated that the relative importance of cysteine proteinase and MMPs varies depending on the bone type and/or the stage of the resorption cycle [15,16]. Among MMPs, MMP-9 is known as the most abundant gelatinolytic MMP in osteoclasts but is not rate limiting, since the resorbing activity of the osteoclasts in bone explants from MMP-9-null mice compares to that of wild-type mice [17]. In the same experiment, MMP-9 was shown to be involved in the invasive activity of osteoclasts. The zinc-dependent endopeptidase activities of the MMP-9 and -2 are inhibited specifically by their intrinsic inhibitors called tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP)-1 and -2, respectively [18].

The aim of the present work was to study the biological activities of RANKL and OPG during osteoclastogenesis, using the murine monocytic cell line RAW 264.7, which can differentiate into osteoclasts in the presence of RANKL, then to compare the results with those previously obtained with purified mature osteoclasts [19,20].

Materials and methods

Reagents

Recombinant human RANKL and OPG were kindly provided by Amgen Inc (Thousand Oaks, USA). α -Minimal Essential Medium (α -MEM), fetal bovine serum (FBS), antibiotic mixture, phosphate-buffered saline (PBS), Murine Moloney Leukemia Virus-Reverse Transcriptase (MMLV-RT), DNase I and Trizol reagent were purchased from Invitrogen (Eragny, France) and Taq polymerase from Eurobio (Les Ulis, France). The fluorogenic synthetic substrate carboxy benzoyl-Leu-Arg-methyl coumarinamide (Z-Leu-Arg-AMC) was purchased from Calbiochem (Fontenay-sous-Bois, France). The BCA kit for protein determination was from Sigma (St. Quentin Fallavier, France).

Cell culture

RAW 264.7 cells (obtained from Pr Matsumoto, Japan) were seeded at the density of 10^4 or 3×10^4 cells/cm² and maintained in phenol red-free α -MEM supplemented with 1% nonessential amino acids and 10% fetal bovine serum. They were cultured for 1–10 days in the presence of RANKL (50 ng/ml), the medium being changed every day, to determine the culture conditions to obtain the optimal expression of OC markers. For the studies of RANKL and OPG biological activities, the RAW cells were cultured for 3 days either in the presence or absence of RANKL, washed and incubated for the last 24 h in serum-free medium in the presence of RANKL or OPG (10, 50 and 100 ng/ml). In some experiments, blocking anti-hRANKL antibody was added together with OPG treatment (4 μ g/ml, R&D systems, Abingdon, UK). Human embryonic 293 cells stably transfected with murine RANKL were a kind gift of Dr. Josien (Nantes, France).

Cathepsin K activity assay

The enzymatic assay was performed using fresh supernatants from murine RAW 264.7 cells and a synthetic fluorogenic dipeptide as substrate: Z-Leu-Arg-AMC (7-N-benzoyloxycarbonyl-L-leucyl-L-arginylamide-4-methylcoumarin), which presents the best specificity for cathepsin K [21]. The reaction mixture is composed of 140 μ l of 0.1 M sodium acetate pH 5.5/1 mM EDTA/0.1 mM DTT, 50 μ l of culture supernatant and 10 μ l of 500 μ M substrate (100 Km). After incubation for 24 h at 37°C, the reaction is stopped by adding 100 μ l of 0.1 M Tris pH 8/0.1 M iodo acetate buffer. The methyl coumarinamide group is excited at 365 nm and its fluorescence intensity detected at 465 nm. The results were compared to a standard curve. Total protein content was determined in each case by the BCA method (copper II sulfate diluted 1/50 in a bicinchoninic acid solution).

RNA extraction

The cells were lysed with TRIzol reagent. Extraction was performed after addition of 0.2 vol of chloroform followed by centrifugation. RNA was recovered from the aqueous phase by precipitation with 0.5 vol isopropyl alcohol. Total RNA was quantified by measuring the OD₂₆₀, and integrity was checked by 1% agarose/formaldehyde gel electrophoresis. RNA samples were then treated with DNase I (1 U/ μ g) before the reverse-transcription step, to avoid the interference with contaminating genomic DNA.

Expression of MMPs, TRAP, RANK, CTR and cathepsin K by semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

First-strand cDNA was synthesized by incubating 5 μ g of total RNA in 50 μ l of RT mixture containing 0.5 μ g oligo-

dT, 5× RT buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 10 mM MnCl₂, 500 mM KCl and 40 mM DTT), 5 µl of 0.1 M DTT, 2.5 µl of 10 mM dNTP mix, 400 U MMLV-RT and 0.5 µl of 40 U/µl RNAsin at 42°C for 30 min, 5 min at 95°C and then ice-chilled for 5 min. Two microliters of the RT reaction mixture were subjected to PCR using upstream and downstream primers (30 pmol each, Table 1), 5 µl of 10× PCR buffer (100 mM Tris-HCl, pH 9, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 1% Triton X-100), 3 µl of 25 mM MgCl₂, 2 µl of 10 mM dNTP, 31.7 µl of DTT (1.25 µl of DTT 0.1 M with 1.411 ml of RNase-free water) and 0.25 µl of 5 U/µl Taq polymerase.

Analysis of PCR products

PCR products were analyzed in 1% agarose gels, stained with ethidium bromide and photographed. Band densities were measured using the ImageQuant computer software program. Relative expression of the different genes (CTR, TRAP, RANK, cathepsin K, MMP-2 and MMP-9) were calculated as the ratio to 18S signal. After the number of PCR cycles was increased, a plot was done for each sample, and the cycle values corresponding to the linear part of the amplification curve were determined (Table 1) and used to quantify the messages versus the 18S signal determined in the same way.

Presence of RANKL on the cell surface of RAW 264.7 cells

RAW 264.7 cells were cultured for 3 days in the absence or presence of 50 ng/ml RANKL as described above. At the end of the culture time, the presence of RANKL on the cell surface of RAW 264.7 cells was determined by flow cytometry. Briefly, RAW 264.7 cells were stained with a biotinylated antihuman sRANKL antibody (Peprotech, London, UK) revealed by Streptavidin-R-Phycoerythrin (Sigma, St. Louis, MO, USA).

Statistical analysis

Statistical differences were analyzed by Student's *t* test. Each experiment was performed in triplicate, and results from one experiment out of three are shown.

Results

Modulation of OC markers during differentiation of RAW 264.7 cells into osteoclasts

We employed the murine monocytic RAW 264.7 cell line as a model of *in vitro* osteoclastogenesis to study the biological activities of RANKL and OPG during osteoclast differentiation. Indeed, this cell line was described to express RANK and differentiate into CTR positive cells when cultured in the presence of RANKL [22].

As the culture conditions described in the literature to differentiate RAW 264.7 cells into osteoclasts are numerous and vary from one study to another [23–26], we performed preliminary experiments to determine the best culture conditions (seeding density and culture time in the presence of RANKL) to obtain the highest rate of osteoclast differentiation. These conditions were assessed by the formation of large multinucleated cells and by the expression of OC markers (TRAP, cathepsin K, CTR and RANK) after 1–10 days of culture in the presence of 50 ng/ml RANKL. Two different cellular densities were tested, corresponding to 10⁴ and 3.10⁴ cells/cm². RANKL-induced multinucleated cell formation was more effective when RAW 264.7 cells were plated at 10⁴ cells/cm² than at the higher density (Figs. 1A–D). This morphological observation can be put together with the RANKL-induced up-regulation of cathepsin K activity, which was only significant at 10⁴ cells/cm² (data not shown). After 3 days of culture, 25–30% of the cells (initially plated at 10⁴ cells/cm²) were multinucleated, as compared to less

Table 1
Mouse oligonucleotide primers used for RT-PCR

Molecule	Primers	Strand	Location	Size (bp)	Conditions (<i>T_m</i> , cycle number)
18S	TCAAGAACGAAAGTCGGAGGTTTCG	+	1025–1048	462	62°C
	TTATTGCTCAATCTCGGGTGGCTG	–	1487–1464		26 cycles
CTR	CTGCTCCTAGTGAGCCCAAC	+	547–566	444	61°C
	CAGCAATCGACAAGGAGTGA	–	991–972		40 cycles
TRAP	AAATCACTCTTAAAGACCA	+	968–987	316	68°C
	TTATTGAATAGCAGTGACAG	–	1284–1265		35 cycles
RANK	AAGATGGTTCCAGAAGACGGT	+	904–924	350	68°C
	CATAGATGTCAGTTCTGCTCGGA	–	1254–1233		35 cycles
RANKL	CAGCATGCTCTGTTCTCTGTA	+	325–345	764	61°C
	TCTCAGTCTATGTCCTGAACCTTGAAAGC	–	1089–1061		40 cycles
Cat K	GGGCCAGGATGAAAGTTGTA	+	612–621	324	60°C
	CCGAGCCAAGAGAGCATATC	–	936–917		24 cycles
MMP-9	TCTGAGGCTCTACAGAGTCT	+	1558–1578	550	61°C
	CTCATGGTCCACCTTGTTAC	–	2136–2116		26 cycles

Primers are presented in a 5' to 3' orientation, with that for the coding strand (+) and the non-coding strand (–). The location of each primer within the cDNA sequence is indicated, together with the product size generated by RT-PCR and the experimental conditions used (*T_m* and cycle number corresponding to the linear part of the amplification curve used to quantify the messages versus the 18S signal determined in the same way).

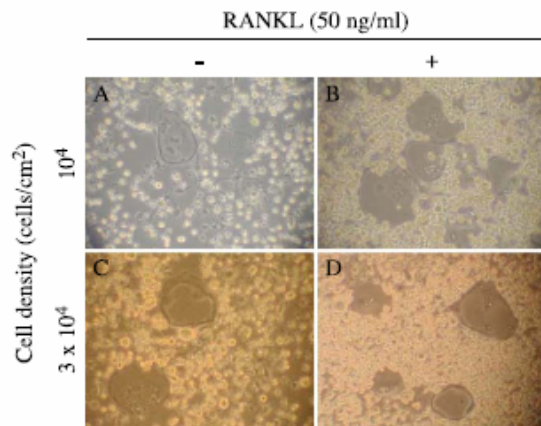


Fig. 1. Effect of RANKL on multinucleated cell formation in RAW 264.7 cultures. RAW 264.7 cells were seeded at 10^4 cells/cm² (A and B) or 3×10^4 cells/cm² (C and D) and cultured for 3 days either in the absence (A and C) or presence (B and D) of 50 ng/ml RANKL, the medium being changed every day. The effect of RANKL on multinucleated cell formation was observed every day by phase contrast microscopy observation.

than 5% in the absence of RANKL (Figs. 1A and B). In our experimental conditions, CTR expression reached a peak after 4 days of culture in the presence of RANKL, then shifted to basal values after 10 days, whereas CTR mRNA expression could not be detected in the absence of RANKL (Fig. 2A). Same results were observed with another osteoclast marker: TRAP expression was greatly enhanced (6-fold) in RAW 264.7 cells cultured 2 days in the presence of 50 ng/ml RANKL as compared to the control cells cultured

in absence of RANKL for the same period (Fig. 2B), the TRAP mRNA expression being maximal after 4 days of culture in the presence of RANKL. In the absence of RANKL, TRAP expression remained at the basal value (not shown).

Therefore, a plating density of 10^4 cells/cm² and a culture period of 4 days in the absence or presence of 50 ng/ml RANKL were chosen as the appropriate culture conditions to compare OPG and RANKL biological activities, respectively, between undifferentiated and differentiated RAW 264.7 cells.

RANKL and OPG effects on osteoclast marker expression during osteoclast differentiation

To compare the effects of RANKL and OPG during *in vitro* osteoclastogenesis, RAW 264.7 cells were cultured for 3 days either in the absence or in the presence of 50 ng/ml RANKL, then treated or not with RANKL or OPG (10, 50 and 100 ng/ml) in serum-free conditions for 24 h.

Results presented in Figs. 3A–D first demonstrate that TRAP and RANK mRNA expressions are enhanced during differentiation of RAW 264.7 cells: 75% and 90%, respectively, for TRAP and RANK mRNA expression (Figs. 3B and D compared to Figs. 3A and C). The effects of RANKL and OPG on osteoclast marker expression were then compared between undifferentiated (Figs. 3A and C) and differentiated (Figs. 3B and D) cells. Taken as a all, the results showed that TRAP and RANK mRNA expressions were decreased by both factors but to a higher extent in differentiated RAW 264.7 cells, except for RANK expression that

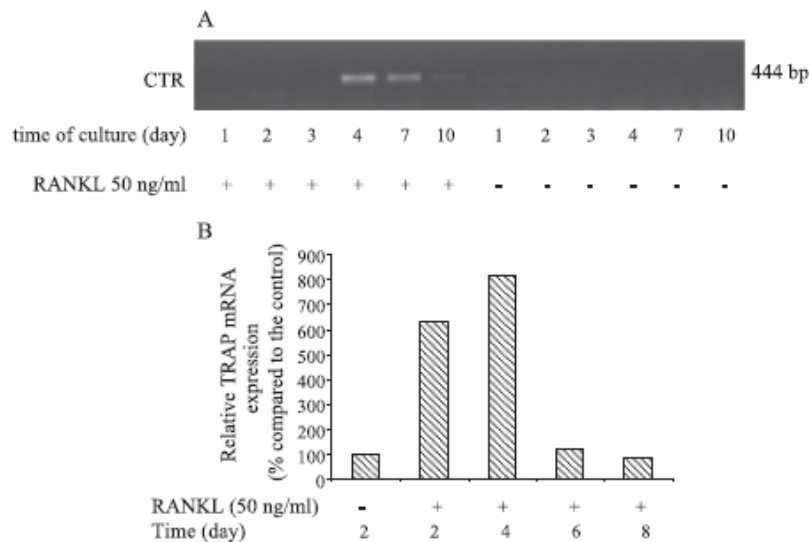


Fig. 2. Evolution of CTR and TRAP expressions during differentiation of RAW 264.7 cells in the presence of RANKL. The expression of several OC parameters, among them, CTR (A) and TRAP (B) was analyzed every day on separate flasks by semiquantitative RT-PCR. The relative mRNA levels of CTR and TRAP were determined at 40 and 35 cycles, which corresponded to the linear part of their respective amplification curves. TRAP mRNA expression was normalized to the 18S signal and expressed as percentage compared to the control (100% represent undifferentiated cells, cultured in absence of RANKL).

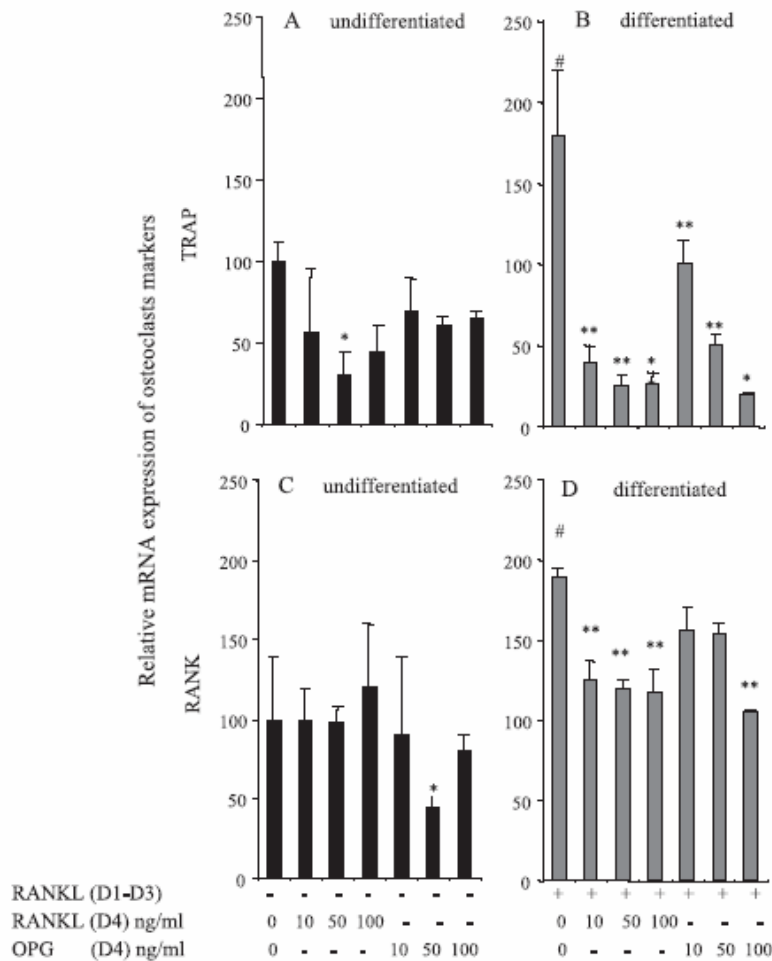


Fig. 3. RANKL and OPG effects on TRAP and RANK expressions during differentiation of RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were cultured for 3 days either in the presence (B and D) or not (A and C) of 50 ng/ml RANKL, then incubated for the last 24 h in the presence of increasing concentrations of RANKL or OPG (10, 50 or 100 ng/ml) in serum-free conditions. TRAP (A and B) and RANK (C and D) expressions were analyzed by semiquantitative RT-PCR, their relative mRNA levels being determined both at 35 cycles which corresponded to the linear part of their respective amplification curves, then normalized to the 18S signal. Results are expressed as percentage compared to the control $\pm$ SD (100% represent the control undifferentiated cells). # $P < 0.05$; differentiated compared to undifferentiated cells; * $P < 0.05$; ** $P < 0.005$; OPG and RANKL-treated cells compared to respective untreated cells.

was not significantly modulated by RANKL (Figs. 3B and D compared to Figs. 3A and C). TRAP mRNA expression was decreased by 60% and 86% in the presence of 100 ng/ml RANKL, respectively, in undifferentiated (Fig. 3A) and differentiated (Fig. 3B) RAW 264.7 cells. TRAP activity measured in the supernatant of the same cells confirmed the results observed at the mRNA level (not shown).

Cathepsin K activity is increased during in vitro osteoclastogenesis. RANKL and OPG effects depend on the differentiation state of the cells

The origin of the cysteine protease measured with the substrate Z-Leu-Arg-AMC can be attributed to cathepsin K,

even if this substrate is not cathepsin K-selective. Indeed, Z-Leu-Arg-AMC presents the best specificity for cathepsin K (previously named cathepsin O2) and S as compared to cathepsin B and L [21], and cathepsin S is not detectable in osteoclast-like cells [27].

Cathepsin K activity measured in RAW 264.7 cell supernatants was 2-fold increased in differentiated cells as compared to undifferentiated cells (Fig. 4B compared to Fig. 4A). RAW 264.7 cells differentiated or not were then treated with either OPG or RANKL (10, 50 and 100 ng/ml) in serum-free conditions for the last 24 h of culture. Cathepsin K activity was not significantly modulated by either RANKL or OPG in undifferentiated cells (Fig. 4A), whereas both molecules induced a dose-dependent decrease of ca-

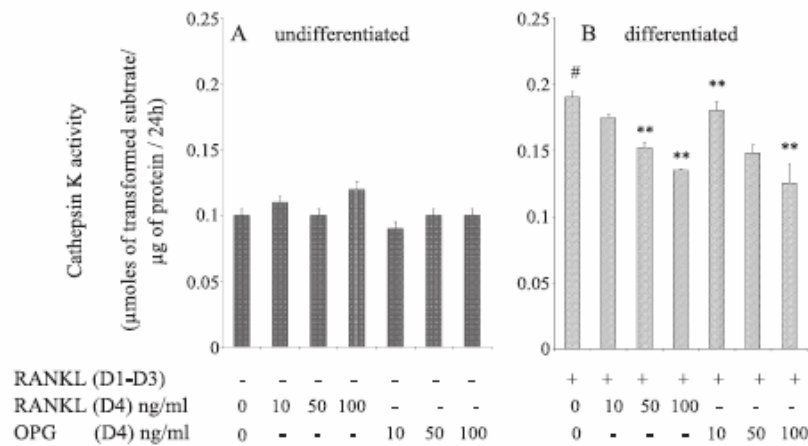


Fig. 4. RANKL and OPG effects on cathepsin K activity during the differentiation of RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were cultured for 3 days (D1–D3) either in the presence (B) or not (A) of 50 ng/ml RANKL, then incubated for the last 24 h (day 4) in the presence of 10, 50 and 100 ng/ml of RANKL or OPG. The cathepsin K assay was performed using fresh supernatants and the synthetic fluorogenic dipeptide Z-Leu-Arg-AMC as substrate. Cathepsin K activity is expressed as micromoles of substrate transformed per microgram of protein per 24 h. Results are expressed as mean of four independent experiments $\pm$ SD. [#] $P < 0.05$; differentiated compared to undifferentiated cells; ^{**} $P < 0.005$; OPG- and RANKL-treated cells compared to respective untreated cells.

thepsin K activity reaching 25% and 32%, respectively, for 100 ng/ml RANKL or OPG in differentiated cells (Fig. 4B).

OPG inhibits both MMP-9 and cathepsin K expression in differentiated RAW 264.7 cells, whereas RANKL increases MMP-9 but decreases cathepsin K expression

MMP activities could not be detected by the zymography technique in RAW 264.7 supernatants, indicating that these proteases are secreted at a lower rate as compared to mature rabbit purified osteoclasts [19,20]. However, MMP-9 but not MMP-2 expression was determined by semiquantitative RT-

PCR. In differentiated cells, MMP-9 mRNA expression was slightly increased by RANKL and decreased by OPG (Fig. 5A), whereas no modulation were observed in the presence of both factor in undifferentiated cells (not shown). Semiquantitative RT-PCR studies performed on the same cultures confirmed at the mRNA level the results observed on cathepsin K activity, and demonstrated that cathepsin K mRNA expression was increased by 125% during differentiation of RAW 264.7 cells (Fig. 5B). Cathepsin K expression was not significantly modified under OPG or RANKL treatment in undifferentiated cells (not shown), whereas both RANKL and OPG decreased cathepsin K expres-

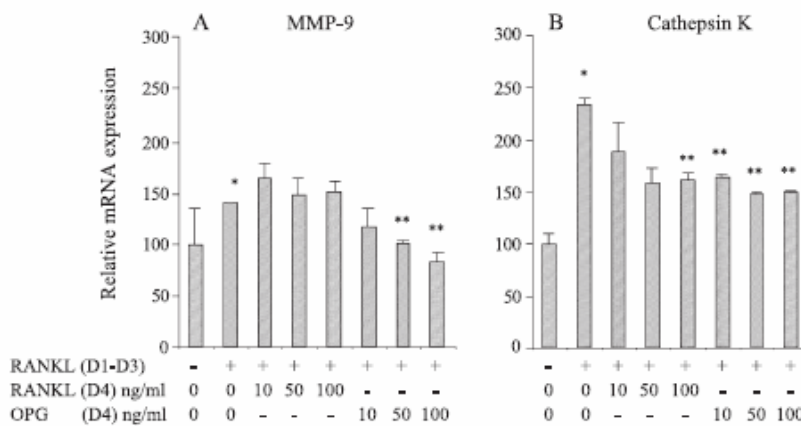


Fig. 5. RANKL and OPG effects on protease expression in differentiated RAW 264.7 cells. Differentiated RAW 264.7 cells were incubated or not with 10, 50 or 100 ng/ml RANKL or OPG for the last 24 h of culture in serum-free conditions. MMP-9 and cathepsin K expressions were then analyzed by semiquantitative RT-PCR, their relative mRNA levels being determined at 26 and 24 cycles, respectively, normalized to the 18S signal determined in the same way, and expressed as percentage of the control $\pm$ SD (100% = undifferentiated control cells). ^{*} $P < 0.05$; ^{**} $P < 0.005$, significant differences from the control.

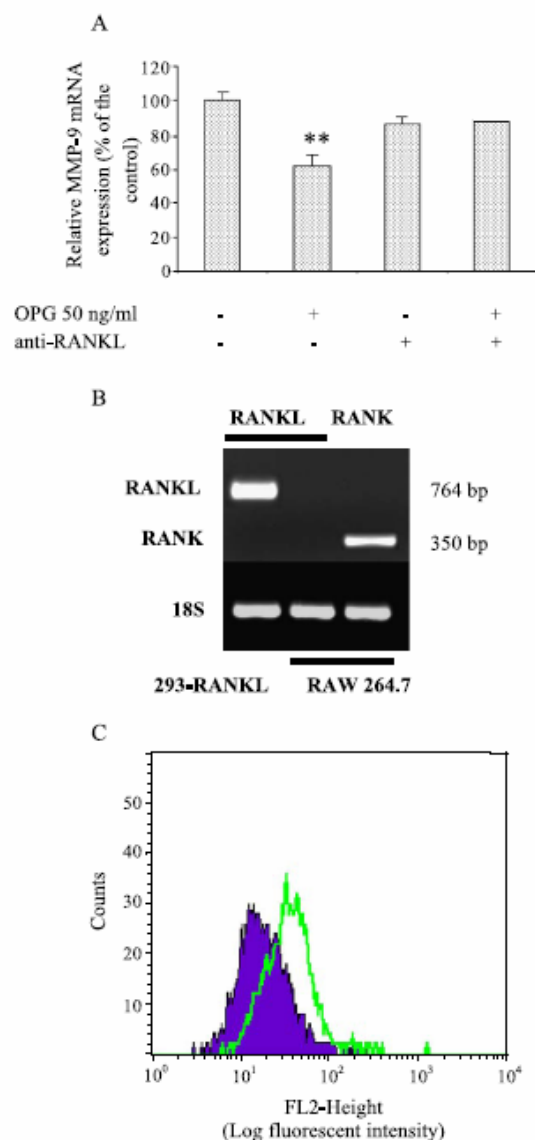


Fig. 6. Involvement of RANKL in the OPG-induced inhibition of MMP-9 expression in differentiated RAW 264.7 cells. (A) RAW 264.7 cells were cultured for 3 days in the presence of 50 ng/ml RANKL, then incubated for the last 24 h in the presence of 50 ng/ml OPG with or without 4 μ g/ml of blocking anti-hRANKL antibody. MMP-9 expression was then analyzed by semiquantitative RT-PCR, its relative mRNA levels being determined at 26 cycles, corresponding to the linear part of its amplification curve. Results are expressed as percentage compared to the control. ** $P < 0.005$, significant differences from the control. (B) RT-PCR analyses of RANK, RANKL and 18S message levels were performed in RAW 264.7 cells and in 293 cells transfected with murine RANKL cDNA (293-RANKL). (C) FACS analysis demonstrating the presence of RANKL (light open profile) on the cell surface of differentiated RAW 264.7 cells when compared with isotype-matched controls (dark open profile).

sion, respectively, by 30% and 37% in differentiated cells (Fig. 5B).

Taking as a whole, these results demonstrate that undifferentiated RAW 264.7 cells are less responsive to OPG or RANKL, whereas both factors exert strong inhibitory effects on bone resorption markers in differentiated osteoclast-like cells.

OPG-induced MMP-9 inhibition is RANKL-dependent

As we demonstrated that OPG exerts biological effects on RAW 264.7 cells, we wondered whether RANKL was involved in this activity, acting as an "OPG-receptor" on the RAW 264.7 cell surface. Results showed that OPG-induced MMP-9 inhibition was abolished in the presence of a blocking anti-RANKL antibody (Fig. 6A), indicating that OPG biological activity is RANKL-dependent. As semiquantitative RT-PCR experiments revealed that the RAW 264.7 cells do not express RANKL (Fig. 6B), we suggest the presence of a hetero-molecular receptor complex for OPG that may involve membranous RANK (present at the surface of RAW 264.7 cells) and exogenous RANKL used to differentiate the RAW 264.7 cells into osteoclasts. The presence of RANKL on the cell surface of RAW 264.7 cells (even after changing the medium) was confirmed by flow cytometric analysis (Fig. 6C), demonstrating that the RANK–RANKL complex is still present at the RAW 264.7 cell surface and may represent the OPG receptor.

Discussion

The OPG–RANK–RANKL triad is an important therapeutic axis in pathologies involving a dysregulation in the ratio bone apposition/resorption. Among these molecules, RANKL has been described and characterized as a membrane-associated or secreted factor expressed by osteoblasts/stromal cells that activate osteoclast functions [28]. A number of studies provide evidence for the involvement of RANKL in the differentiation and activation of OC precursors into mature functional OCs, in which the biological action of RANKL has been characterized by the expression of OC markers and by ultrastructural studies [6]. Previous studies from our laboratory described the *in vitro* biological effects of OPG and RANKL in mature osteoclast cultures [19,20]. As these mature osteoclasts were purified at more than 95% from total rabbit bone cells, it cannot be excluded that the small proportion of stromal cells may mediate OPG-induced effects. The use of the murine monocytic cell line RAW 264.7 gives the opportunity to test OPG effects in osteoclast-like cells that do not express RANKL, and to compare OPG and RANKL biological effects during *in vitro* osteoclast differentiation.

First, the presence of large multinucleated cells and the expression of several OC markers (CTR, TRAP, RANK and cathepsin K) were followed during 10 days of culture in the

presence of RANKL. Results showed that the presence of multinucleated cells and OC function assessed by RANKL-induced cathepsin K activity depend on the initial cell density at plating, with a higher rate of differentiation when RAW 264.7 cells were plated at a standard density (10^4 cells/cm²). Several authors have used this *in vitro* osteoclastogenesis system and showed that cell density and growth speed are determinant for the biological response of RAW 264.7 cells. For example, Hotokezaka et al. [26] have previously demonstrated that differentiation into osteoclast-like cells might be affected by initial cell density and growth speed as TRAP intensity peaked at 5×10^3 cells/cm² after 5 days of culture in the presence of 50 ng/ml RANKL. They also showed that the action of MEK inhibitors on osteoclast differentiation depend on the initial cell density. Another study by Ishida et al. [29] reported a large-scale gene expression analysis of an *in vitro* osteoclastogenesis system, in which the best experimental conditions were defined as a plating density of 1.3×10^4 RAW 264 cells/cm² and 5 days of culture in the presence of 500 ng/ml RANKL. In the present study, as osteoclast marker expression was maximal after 4 days of culture in the presence of RANKL, these conditions were further employed to compare RANKL and OPG biological activities. Our results show that although these culture conditions presented the best characteristics of differentiated osteoclasts, the effects exerted by RANKL and OPG were different, and sometimes opposite to those observed in purified osteoclasts [19,20]. Cathepsin K and TRAP mRNA expressions that were enhanced by RANKL in mature osteoclasts were decreased in differentiated RAW 264.7 cells. The stimulatory effect on OC markers exerted by RANKL in mature osteoclasts is in agreement with its pro-resorptive effects already described [30]. Another example is given by MMP-9 expression that is increased by OPG in mature osteoclasts but is decreased by the same factor in differentiated RAW 264.7 cells. These results indicate that even if RAW 264.7 cells are widely used as a osteoclast model to study transduction mechanisms [23–26], this cell line must be carefully employed to test biological parameters related to “fully differentiated” osteoclasts. The discrepancies observed between purified mature rabbit osteoclasts and murine differentiated RAW 264.7 cells may lie to the different cell composition of the cultures between mature rabbit osteoclasts (95% purity), which may contain a few proportion of stromal cells and the monocytic murine RAW 264.7 cell line that is only composed of osteoclast precursors from an hematopoietic origin. The differentiation stage of the cells may also explain the divergence observed, even if in our experimental conditions we could observe the formation of multinucleated cells that express several osteoclast markers including CTR, TRAP, cathepsin K and RANK. We demonstrated that both RANKL and OPG exert inhibitory effects on OC marker expression in differentiated RAW 264.7 cells, whereas they exert opposite effects on mature osteoclasts in agreement with their respective pro- and anti-resorptive properties

already reported [31]. The inhibition of OC marker expression by RANKL in differentiated RAW 264.7 cells is unexpected and needs to be further elucidated.

The aim of the present study was also to compare the biological activities of RANKL and OPG during osteoclastogenesis. One of the main finding lies to the fact that undifferentiated RAW 264.7 cells are less responsive to RANKL or OPG, as compared to differentiated cells. As we demonstrated that undifferentiated cells express RANK, the receptor of RANKL, at a lower level than osteoclast-like cells, this could explain the lower responsiveness of undifferentiated RAW 264.7 cells to RANKL.

As we evidenced biological effects of OPG on differentiated RAW 264.7 cells, we wondered by which mechanism OPG could exert its activity. OPG belongs to the TNF receptor family but does not appear to bind to any of the known TNF- α family members except to its well-described ligand OPGL/RANKL and weakly to TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) [32]. We demonstrated that RAW 264.7 cells express RANK but not RANKL, and as these cells have been differentiated in the presence of RANKL for several days, a part of RANKL could still bind to its receptor RANK [33] expressed by RAW 264.7 cells. As OPG-induced MMP-9 inhibition was shown to be abolished in the presence of a blocking anti-RANKL antibody, it can be hypothesized that OPG binds to a RANKL–RANK complex at the surface of RAW 264.7 cells. Indeed, we also demonstrated by FACS analysis the presence of RANKL on the surface of the RAW 264.7 cells even after changing medium, suggesting that the RANK–RANKL complex may represent the OPG receptor at the RAW 264.7 cell surface. Using the surface plasmon resonance technique, RANK, RANKL and OPG were shown to be able to form a hetero-molecular complex and we demonstrated that OPG induced the phosphorylation of p38, ERK1/2 and I κ B in RAW 264.7 cells [34]. Moreover, only p38 and I κ B activations were abolished by a blocking anti-RANKL antibody suggesting that only part of OPG-induced effects on osteoclast-like cells involved RANKL. In the present study, we confirm these results at a biological level, as the OPG-induced MMP-9 activity was inhibited in the presence of blocking anti-RANKL antibody. We also demonstrated that the p38 inhibitor SB 203580 abolished the OPG-induced inhibition of MMP-9 expression in differentiated RAW 264.7 cells (Theoleyre et al., submitted for publication), suggesting that this biological effect involved the p38 signaling pathway and is RANKL-dependent.

Beyond RANKL, OPG biological effects could also involved another receptor, which nature is still unknown. Only few data report direct OPG effects or OPG binding on several cell types, including osteoclasts. Kwon et al. [35] demonstrated that receptors for TR1 (further identified as OPG) were detected on a monocytic cell line and in human fibroblasts, and that recombinant TR1 induced proliferation of human foreskin fibroblasts together with strong inhibition

of bone-resorbing function on dentine slices. Hakeda et al. [36] described the direct inhibitory effect of OCIF (osteoclast inhibitory factor, identical to OPG) on bone-resorbing activity of isolated mature osteoclasts, and detected an OCIF-binding protein of 140 kDa which was present on the plasma membrane of osteoclasts. More recently, Standal et al. [37] showed that myeloma cells can bind, internalize and degrade OPG, thereby providing a possible explanation for the lower levels of OPG in the bone marrow of patients with multiple myeloma.

Even if the murine cell model of RAW 264.7 cells does not seem to be the best appropriate to study osteoclast differentiation, this study provides evidence for a direct effect of OPG on osteoclast-like cells. Further experiments are needed to clarify the mechanisms by which OPG exerts its biological effects during osteoclastogenesis.

Acknowledgments

This work was supported by INSERM (Contrat de Recherche Stratégique no. 4CR06F), by the Ministère de la Recherche (ACI no. TS/02 2 0044), the «Comité des Pays de Loire de la Ligue Contre le Cancer» (grant and fellowship for ST) and by the «Conseil Régional des Pays de la Loire» (fellowship for YW).

References

- [1] T. Suda, N. Takahashi, T.J. Martin, Modulation of osteoclast differentiation, *Endocr. Rev.* 13 (1992) 66–80.
- [2] D. Heymann, J. Guicheux, F. Gouin, N. Passuti, G. Daculsi, Cytokines, growth factors and osteoclasts, *Cytokine* 10 (1998) 155–168.
- [3] D. Heymann, A.-V. Rousselle, gp130 cytokine family and bone cells, *Cytokine* 12 (2000) 1455–1468.
- [4] Y.Y. Kong, U. Feige, I. Sarosi, B. Bolon, A. Tafiri, S. Morony, C. Capparelli, J. Li, R. Elliott, S. McCabe, T. Wong, G. Campagnuolo, E. Moran, E.R. Bogoch, G. Van, L.T. Nguyen, P.S. Ohashi, D.L. Lacey, E. Fish, W.J. Boyle, J.M. Penninger, OPG is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis, *Nature* 402 (1999) 304–309.
- [5] T.L. Burgess, Y. Qian, S. Kaufman, R.D. Ring, G. Van, C. Capparelli, M. Kelley, H. Hsu, W.J. Boyle, C. Dunstan, S. Hsu, D.L. Lacey, The ligand for osteoprotegerin (OPG) directly activates mature osteoclasts, *J. Cell Biol.* 145 (1999) 527–538.
- [6] D.L. Lacey, E. Timms, H.L. Tan, M.J. Kelley, C.R. Dunstan, T.L. Burgess, R. Elliott, A. Colombero, G. Elliott, S. Scully, H. Hsu, J. Sullivan, N. Hawkins, E. Davy, C. Capparelli, A. Eli, Y.X. Qian, S. Kaufman, I. Sarosi, V. Shalhoub, G. Senaldi, J. Guo, J. Delaney, W.J. Boyle, Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation, *Cell* 93 (1998) 165–176.
- [7] H. Hsu, D.L. Lacey, C.R. Dunstan, I. Solovyev, A. Colombero, E. Timms, H.L. Tan, G. Elliott, M.J. Kelley, I. Sarosi, L. Wang, X.Y. Xia, R. Elliott, L. Chiu, T. Black, S. Scully, C. Capparelli, S. Morony, G. Shimamoto, M.B. Bass, W.J. Boyle, Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 3540–3545.
- [8] W.S. Simonet, D.L. Lacey, C.R. Dunstan, M. Kelley, M.S. Chang, R. Luthy, H.Q. Nguyen, S. Wooden, L. Bennett, T. Boone, G. Shimamoto, M. DeRose, R. Elliott, A. Colombero, H.L. Tan, G. Trail, J. Sullivan, E. Davy, N. Bucay, L. Renshaw-Gegg, T.M. Hughes, D. Hill, W. Pattison, P. Campbell, W.J. Boyle, Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density, *Cell* 89 (1997) 309–319.
- [9] E. Tsuda, M. Goto, S.I. Mochizuki, K. Yano, F. Kobayashi, T. Morinaga, K. Higashio, Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 234 (1997) 137–142.
- [10] H. Yasuda, N. Shima, N. Nakagawa, S. Mochizuki, K. Yano, N. Fujise, Y. Sato, M. Goto, K. Yamaguchi, M. Kuriyama, T. Kanno, A. Murakami, E. Tsuda, T. Morinaga, K. Higashio, Identification of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG inhibits osteoclastogenesis in vitro, *Endocrinology* 139 (1998) 1329–1337.
- [11] J.-M. Delaissé, T.L. Andersen, M.T. Engsig, K. Henriksen, T. Troen, L. Blavier, Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclastic activities, *Microsc. Res. Tech.* 61 (2003) 504–513.
- [12] K. Tezuka, Y. Tezuka, A. Maejima, T. Sato, K. Nemoto, H. Kamioka, Y. Hakeda, M. Kumegawa, Molecular cloning of a possible cysteine proteinase predominantly expressed in osteoclasts, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 1106–1109.
- [13] R.A. Dodds, F. Cristiano, J. Field, R. Kapadia, X. Liang, C. Debouck, I. Kola, M. Gowen, Cathepsin K knockout mice develop osteopetrosis due to lack of full function in their osteoclasts, *Bone* 23 (1998) S164.
- [14] B.D. Gelb, G.P. Shi, H.A. Chapman, R.J. Desnick, Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency, *Science* 273 (1996) 1236–1238.
- [15] V. Everts, J.M. Delaissé, W. Korper, W. Beersten, Cysteine proteinases and matrix metalloproteinases play distinct roles in the subosteoclastic resorption zone, *J. Bone Miner. Res.* 13 (1998) 1420–1430.
- [16] V. Everts, W. Korper, D.C. Jansen, J. Steinfort, I. Lammerse, S. Heera, A.J. Docherty, W. Beersten, Functional heterogeneity of osteoclasts: matrix metalloproteinases participate in osteoclastic resorption of calvarial bone but not in resorption of long bone, *FASEB J.* 13 (1999) 1219–1230.
- [17] Q.J. Chen, L. Lund, T. Lenhard, M. Engsig, B. Winding, B. Therkildsen, A.C. Pedersen, D. Larsen, Z. Werb, N.T. Foged, J.M. Delaissé, MMP-9 is a regulator of osteoclast recruitment as demonstrated by targeted mutagenesis, *Bone* 23 (1998) S548.
- [18] D.E. Gomez, D.F. Alonso, H. Yoshiji, U.P. Thorgeirsson, Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions, *Eur. J. Cell Biol.* 7 (1997) 111–122.
- [19] Y. Wittrant, S. Couillaud, S. Theoleyre, C. Dunstan, D. Heymann, F. Rédini, Osteoprotegerin differentially regulates protease expression in osteoclast cultures, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293 (2002) 38–44.
- [20] Y. Wittrant, S. Theoleyre, S. Couillaud, C. Dunstan, D. Heymann, F. Rédini, Regulation of osteoclast protease expression by RANKL, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310 (2003) 774–778.
- [21] D. Brömme, K. Okamoto, B.B. Wang, S. Biroc, Human cathepsin O2, a matrix protein-degrading cysteine protease expressed in osteoclasts, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 2126–2132.
- [22] E. Meiyanto, M. Hoshijima, T. Ogawa, N. Ishida, T. Takeya, Osteoclast differentiation factor modulates cell cycle machinery and causes a delay in s phase progression in RAW264 cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282 (2001) 278–283.
- [23] M. Matsumoto, T. Sudo, T. Saito, H. Osada, M. Tsujimoto, Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway in osteoclastogenesis mediated by receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL), *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 31155–31161.
- [24] J. Mizukami, G. Takaesu, H. Akatsuka, H. Sakurai, J. Ninomiya-Tsuji, K. Matsumoto, N. Sakurai, Receptor of NF- κ B ligand (RANKL) activates TAK1 mitogen-activated protein kinase through a signaling complex containing RANK, TAB2, and TRAF6, *Mol. Cell. Biol.* 22 (2002) 992–1000.

- [25] S.E. Lee, K.M. Woo, S.Y. Kim, H.-M. Kim, K. Kwack, Z.H. Lee, H.-H. Kim, The phosphatidylinositol 3-kinase, p-38, and extracellular signal-regulated kinase pathways are involved in osteoclast differentiation, *Bone* 30 (2002) 71–77.
- [26] H. Hotokezaka, E. Sakai, K. Kanaoka, K. Saito, K. Matsuo, H. Kitaura, N. Yoshida, K. Nakayama, U0126 and PD98059, specific inhibitors of MEK, accelerate differentiation of RAW 264.7 cells into osteoclast-like cells, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 47366–47372.
- [27] F.H. Drake, R.A. Dodds, I.E. James, J.R. Connor, C. Dehouck, S. Richardson, E. Lee-Rykaczewski, L. Coleman, D. Rieman, R. Barthlow, G. Hastings, M. Gowen, Cathepsin K, but not cathepsins B, L, or S, is abundantly expressed in human osteoclasts, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 12511–12516.
- [28] H. Yasuda, N. Shima, N. Nakagawa, K. Yamaguchi, M. Kinosaki, S. Mochizuki, A. Tomoyasu, K. Yano, M. Goto, A. Murakami, E. Tsuda, T. Morinaga, K. Higashio, N. Udagawa, N. Takahashi, T. Suda, Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 3597–3602.
- [29] N. Ishida, K. Hayashi, M. Hoshijima, T. Ogawa, S. Koga, Y. Miyatake, M. Kumegawa, T. Kimura, T. Takeya, Large scale gene expression analysis of osteoclastogenesis in vitro and elucidation of NFAT2 as a key regulator, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 41147–41156.
- [30] E. Jimi, S. Akiyama, T. Tsunokai, N. Okahashi, K. Kobayashi, N. Udagawa, T. Nishihara, N. Takahashi, T. Suda, Osteoclast differentiation factor acts as a multifunctional regulator in murine osteoclast differentiation and function, *J. Immunol.* 163 (1999) 434–442.
- [31] A. Shiotani, M. Takami, K. Itoh, Y. Shibasaki, T. Sasaki, Regulation of osteoclast differentiation and function by receptor activator of NF κ B ligand and osteoprotegerin, *Anat. Rec.* 268 (2002) 137–146.
- [32] J.G. Emery, P. McDonnell, M.B. Burke, Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 14363–14367.
- [33] J. Li, I. Sarosi, X.Q. Yan, S. Monory, C. Cappadelli, H.L. Tan, S. McCabe, S.C. Juan, Y. Sun, J. Tarpley, L. Martin, K. Christensen, J. McCabe, P. Kostenuik, H. Hsu, F. Fletcher, C.R. Dunstan, D.L. Boyle, W.J. Boyle, RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 1566–1571.
- [34] S. Theoleyre, Y. Wittrant, S. Couillaud, P. Vusion, M. Berreur, C. Dunstan, F. Blanchard, F. Rédini, D. Heymann, Cellular activity and signaling of osteoprotegerin in osteoclasts depend on receptor activator of NF κ B ligand, *Biochem. Biophys. Acta.* (2003) (in press).
- [35] B.S. Kwon, S. Wang, N. Udagawa, V. Haridas, Z.H. Lee, K.K. Kim, K.O. Oh, J. Greene, Y. Li, J. Su, R. Gentz, B.B. Aggarwal, J. Ni, TR1, a new member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, induces fibroblast proliferation and inhibits osteoclastogenesis and bone resorption, *FASEB J.* 12 (1998) 845–854.
- [36] Y. Hakeda, Y. Kobayashi, K. Yamaguchi, H. Yasuda, E. Tsuda, K. Higashio, T. Miyata, M. Kumegawa, Osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) directly inhibits bone-resorbing activity of isolated mature osteoclasts, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251 (1998) 796–801.
- [37] T. Standal, C. Seidel, O. Hjertner, T. Plesner, R.D. Sandersen, A. Waage, M. Borset, A. Sundan, Osteoprotegerin is bound, internalized, and degraded by multiple myeloma cells, *Blood* 100 (2002) 3002–3007.

Complément de discussion à l'article III.

Les travaux précédents ont permis de comparer les effets *in vitro* de l'OPG et de RANKL sur des cultures primaires d'ostéoclastes purifiés. L'utilisation de la lignée RAW264.7 donne l'opportunité de tester les effets de l'OPG et de RANKL sur des cultures de cellules de type ostéoclastique n'exprimant pas RANKL et, à l'inverse des cultures primaires purifiées, dépourvues de cellules stromales contaminantes. La mise au point des conditions optimales de culture pour la différenciation des cellules a été établie et adaptée à partir de travaux de différentes équipes. Ces paramètres de culture cellulaire ont été déterminés en fonction de leur capacité à induire l'expression des marqueurs ostéoclastiques (CTR, TRAP) et portent sur la densité cellulaire, la durée d'incubation et la concentration de RANKL utilisées pour différencier les cellules. Bien que ces conditions de cultures présentent le meilleur rendement en terme de différenciation, les effets de RANKL et de l'OPG observés lors de ce travail sont différents et parfois contraires à ceux obtenus dans les cultures primaires et ne reflètent pas le rôle pro- et anti-résorptif respectivement de RANKL et de l'OPG. Par exemple, l'expression de la Cathepsine K et de TRAP stimulée par RANKL dans des cultures d'ostéoclastes primaires est inhibée dans des cultures de cellules RAW264.7 différenciées. Ces résultats sont en accord avec ceux de Pang et coll. montrant une augmentation de la Cathepsine K lors de la différenciation des cellules RAW264.7 en présence de RANKL à 40 ng/ml pendant 7 jours et à l'inverse, une inhibition de l'expression de la protéase dans les cellules RAW264.7 différenciées lorsque celles-ci sont incubées 24h avec 60 ng/ml de RANKL [Pang et coll. (2005)].

Par ailleurs l'OPG stimule l'expression de la MMP-9 dans les cultures primaires, mais l'inhibe dans le modèle de cellules RAW264.7 différenciées. Ces résultats indiquent que même si ces cellules RAW264.7 sont largement utilisées comme modèle ostéoclastique pour l'étude des mécanismes de transduction de signaux, cette lignée doit être utilisée avec

précaution pour la réalisation de test biologiques en comparaison de cultures primaires d'ostéoclastes matures. En effet, sur les quatre dernières années, le nombre de travaux publiés utilisant des cultures primaires d'ostéoclastes en tant que modèle d'ostéoclastogenèse est deux fois plus important que ceux utilisant la lignée RAW264.7 (61 articles contre 29). A l'inverse, le nombre de travaux publiés utilisant la lignée RAW264.7 en tant que modèle d'étude de la signalisation intracellulaire ostéoclastique est six fois plus important que ceux utilisant des cultures primaires d'ostéoclastes (134 articles contre 22).

En outre, les données contradictoires obtenues pourraient s'expliquer par : (i) la différence d'espèce : lignée murine / ostéoclastes de lapereaux ; lignée immortalisée / culture primaire, (ii) la différence de composition : 100% de précurseurs hématopoïétiques / 95% d'ostéoclastes purifiés et 5% de cellules stromales contaminantes, (iii) la différence du stade de maturation : les cellules RAW264.7 « différenciées » sont probablement moins matures que les ostéoclastes primaires, et (iiii) le pourcentage de cellules différenciées : toutes les cellules RAW264.7 ne se différencient pas en ostéoclaste.

L'objectif de ce travail a été de comparer les activités biologiques de RANKL et de l'OPG au cours de l'ostéoclastogenèse. Ainsi, les résultats obtenus montrent que les cellules RAW264.7 non différenciées sont moins sensibles à l'activité biologique de RANKL et de l'OPG que les cellules RAW264.7 différenciées, ceci pouvant être corrélé à une expression moins importante de RANK par les cellules non différenciées. Par ailleurs, même si ce modèle semble moins pertinent pour tester l'activité biologique de RANKL et de l'OPG, il nous a néanmoins permis de confirmer une action directe de l'OPG sur ces cellules et montrer que cette action était dépendante de RANKL. En effet, l'analyse par FACs a révélé la présence de RANKL résiduel (utilisé pour la différenciation de ce modèle) à la surface des cellules et l'utilisation d'un anticorps anti-RANKL bloque l'inhibition de l'expression de la MMP-9 induite par l'OPG. Ces résultats suggèrent la possibilité de formation de complexes

trimériques RANK-RANKL-OPG à la surface des cellules. Par ailleurs, des études de liaison par BIAcore, réalisées au laboratoire, ont montré la possibilité formation d'un tel complexe au niveau moléculaire (article IV). Cependant, la présence d'un récepteur spécifique à l'OPG pourrait également être envisagée. Cinq équipes ont montré un effet direct de l'OPG sur l'activité cellulaire [Article I ; Hageda et coll. (1998) ; Kwon et coll. (1998) ; Woo et coll. (2002) ; Moran et coll. (2005)] et d'autres investigations seraient nécessaires pour déterminer le mode d'action de cette cytokine. D'autre part, même si la lignée RAW264.7 ne semble pas le modèle le plus approprié pour l'étude de la différenciation ostéoclastique, l'utilisation de celle-ci confirme la capacité de l'OPG à agir directement sur l'activité biologique de cellules et servira de modèle pour l'étude des mécanismes par lesquels l'OPG exerce son activité. Ce travail d'analyse des mécanismes est développé dans l'article suivant.

Article IV.

Nous avons démontré récemment que l'OPG pouvait aussi agir directement sur les ostéoclastes en régulant l'expression par de protéases impliquées dans la résorption osseuse. Lors de ce travail nous avons montré que l'effet de l'OPG sur l'expression de la MMP-9 dans des cultures primaires d'ostéoclastes purifiés, est aboli par l'utilisation d'un inhibiteur de la voie ras/MAPK. En outre, l'OPG induit la phosphorylation de p38 et de ERK1/2 dans des cultures de RAW264.7. Seule l'activation de p38 était totalement abolie par l'addition d'un anticorps bloquant anti-RANKL ou par un excès de RANK soluble. L'étude des interactions de RANK/RANKL/OPG par résonance plasmonique de surface a révélé la possibilité de formation d'un complexe trimérique RANK-RANKL-OPG. Ces résultats suggèrent la possibilité de formation d'un tel complexe à la surface des ostéoclastes et montrent que l'OPG ne doit plus être considéré seulement comme un récepteur leurre mais comme un effecteur à part entière de régulation des fonctions ostéoclastiques.

Cellular activity and signaling induced by osteoprotegerin in osteoclasts: involvement of receptor activator of nuclear factor κ B ligand and MAPK

S. Theoleyre^{a,1}, Y. Wittrant^{a,1}, S. Couillaud^a, P. Vusio^b, M. Berreur^a,
C. Dunstan^c, F. Blanchard^a, F. Rédini^a, D. Heymann^{a,*}

^aEE 99-01, Pathophysiology of Bone Resorption Laboratory and Therapy of Primitive Bone Tumors,

Medicine Faculty, 1 rue G. Veil, 44035 Nantes cedex 01, France

^bIFR 26, Institut de Biologie, Nantes Hospital, France

^cAmgen Inc., One Amgen Center Drive, Thousand Oaks, CA 91320, USA

Received 22 July 2003; received in revised form 19 September 2003; accepted 15 October 2003

Abstract

Osteoprotegerin (OPG) is a decoy receptor for receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL), an inducer of osteoclastogenesis via its receptor RANK. We recently demonstrated that OPG also exerts a direct effect in osteoclasts by regulating protease expression. Herein, we showed that OPG-induced pro-matrix metalloproteinase-9 activity was abolished by ras/MAPK inhibitors in purified osteoclasts. OPG induced the phosphorylation of p38 and ERK1/2 in RAW264.7 cells. Only p38 activation was totally abolished by a blocking anti-RANKL antibody or an excess of RANKL. Surface plasmon resonance experiments revealed that RANK, RANKL and OPG are able to form a tertiary complex. These results suggested a potential formation of a tertiary complex RANK–RANKL–OPG on osteoclasts. Thus, OPG is not only a soluble decoy receptor for RANKL but must be also considered as a direct effector of osteoclast functions.
© 2003 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Osteoprotegerin; RANKL; Osteoclast; Metalloproteinase; Signaling

1. Introduction

Among the cellular and molecular parameters involved in the bone resorption process [1–3], receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL), a member of the tumor necrosis factor family is the main regulator of osteoclast differentiation [4,5]. Within the bone system, soluble and membrane forms of RANKL expressed by osteoblasts exert their activities through binding to their receptor RANK on osteoclasts [6,7]. The third protagonist, osteoprotegerin (OPG) produced by osteoblasts acts as a decoy receptor for RANKL, preventing it from binding to and activating

RANK [8]. It also inhibits the development of osteoclasts [9] and down-regulates the RANKL signaling through RANK [8]. The biological effects of OPG on bone cells include the inhibition of terminal stages of osteoclast differentiation, suppression of mature osteoclast activation, and induction of apoptosis [7–9].

We recently demonstrated that OPG can also exert a direct biological effect in osteoclasts by inducing proteases and protease inhibitors expression suggesting a more complex regulation of bone resorption by OPG than originally described [10]. These results are consistent with those obtained by Hakeda et al. [11] who reported a direct effect of OPG on isolated osteoclasts via a 140 kDa OPG-binding protein on cell membrane. Whereas OPG exhibits no transmembrane domain, Yun et al. [12] reported the presence of a membrane-bound form of OPG in dendritic cells that may correspond to either a matrix-bound or/and a transmembrane form of the protein. More recently, Standal et al. presented evidence that myeloma cells internalize and

* Corresponding author. Tel.: +33-2-4041-2845; fax: +33-2-4041-2860.

E-mail address: dominique.heyman@sante.univ-nantes.fr (D. Heymann).

¹ Equally contributed to the work.

degrade OPG through its binding to syndecan-1, the major heparan sulfate proteoglycan expressed on myeloma cells [13]. OPG possesses a highly basic heparin-binding domain, making interactions with heparin and heparan sulfates possible, suggesting a new control mechanism for OPG biological activity [14].

The purpose of the present study was (i) to further investigate the direct biological effect of OPG on osteoclasts and the signaling pathways associated, (ii) to better characterize the receptor(s) involved.

2. Experimental procedures

2.1. Cell culture

2.1.1. Purified osteoclast preparation

Purified osteoclasts (purity 95%) were obtained from neonatal rabbit bone cells isolated using a previously reported method [15]. After purification, the osteoclasts were cultured in serum-free α -MEM for 24 h in the absence or presence of 50 ng/ml human OPG (Amgen Inc., Thousand Oaks, USA). In some experiments, before addition of OPG, cells were also preincubated for 1 h in the presence of signaling pathway inhibitors: PI 3 kinase (Wortmannin: 500 nM), tyrosine kinase (Genistein: 200 μ M) (Saint Quentin Fallavier, France), protein kinase A (PKI 5–24: 100 nM), PKC and cAMP-dependent protein kinase (H7 dihydrochloride: 100 μ M), MAPK extracellular signaling-regulated kinase (ERK) kinase (MEK) (PD98059: 40 μ M), Ras (FPT inhibitor II (FPTII): 40 μ M) and p38 MAPK (SB203580: 0.1, 10 μ M) (Calbiochem, La Jolla, USA). Equivalent dilutions of DMSO (reconstitution solution) alone served as control. A dose-response of the different inhibitors was tested previously and the optimal doses were used in this study.

The RAW264.7 cells obtained from Prof. Matsumoto (Saitama, Japan) were maintained in α -MEM without red phenol supplemented with 10% FBS and differentiated in the presence of 50 ng/ml human RANKL (Amgen) for 10 days. Cells were then cultured in serum-free medium for 24 h and incubated for 5 min in the presence or absence of 50 ng/ml RANKL or OPG, with or without 4 μ g/ml anti-human RANKL antibody (R&D System, Abington, UK). In some cases, after serum-free culture period, cells were treated with 50 ng/ml RANKL for 2 h, washed or not before incubation with the combinations described above.

The 293 cells transfected with the full-length cDNA coding for murine RANKL (293-RANKL cells) were a generous gift of Dr. R. Josien (INSERM U437, Nantes, France) and were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS.

2.1.2. Measurement of matrix metalloproteinase activities

After 3 days of culture in α -MEM supplemented with 10% FBS, purified osteoclasts were cultured for 24 h in serum-free α -MEM in the presence or absence of 50 ng/ml OPG. Matrix

metalloproteinase (MMP) activities were then detected in cell culture supernatants by gelatin zymography as previously described [15]. After the culture period (24 h in serum-free α -MEM in the presence or absence of OPG), MMP activities were detected in cell culture supernatants. Electrophoresis gel was composed of 10% polyacrylamide gel containing 0.2% gelatin. Proteinase activity was apparent as unstained regions. The stained polyacrylamide gels were observed with a video camera that allowed transfer to software for image processing (ImageQuant software program) and isolation of migration bands. Gelatinase activity was expressed as a percentage (shades of grey compared to the control). The same experiment was performed by adding 10 μ M EDTA, a chelating agent of bivalent ions, to inhibit MMP activities. In addition, as protein levels were not modified by the different treatments, the same volume of supernatant was assayed in all experiments, allowing strict comparison of the results.

2.1.3. Semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA for cDNA synthesis was isolated from RAW264.7 cells and 293-RANKL cells by phenol–chloroform extraction as previously described [12]. RT-PCR assays were carried out using the following primer pairs for RANKL (5' -CAGCATCGCTCTGTTCCTGTA-3' (sense), 5' -TCTCAGTCTATGCCTGAACCTTTGAAAGC-3' (antisense)); RANK (5' -AAGATGGTTCCAGAAGACGGT-3' (sense), 5' -CATAGAGTCAGTTCTGCTCGGA-3'); MMP-9 (5' -TCTGAGGCCTCTACAGAGTCT-3' (sense), 5' -CTCATGGTCCACCTTGTTTAC-3' (antisense)) and 18S (5' -TCAAGAACGAAAGTCGGAGGTTTCG-3' (sense) and 5' -TTATTGCTCAATCTCGGGTGGCTG-3' (antisense)).

2.1.4. Western blot studies and signal transduction

RAW264.7 cells were lysed in ice-cold lysis buffer (NaCl 150 mM, Tris 50 mM, Nonidet P-40 1%, sodium deoxycholate 0.25%, NaF 1 mM, NaVO₄ 1 mM, leupeptine 10 μ g/ml, aprotinin 10 μ g/ml, phenylmethylsulfonylfluoride 0.5 mM, glycerol 10%). Equal amounts of proteins were resolved on 10% SDS-PAGE, and transferred to a PVDF membrane. After two washes in 0.05% Tween 20/PBS, the membrane was incubated in a saturating solution (0.05% Tween 20/3% BSA/PBS) for 30 min, the levels of phosphorylated ERK1/2 and p38 were detected with specific antibodies (Ozyme Saint-Quentin en Yvelines, France) as well as total ERK1/2 and p38 (R&D System).

2.1.5. Surface plasmon resonance studies

These experiments were performed with the BIAcore 2000 optical biosensor (BIAcore, Uppsala, Sweden). Soluble human RANK (sRANK) (Promocell, Heidelberg, Germany) was covalently coupled through its primary amino groups to a carboxymethyl dextran flow cell (CM5, BIAcore) as recommended by the manufacturer. All binding experiments were performed at a flow rate of 10 μ l/min. The

resonance signal measured on the control flow cell was subtracted from the signal measured on the experimental flow cell. The resulting sensorgrams were analyzed using the BIAEvaluation software (BIACore).

2.1.6. Statistical analysis

The mean $\pm$ S.D. was calculated for all conditions and compared by ANOVA. Differences relative to a probability of two-tailed $P < 0.05$ were considered significant.

3. Results

3.1. OPG enhances proMMP-9 activity of purified osteoclasts by the ras/MAPK pathway

To determine the signaling pathways by which OPG exerts its effects on osteoclasts, the modulation of OPG-induced proMMP-9 activities was studied in the presence of specific inhibitors of different intracellular signaling pathways. Tyrosine kinase inhibitor (Genistein), PKC and cAMP-dependent protein kinase inhibitor (H7) and Ras inhibitor (FPT inhibitor II) completely abolished OPG-induced stimulation of proMMP-9 (Fig. 1A). Conversely, PI 3 kinase inhibitor (Wortmannin) and protein kinase A inhibitor (PKI 5–24) did not prevent OPG effects (data not shown). In this context, two synthetic MAPK inhibitors (SB203580 and PD98059 inhibitors of p38 and MEK, respectively) have been studied (Fig. 1B). Thus, pretreatment with SB203580 inhibited the OPG-induced proMMP-9 activity in a dose-dependent manner. Similarly, 40 μ M of PD98059 completely abolished the OPG-induced proMMP-9 activity. Both inhibitors did not affect pro-MMP-9 activity of non-stimulated osteoclasts (not shown). These results demonstrated that the ras/MAPK signaling is required for OPG to stimulate osteoclast proMMP-9 activity.

3.2. OPG induces phosphorylation of ERK1/2 and p38 in differentiated RAW264.7 cells

To further explore the MAPK involvement in cellular activities induced by OPG on osteoclasts, we employed the RAW264.7 cells. Indeed, this cell line is known to express RANK and differentiate into tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and calcitonin receptor-positive cells when cultured in the presence of RANKL [16]. Moreover, the large amounts of cellular materials obtained from RAW264.7 cell cultures allow to perform signal transduction studies which were impossible on purified osteoclasts. RAW264.7 cells were differentiated in the presence of RANKL for 10 days and then RANKL- and serum-deprived for 24 h. OPG signaling studies were then monitored on by Western blot analyses using phosphospecific antibodies. Interestingly, treatment with 50 ng/ml OPG caused phosphorylation of ERK1/2 (Fig. 2A) and p38 (Fig. 2B) detectable within 2 min, whereas total ERK1/2 and p38

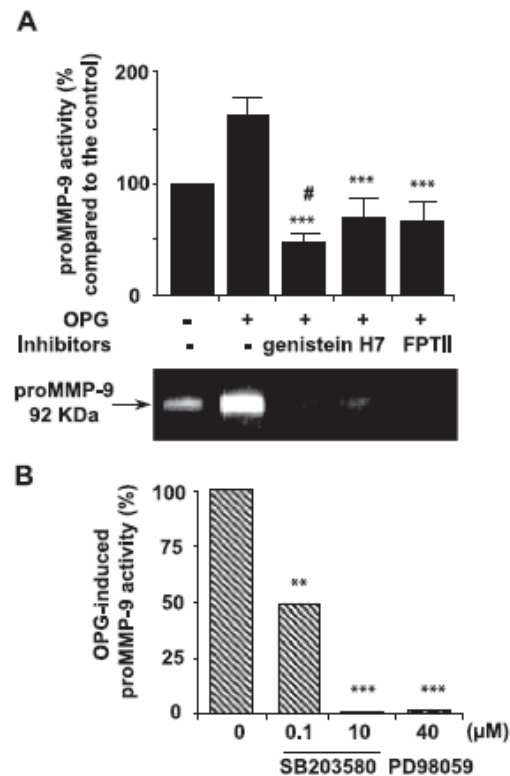


Fig. 1. Inhibition of OPG-induced proMMP-9 activity on purified osteoclasts by ras/MAPK inhibitors. Purified osteoclasts were cultured in the absence or presence of 50 ng/ml OPG, in association or not with different signaling pathway inhibitors: Genistein 200 μ M (tyrosine kinase inhibitor), H7 100 μ M (PKC- and cAMP-dependent protein kinase inhibitor), FPTII 40 μ M (Ras inhibitor) (A) or PD98059 40 μ M (MEK inhibitor), SB203580 0.1 and 10 μ M (p38 inhibitor) (B). Metalloproteinase activity was determined using a gelatin zymographic assay. Results are the mean $\pm$ S.D. of five separate cultures tested. ** $P < 0.001$ *** $P < 0.0001$ compared to OPG alone, # $P < 0.05$ compared to the untreated control.

were unchanged. The phosphorylation of ERK1/2 induced by OPG reached maximum after 5–10 min and thereafter gradually slightly decreased (Fig. 2A). The phosphorylation of p38 reached maximum after 10 min (Fig. 2B). We confirmed that differentiated RAW264.7 cells expressed RANK (Fig. 3A, lane 3) but not RANKL (Fig. 3A, lane 2) mRNA transcripts as compared to a positive control (293-RANKL cells, Fig. 3A, lane 1). Since RANKL is known to activate similar signaling pathways [16,17], we conducted same experiments in the presence of RANKL and confirmed the ability of RANKL to induce both ERK1/2 and p38 MAPKs activation in RAW264.7 cells (Fig. 3B, lane 3 compared to the control lane 1). Since (i) OPG was classically described as one of the ligands for RANKL and (ii) RAW264.7 cells have been differentiated in the presence of 50 ng/ml of soluble RANKL, similar experiments were performed in the presence of anti-RANKL antibody, to test the hypothesis that OPG could act on osteoclasts via

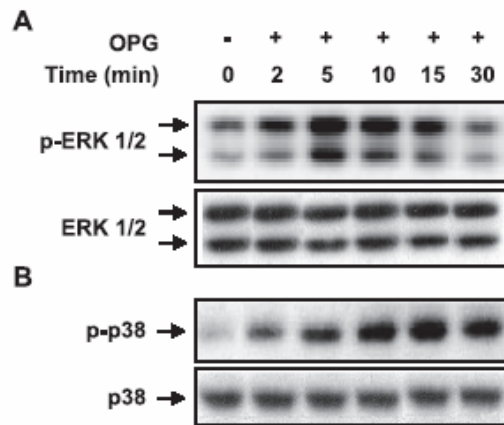


Fig. 2. OPG induced phosphorylation of ERK1/2 and p38 in RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were treated with 50 ng/ml OPG and collected after the indicated time, followed by immunoblotting using anti-phospho-ERK1/2 (A) or -p38 (B). Cell lysates were also subjected to Western blot analysis with anti-ERK1/2 and anti-p38 antibodies to demonstrate equal loading.

RANKL. Anti-RANKL antibody totally abolished the OPG-induced phosphorylation of p38 but only slightly inhibited the activation of ERK1/2 (Fig. 3B, lane 4 compared to the OPG condition lane 2). To elucidate the role of RANKL in OPG-induced biological activity, p38 activation was monitored on differentiated RAW264.7 cells that were RANKL- and serum-deprived for 24 h and then further treated with RANKL for 2 h. In the first approaches, extensive washing were done before signaling analysis to remove free RANKL excess but potentially not specific RANKL bound to membrane RANK. When the RAW264.7 cells are not rinsed, the excess of free RANKL abolished the OPG-induced p38 phosphorylation (Fig. 3C, lanes 1 and 2). This OPG-induced p38 activation persisted when free RANKL was removed before OPG treatment (cell cultures washed) (Fig. 3C, lane 3 compared to the control lane 1) and was totally inhibited by the addition of blocking anti-RANKL antibody (Fig. 3C, lane 4 compared to the OPG condition lane 3). Biological activity of OPG on MMP-9 expression was also totally abolished in the presence of blocking anti-RANKL antibody (data not shown). These overall results showed that OPG exerts a cellular activity dependent on the presence of RANKL associated with osteoclasts, demonstrating that OPG is not only a soluble decoy receptor for RANKL as described in the literature [4].

3.3. OPG, RANKL and RANK are able to form a heteromolecular complex

As the above results demonstrated, a biological effect of OPG on osteoclasts, dependent on the presence of RANKL, and as RANKL is the natural ligand of RANK [7], we wondered whether OPG could bind to the complex RANKL–RANK present at the osteoclast membrane. We

investigated the molecular interactions between OPG, RANKL and RANK by surface plasmon resonance technique. We confirmed that RANKL bound to immobilized RANK (Fig. 4A,B). Analyses of the kinetic association and dissociation curves allowed the calculation of the dissociation constant $K_d = 2.05$ nM. While OPG did not bind to immobilized RANK (Fig. 4B), it bound to the preformed RANKL–RANK complex with a $K_d = 5.2$ nM (Fig. 4A), then consti-

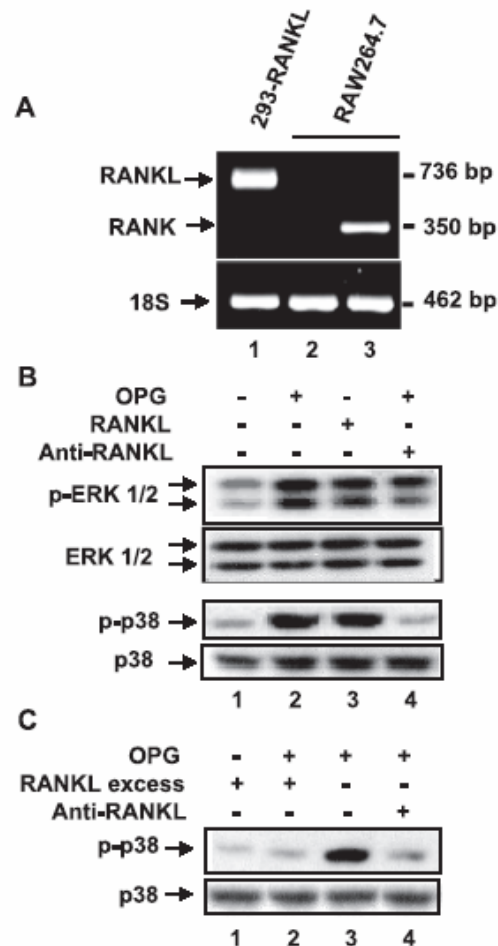


Fig. 3. OPG-induced phosphorylation of ERK1/2 but not p38 is dependent on RANKL in RAW264.7 cells. (A) RT-PCR analyses of RANK, RANKL and 18S message levels were performed in RAW264.7 cells and in 293-RANKL cells. RNA were isolated from RAW264.7 cells differentiated 10 days in the presence of 50 ng/ml RANKL. Lane 1: RT-PCR reaction for RANKL on a positive control (293-RANKL cells); RT-PCR reactions on RAW264.7 cells for RANKL (lane 2) and for RANK (lane 3). (B) ERK1/2 and p38 phosphorylation was analyzed on differentiated RAW264.7 cells treated for 10 min with 50 ng/ml RANKL or OPG in the presence or absence of 4 μ g/ml blocking anti-RANKL antibody. (C) The OPG-induced p38 activation was analyzed in the presence or absence of free RANKL excess and blocking anti-RANKL antibody. Cell lysates were also subjected to Western blot analysis with anti-ERK1/2 and/or anti-p38 antibodies to demonstrate equal loading (B and C).

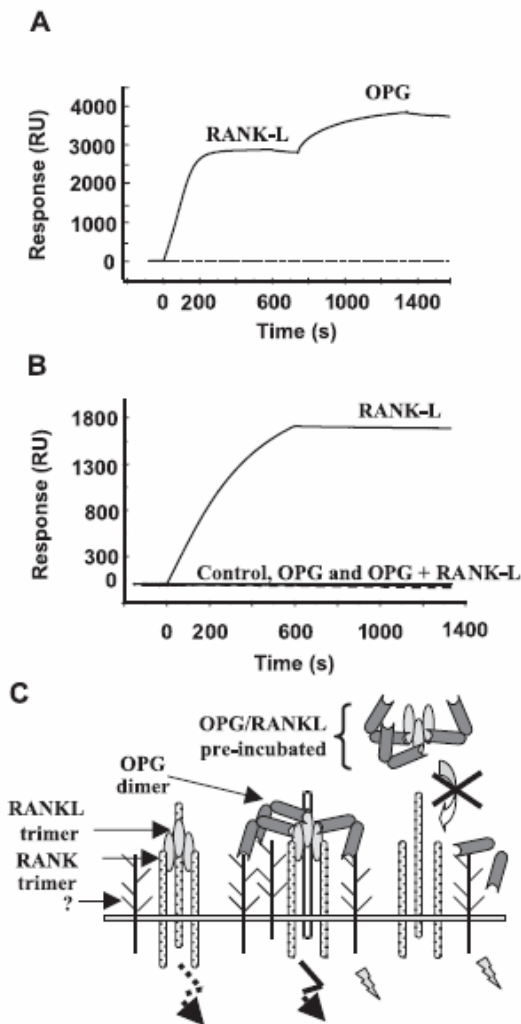


Fig. 4. Formation of a hetero-molecular complex between RANK, RANKL, and OPG studied by surface plasmon resonance experiments. Binding of 250 nM (7.75 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (A) or 125 nM (3.87 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (B) RANKL and 110 nM (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) OPG successively (A) or after pre-incubation for 1 h at 37 $^{\circ}\text{C}$ (B) to RANK was carried out. Schematic diagrams of RANK–RANKL–OPG molecular interactions is shown in (C). Trimer RANKL can bind to the trimer RANK expressed on the osteoclast cell membrane (left), then inducing specific signal transduction (arrow). Dimer OPG could interact on the RANKL–RANK complex to form a tertiary complex that could activate two different signal transduction pathways via this tertiary complex and an undermined molecule (?) (middle). OPG acts as a decoy receptor when it is preincubated with RANKL (right).

tuting a tertiary complex OPG–RANKL–RANK (Fig. 4C). Moreover, the preincubation of OPG with RANKL abolished the capability of RANKL to further bind to immobilized RANK (Fig. 4B), confirming the role of decoy receptor for OPG described in the literature. These results allow to explain the OPG biological activity on osteoclasts through the formation of a tertiary complex OPG–RANKL–RANK.

4. Discussion

The molecular triad OPG–RANKL–RANK play a pivotal role in bone resorption regulation [7,9]. The results of the present study demonstrate for the first time, that in addition to be a decoy receptor for RANKL, OPG also induces ras-MAPK activation on osteoclasts. Moreover, the OPG-induced phosphorylations on osteoclast-like cells are dependent on RANKL bound to the cell membrane, and OPG–RANKL–RANK can constitute a hetero-molecular complex as demonstrated by surface plasmon resonance technique.

First evidence of an OPG binding on eucaryote cells was given by Kwon et al. [18]. These authors identified a new molecule named TNF receptor-like molecule 1 (TR1) which exerted direct biological activities including osteoclastogenesis inhibition and fibroblast proliferation. In fact, this molecule is identical to OPG. Scatchard analyses showed two classes of high and medium affinity receptors for TR1 with K_D of approximately 45 and 320 pM. More recently, three different isoforms of the OPG-ligand, RANKL were expressed in osteoblastic cells, two of them as transmembrane molecules and the third one, as a soluble protein [19]. If the expression of membrane-associated RANKL may represent the specific high affinity “receptor” for OPG reported by Kwon et al., the medium affinity receptors need to be further characterized. Standal et al. [13] reported that OPG can bind to heparan sulfate proteoglycans in myeloma cells, evidencing a new potential binding molecule for OPG. Proteoglycans have already been shown to mediate the binding and the internalization of several extracellular ligands [20] with affinity binding compatible to those observed for TR1 [18]. Other experiments performed by Reiland et al. [21] demonstrated that pervanadate activates intracellular kinases leading to tyrosine phosphorylation of syndecan-1. It has been proposed that cell surface proteoglycans as syndecans exert putative functions as growth factor co-receptors, influencing the activation of various tyrosine kinase receptor [22]. In light of the above data, it can be suggested that OPG binds to membrane RANKL and/or to cell surface heparan sulfate proteoglycans.

However, the mechanisms by which OPG exerts its biological activity as well as the nature of its molecular interactions with osteoclasts are not well defined. Hakeda et al. [11] reported the first evidence of a direct biological activity of OPG on isolated osteoclasts via a 140 kDa OPG-binding protein. The exact nature of OPG receptors on osteoclasts was not further characterized but RANKL, as one putative OPG receptor has been evinced since it is not expressed by osteoclasts. However, the production of RANKL by contaminating stromal cells cannot be excluded. Direct biological activities of OPG on osteoclasts were recently confirmed by Wittrant et al. [10] who demonstrated that in purified osteoclasts, OPG enhanced proMMP-9 activity among several other parameters (TRAP, TIMP, cathepsin K). The present study reveals that OPG stim-

ulates proMMP-9 activity of osteoclasts by the ras/MAPK pathway.

RAW264.7 cells differentiated in the presence of RANKL, express osteoclast markers (RANK, TRAP, calcitonin receptor, cathepsin K) and allow to demonstrate the OPG-induced ERK1/2 and p38 phosphorylations. Although these cells did not express RANKL, blocking anti-RANKL antibody totally abolished p38 activation and slightly reduced ERK1/2 activation, demonstrating OPG signaling pathways dependent on RANKL. RANKL has been already shown to induce specific signal transduction pathways in osteoclasts through its binding to membrane RANK, especially p38 [16,23] and ERK1/2 [17,23]. In the RAW264.7 cells, soluble RANKL used to induce osteoclastogenesis is bound to its receptor RANK present at the osteoclast cell surface and OPG may bind to the preformed complex RANKL–RANK, then re-inducing p38 activation. The potential formation of a tertiary complex RANK–RANKL–OPG is supported by the results of the surface plasmon resonance studies, which revealed that OPG can bind to the preformed complex RANKL–RANK. These results allow to explain the direct OPG biological activity on purified osteoclasts and differentiated RAW264.7 cells through the formation of a hetero-molecular complex OPG–RANKL–RANK (Fig. 3C). However, the slight inhibition of OPG-ERK1/2 activation by an anti-RANKL antibody suggests the potential existence of a second binding site which is still undetermined. In this context, proteoglycans such as syndecan-1 that can be phosphorylated by intracellular tyrosine kinase may be good candidates ([21], Fig. 4C). In addition, OPG-induced MMP-9 activity on purified osteoclasts is abolished by a tyrosine kinase inhibitor (Fig. 1), reinforcing this hypothesis. Recently, Hotokezaka et al. [17] demonstrated that osteoclastogenesis is regulated under a balance between ERK and p38 pathways. In their system, ERK pathway negatively regulates osteoclastogenesis while p38 pathway is involved as a positive control. In our study, OPG-induced ERK1/2 phosphorylation independently of RANKL could strengthen the specific inhibitory activity of OPG on osteoclastogenesis via a similar balance [8].

Thus, OPG induces MAPK phosphorylation via RANKL and acts as a decoy receptor. This dual function of OPG could depend on its association sequence of both molecules. Indeed, when OPG binds to RANKL before RANKL binding to membrane RANK, it acts as a decoy receptor (case of stromal cells which expressed membrane RANKL but not RANK or soluble form of RANKL). In the case where RANKL binds to RANK on osteoclast membrane before its interaction with OPG, OPG could form a hetero-tertiary complex on osteoclasts, therefore inducing MAPK phosphorylations.

In conclusion, the present study demonstrated for the first time that OPG stimulates proMMP-9 activity of osteoclasts via the ras/MAPK pathway involving p38 and ERK1/2 phosphorylations. Moreover, OPG-induced MAPK pathway

depends on RANKL. These data strengthened by the surface plasmon resonance analyses suggest the potential formation of a tertiary complex RANK–RANKL–OPG on osteoclasts. These overall results demonstrated that OPG is not only a soluble decoy receptor for RANKL as described in the literature but must be also considered as a direct effector of osteoclast functions.

Acknowledgements

This work was supported by a CReS INSERM no. 4CR06F, by a grant from the French Ministry of Research and Technology (TS/02 2 0044) and by a grant from the Loire-Atlantique Committee of the Ligue Contre le Cancer. S. Théoleyre and Y. Wittrant received, respectively, a fellowship from the Loire-Atlantique Committee of the Ligue Contre le Cancer and from the Région of Pays de Loire.

References

- [1] A.V. Rousselle, D. Heymann, Osteoclastic acidification pathways during bone resorption, *Bone* 30 (2002) 533–540.
- [2] J.M. Delaissé, G. Vaes, in: B.R. Rifkin, C.V. Gay (Eds.), *Biology and Physiology of Osteoclast*, CRC Press, Boca Raton, 1992, pp. 289–314.
- [3] D. Heymann, J. Guicheux, F. Gouin, N. Passuti, G. Daculsi, Cytokines, growth factors and osteoclasts, *Cytokine* 10 (1998) 155–168.
- [4] D.L. Lacey, E. Timms, H.L. Tan, M.J. Kelley, C.R. Dunstan, T. Burgess, R. Elliott, A. Colombero, G. Elliott, S. Scully, H. Hsu, J. Sullivan, N. Hawkins, E. Davy, C. Capparelli, A. Eli, Y.X. Qian, S. Kaufman, I. Sarosi, V. Shalhoub, G. Senaldi, J. Guo, J. Delaney, W.J. Boyle, Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation, *Cell* 93 (1998) 165–176.
- [5] H. Yasuda, N. Shima, N. Nakagawa, K. Yamaguchi, M. Kinosaki, S. Mochizuki, A. Tomoyasu, K. Yano, M. Goto, A. Murakami, E. Tsuda, T. Morinaga, K. Higashio, N. Udagawa, N. Takahashi, T. Suda, Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 7–3607.
- [6] H. Hsu, D.L. Lacey, C.R. Dunstan, I. Solovyev, A. Colombero, E. Timms, H.L. Tan, G. Elliott, M.J. Kelley, I. Sarosi, L. Wang, X.Z. Xia, R. Elliott, L. Chiu, T. Black, S. Scully, C. Capparelli, S. Morony, G. Shimamoto, M.B. Bass, W.J. Boyle, Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 3540–3545.
- [7] L.E. Theill, W.J. Boyle, J.M. Penninger, RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution, *Annu. Rev. Immunol.* 20 (2002) 795–823.
- [8] W.S. Simonet, D.L. Lacey, C.R. Dunstan, M. Kelley, M.S. Chang, R. Luthy, H.Q. Nguyen, S. Wooden, L. Bennett, T. Boone, G. Shimamoto, M. DeRose, R. Elliott, A. Colombero, H.L. Tan, G. Trail, J. Davy, E. Davy, N. Bucay, L. Renshaw-Gegg, T.M. Hughes, D. Hill, W. Pattison, P. Campbell, S. Sander, G. Van, J. Tarpley, P. Derby, R. Lee, Amgen EST Program, W.J. Boyle, Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density, *Cell* 89 (1997) 309–319.
- [9] E. Grimaud, F. Rédini, D. Heymann, Osteoprotegerin: a new agent for the treatment of bone disease, *Drug Discov. Today* 6 (2002) 1241–1242.

- [10] Y. Wittrant, S. Couillaud, S. Théoleyre, C. Dunstan, D. Heymann, F. Rédini, Osteoprotegerin differentially regulates protease expression in osteoclast cultures, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293 (2002) 38–44.
- [11] Y. Hakoda, Y. Kobayashi, K. Yamaguchi, H. Yasuda, E. Tsuda, K. Higashio, T. Miyata, M. Kumegawa, Osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) directly inhibits bone-resorbing activity of isolated mature osteoclasts, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251 (1998) 796–801.
- [12] T.J. Yun, P.M. Chandhary, G.L. Shu, J.K. Frazer, M.K. Ewings, S.M. Schwartz, V. Pascual, L.E. Hood, E.A. Clark, OPG/FDCR-1, a TNF receptor family member, is expressed in lymphoid cells and is up-regulated by ligating CD40, *J. Immunol.* 161 (1998) 6113–6121.
- [13] T. Standal, C. Seidel, O. Hjertner, T. Plesner, R.D. Sanderson, A. Borset, M. Borset, A. Sundan, Osteoprotegerin is bound, internalized, and degraded by multiple myeloma cells, *Blood* 100 (2002) 3002–3007.
- [14] K. Yamaguchi, M. Kinoshita, M. Goto, F. Kobayashi, E. Tsuda, T. Morinaga, K. Higashio, Characterization of structural domains of human osteoclastogenesis inhibitory factor, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 5117–5123.
- [15] A.V. Rousselle, C. Damien, Y. Fortun, N. Passuti, M. Padriès, D. Heymann, Human growth hormone stimulates proteinase activities of rabbit bone cells via IGF-I, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268 (2000) 875–881.
- [16] M. Matsumoto, T. Sudo, T. Saito, H. Osada, M. Tsujimoto, Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway in osteoclastogenesis mediated by receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL), *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 31155–31161.
- [17] H. Hotokezaka, E. Sakai, K. Kanaoka, K. Saito, K. Matsuo, H. Yoshida, N. Yoshida, K. Nakayama, U0126 and PD98059, specific inhibitors of MEK, accelerate differentiation of RAW264.7 cells into osteoclast-like cells, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 47366–47372.
- [18] B.S. Kwon, S. Wang, N. Udagawa, V. Haridas, Z.H. Lee, K.K. Kim, K.O. Oh, J. Greene, Y. Li, J. Su, R. Gentz, B.B. Aggarwal, J. Ni, TR1, a new member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, induces fibroblast proliferation and inhibits osteoclastogenesis and bone resorption, *FASEB J.* 12 (1998) 845–854.
- [19] T. Ikeda, M. Kasai, M. Utsuyama, K. Hirokawa, Determination of three isoforms of the receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and their differential expression in bone and thymus, *Endocrinology* 142 (2001) 1419–1426.
- [20] M. Roghani, D. Moscatelli, Basic fibroblast growth factor is internalized through both receptor-mediated and heparan sulfate-mediated mechanisms, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 22156–22162.
- [21] J. Reiland, V.L. Ott, C.S. Lebakken, C. Yeaman, J. McCarthy, A.C. Rapraeger, Pervanadate activation of intracellular kinases leads to tyrosine phosphorylation and shedding of syndecan-1, *Biochem. J.* 319 (1996) 39–47.
- [22] M. Bernfield, R. Kokenyesi, M. Kato, M.T. Hinkes, J. Spring, R.L. Lise, E.J. Lise, Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans, *Annu. Rev. Cell Biol.* 8 (1992) 365–393.
- [23] S.E. Lee, K.M. Woo, S.Y. Kim, H.M. Kim, K. Kwack, Z.H. Lee, H.H. Kim, The phosphatidylinositol 3-kinase, p38 and extracellular signal-regulated kinase pathways are involved in osteoclast differentiation, *Bone* 30 (2002) 71–77.

Complément de discussion à l'article IV.

Les résultats présentés dans cet article démontrent pour la première fois qu'en plus de son rôle de récepteur leurre pour RANKL, OPG induit également l'activation de la voie ras/MAPK dans des ostéoclastes. De plus, les phosphorylations induites par l'OPG dans des cellules ostéoclastiques sont en partie dépendantes de RANKL et des expériences de BIAcore montrent que l'OPG peut lier le complexe RANK-RANKL pour former un hétéro trimère.

Ainsi, cet article apporte deux nouveaux arguments pour expliquer les mécanismes par lesquels l'OPG exerce son activité biologique directe et suggère : (i) la possibilité de formation d'un hétéro trimère OPG-RANK-RANKL, (ii) la présence d'un récepteur spécifique à l'OPG.

Kwon et coll. furent les premiers à identifier une nouvelle molécule TR1 (OPG) capable d'inhiber directement la formation ostéoclastique et la prolifération fibroblastique [Kwon et coll. (1998)]. Dans le premier article présenté nous avons montré la capacité de l'OPG à stimuler directement l'activité de la proMMP-9 par des ostéoclastes matures. Les travaux présentés dans l'article révèlent que la régulation de l'activité de la proMMP-9 par l'OPG est dépendante de la voie ras/MAPK.

Par ailleurs, le modèle différencié de cellules RAW264.7 a permis de mettre en évidence l'inhibition des effets de l'OPG en présence d'un anticorps anti-RANKL, suggérant un effet de l'OPG dépendant de RANKL. Lors de cette étude, l'utilisation de l'anticorps anti-RANKL dans le même modèle montre une annulation de la phosphorylation de p38 et une faible réduction de celle de ERK1/2 induite par OPG. La technique de BIAcore a confirmé la possibilité de formation d'un hétéro trimère OPG-RANK-RANKL.

Lorsque le récepteur des cellules T (TCR) reconnaît directement un antigène étranger, la cellule T rentre en anergie et est éliminée. Lorsque cet antigène est présenté au TCR dans un contexte CMH en présence de molécules de co-stimulation, la cellule T reçoit des signaux

activateurs pour initier sa réponse immunitaire [Janeway et coll. (1996)]. Sur la base de ce principe, une corrélation pourrait être établie avec les molécules OPG, RANK et RANKL. En effet, l'activité ostéoclastique différente selon la présence de RANKL ou d'OPG pourrait s'expliquer par formation du dimère RANKL/RANK ou du trimère OPG/RANKL/RANK. Ce concept est d'autant plus rationnel que les cytokines OPG, RANK et RANKL sont impliquées dans la régulation des mécanismes immuns, cependant, la réalité biologique de cet hétéro-trimère reste à démontrer.

Cependant la phosphorylation résiduelle de ERK1/2 en présence de l'anticorps suggère la présence d'une autre voie de signalisation mise en jeu par un récepteur spécifique à l'OPG.

Standal et coll. ont montré la possibilité de liaison de l'OPG, par son domaine « heparin binding domain », à des protéoglycanes de surface dont le syndécan-1 (composé de chaînes d'héparane sulfate) dans des cellules de myélome. En outre, Modrowski et coll. ont mis en évidence que le syndécan-2 sert de récepteur au GM-CSF et transduit un signal mitogène dans des ostéoblastes primaires humain [Modrowski et coll. (2000)]. Le syndécan-4, récemment identifié comme le récepteur de la cytokine CXCL12 dans les cellules HeLa, active la voie des tyrosines-kinases [Charnaux et coll. (2005)]. Ainsi, la possibilité d'activation, par le syndécan-1, des tyrosine-kinases intra-cellulaires et l'inhibition de la régulation de l'activité de la proMMP-9 dans des cultures d'ostéoclastes purifiés par l'utilisation d'un inhibiteur de tyrosine kinase font du syndécan-1 un candidat sérieux en tant que récepteur spécifique de l'OPG. Par ailleurs, la capacité de ces protéoglycanes à lier d'autres facteurs de croissance pour réguler leur activité biologique (internalisation, co-récepteur, activation de récepteurs tyrosine-kinase) a été largement décrit dans la littérature. Par conséquent, le syndécan-1 pourrait également jouer un rôle en tant que co-récepteur pour la formation d'un trimère OPG/RANKL/RANK actif, à l'image du rôle des molécules de co-stimulation B7.1 et B7.2 lors de l'activation lymphocytaire. Cependant, des études récentes

par BIAcore menées dans notre laboratoire montrent que l'héparine inhibe la fixation de l'OPG sur le complexe RANKL/RANK. Néanmoins, la nécessité d'un co-récepteur a été étendu à l'activation de RANK. En effet, Koga et coll. ont montré que le récepteur gamma au fragment Fc et la molécule DAP12 délivrent des signaux essentielles lors de la stimulation de RANK par RANKL [Koga et coll. (2004)].

Nos données suggèrent que l'action directe de l'OPG pourrait être due notamment à la formation d'un hétéro trimère OPG-RANK-RANKL, ou à la présence d'un récepteur spécifique à l'OPG, qui pourrait être le syndécan-1. Ces résultats montrent que l'OPG ne doit plus être seulement considéré comme un récepteur leurre, mais également comme un régulateur à part entière des fonctions ostéoclastiques.

Synthèse et conclusions de la première partie.

Les travaux décrits dans cette première partie montrent que le rôle de l'OPG n'est pas restreint à celui qui lui est classiquement attribué, à savoir l'inhibition de la fixation de RANKL à son récepteur RANK. En effet, l'OPG est également capable d'agir directement sur l'ostéoclaste pour moduler ses activités cellulaires notamment l'expression et l'activité de protéases majeures impliquées dans la résorption osseuse. Ces effets directs de l'OPG ont été confirmés dans les deux modèles ostéoclastiques utilisés pour cette étude : la culture primaire d'ostéoclastes purifiés de lapereaux et la culture de cellules murines RAW264.7 différenciées. En raison de la rareté des outils d'analyse chez le lapin, la lignée de précurseurs ostéoclastiques murins RAW264.7 a été utilisée afin d'approfondir les travaux précédemment présentés. Même si ce modèle « osteoclast-like » ne montre pas de corrélation de l'activité biologique de l'OPG avec celle observée dans les cultures d'ostéoclastes de lapereaux, le modèle de différenciation ostéoclastique RAW264.7 a permis de mettre en évidence la possibilité de l'OPG à médier ses effets via sa fixation à RANKL. Par ailleurs, les résultats obtenus ont démontré une action plus importante de l'OPG et de RANKL sur des cellules différenciées.

La détermination des mécanismes par lesquels l'OPG exerce ses effets a été l'objet de travaux réalisés à la fois sur des cultures primaires ostéoclastiques et sur la lignée RAW264.7. Les résultats obtenus démontrent que l'OPG active la voie des ras/MAPKinases (ERK1/2 et p38). Cette stimulation est en partie la conséquence de la fixation de l'OPG à RANKL à la surface des cellules (suggérant la formation d'un hétéro-trimère OPG-RANKL-RANK), mais également de la fixation de l'OPG directement sur un récepteur spécifique qui pourrait être un protéoglycane de surface tel que le syndecan1. Par ailleurs des expériences de BIAcore réalisées au laboratoire ont confirmé *in vitro* la possibilité de formation d'un complexe

moléculaire trimérique OPG-RANKL-RANK et l'implication des protéoglycannes dans la régulation de l'activité biologique de l'OPG (inhibition de la fixation de l'OPG sur RANKL). Les résultats présentés dans le second article montrent que RANKL régule également la synthèse, par des ostéoclastes purifiés et matures, de protéases impliquées dans la dégradation de la matrice osseuse. Ainsi, l'ensemble de ces travaux mettent en évidence de nouvelles données concernant les activités biologiques de l'OPG et de RANKL (expression et activité des protéases impliquées dans la résorption osseuse / action directe de l'OPG / signalisation intra-cellulaire induite par l'OPG). Ces travaux confirment en parité les actions pro- et anti-résorptives, respectivement pour RANKL et l'OPG. Cependant, le rôle de chacune de ces deux cytokines n'apparaît pas restreint à cette dualité, et l'analyse des résultats montre que l'OPG et RANKL sont capables d'activités biologiques à la fois opposées (classiquement décrit dans la littérature) et similaires sur l'activité cellulaire d'ostéoclastes primaires. Cette étude contribue à étendre les connaissances de l'activité de ces cytokines sur la biologie de l'ostéoclaste. Cependant, en raison de l'implication des protéases Cathepsine K et MMP-9 dans le développement invasif tumoral osseux, le potentiel thérapeutique de cette triade moléculaire dans le traitement des tumeurs osseuses reste à définir. Par conséquent, la prospection des données connues sur l'implication de ces cytokines dans le développement tumoral apparaît indispensable et préalable à la mise en place de protocole d'expérimentation, afin de tester l'influence de ces molécules sur l'activité biologique de lignées cellulaires tumorales ainsi que sur le développement tumoral *in vivo*.

Introduction à la seconde partie.

L'équilibre apposition/résorption osseuse est largement affecté lors de pathologies tumorales primaires telles que l'ostéosarcome. Un des objectifs de cette thèse était de développer de nouveaux protocoles thérapeutiques des tumeurs osseuses primitives utilisant l'OPG, RANK ou RANKL. Les données recueillies lors des travaux décrits dans la première partie de cette thèse ont été confrontées à d'autres données de la littérature, nous permettant ainsi de définir des orientations potentielles, quant à l'utilisation de ces cytokines en tant que cibles thérapeutiques [Wittrant et coll (2004) ; Theoleyre et coll. (2004)]. Afin de confirmer ces orientations, des modèles expérimentaux spécifiques, tels que le modèle murin d'ostéosarcome POS-1 et le modèle d'ostéosarcome de rat OSRGa ont été utilisés au sein de notre laboratoire. La lignée POS-1 nous a permis de caractériser ce modèle sur le plan phénotypique et d'évaluer *in vitro* les effets de RANKL sur l'activité biologique de ces cellules tumorales [Article V]. En outre, la mise au point de protocoles de thérapie génique par l'utilisation de différentes constructions d'OPG et de RANK soluble a été entreprise sur le modèle d'ostéosarcome de rat au moyen de constructions recombinantes virales contenant les transgènes d'intérêt.

Par ailleurs, il est important de noter que l'ensemble des travaux d'expérimentation animale, présentés dans la suite de cet ouvrage, ont été réalisés à l'Unité de Thérapeutique Expérimentale de la Faculté de Médecine de Nantes en conformité avec la législation et la réglementation éthique en vigueur. En outre, pour le respect des animaux, le nombre d'individus inclus dans les séries contrôles n'a jamais trouvé d'autre justification que celle d'obtenir des résultats significatifs et satisfaisants afin d'éviter la répétition d'expérimentation inutiles. De plus, les animaux sont euthanasiés dès l'apparition des premiers signes de souffrance.

Article V.

Les modèles animaux de développement tumoral sont des outils essentiels pour mieux caractériser les mécanismes par lesquels une tumeur évolue au sein d'un tissu. Dans cet article, le modèle murin d'ostéosarcome POS-1 a été utilisé pour l'analyse des paramètres cellulaires et moléculaires impliqués dans la croissance de tumeurs osseuses primaires associées à une dissémination métastatique pulmonaire. La lignée cellulaire POS-1 dérive du développement spontané d'un ostéosarcome dans la souche murine C3H, dont l'évolution clinique est comparable à l'homme. Cette lignée a été caractérisée *in vitro* par sa capacité de minéralisation et l'expression de marqueurs osseux en comparaison de cultures d'ostéoblastes primaires et de moelle osseuse. Les résultats révèlent notamment un défaut de minéralisation de cette lignée d'ostéosarcome et la présentation par ces cellules d'un phénotype indifférencié par l'expression de marqueurs à la fois ostéoblastiques (OPG et Cbfa1) et ostéoclastiques (TRAP, Cathepsine K et RANK). En raison de l'expression inattendue par cette lignée d'origine ostéoblastique de RANK, exprimé principalement par les ostéoclastes et les cellules dendritiques, des tests ont été réalisés afin de déterminer la fonctionnalité de ce récepteur par l'étude de l'activité biologique de son ligand RANKL. Les résultats ont révélé une augmentation du taux de phosphorylation de ERK, une induction du taux de transcription et d'expression de la BMP-2 ainsi qu'une diminution de la prolifération cellulaire en présence de 100ng/ml de hRANKL.

La présence de l'inhibiteur synthétique UO126, spécifique de la voie ERK, abolit l'effet de hRANKL sur l'induction de l'expression de la BMP-2. Par ailleurs, un excès de RANK soluble bloque l'induction de l'expression de BMP-2, démontrant que l'activité biologique de RANKL observée dans la lignée POS-1 est médiée par son récepteur et donc que celui-ci est fonctionnel dans cette lignée d'ostéosarcome murin.

C'est la première mise en évidence de l'expression de RANK dans une lignée d'ostéosarcome et de la fonctionnalité de ce récepteur.

Article soumis à International Journal of Oncology :

Rank directly induces bone morphogenetic protein-2 expression in RANK-expressing POS-1 osteosarcoma cells

Complément de discussion à l'article V.

L'ostéosarcome est une tumeur osseuse primitive maligne dont les limites des traitements actuels justifient l'utilisation de modèles animaux pour la mise au point de nouvelles approches thérapeutiques. Le modèle POS-1, dont l'évolution clinique est comparable à l'homme, dérive du développement spontané d'un ostéosarcome dans la souche murine C3H et permet l'analyse des paramètres cellulaires et moléculaires impliqués dans la croissance de tumeurs osseuses primaires associées à une dissémination métastatique pulmonaire. Les ostéosarcomes sont d'origine mésenchymateuse notamment ostéoblastique et présentent, dans la majorité des cas, une hétérogénéité cellulaire en raison de la capacité des cellules tumorales à perdre certaines propriétés cellulaires et marqueurs de différenciation au profit d'une prolifération accrue. En ce sens, le modèle POS-1 révèle l'expression *in vitro* à la fois de marqueurs ostéoclastiques et ostéoblastiques sans pour autant présenter un phénotype complet pour l'un ou l'autre des deux types cellulaires. De plus, ces cellules expriment *in vitro* l'antigène tumoral SART-3 et conserve leur tumorigénicité lorsqu'elles sont injectées *in vivo*

dans le coussinet plantaire. Ce modèle est également transplantable, par greffe d'un fragment tumoral au contact de l'os et s'accompagne aussi du développement d'une tumeur locale associée à des lésions osseuses et une dissémination métastatique pulmonaire, concordant ainsi avec les données cliniques chez l'homme.

L'expression de TRAP, RANK et de la Cathepsine K a déjà été décrite dans d'autres lignées d'ostéosarcome et de tumeurs osseuses secondaires (carcinome mammaire et prostatique). Néanmoins, l'expression d'enzymes majeures de la résorption osseuse suggèrent que ce modèle présente un aspect plus ostéolytique qu'ostéocondensant, et de ce fait se rapproche du phénotype des tumeurs ostéosarcomateuses à cellules géantes (TCG) mais en diffère par son caractère malin.

De nombreuses publications rapportent l'expression de RANKL par les cellules tumorales et son implication dans l'essor des tumeurs ostéolytiques primaires et secondaires. A l'inverse, les cellules POS-1 n'expriment pas RANKL mais RANK, et seuls deux exemples publiés de tumeurs osseuses secondaires (et non primitives) exprimant RANK ont montré une sensibilité à l'activité biologique de RANKL. Nyambo et coll. ont récemment démontré *in vitro* que les cellules stromales étaient capables de protéger les cellules de la lignée d'adéno-carcinome prostatique PC3 de l'apoptose médiée par TRAIL en augmentant la synthèse d'OPG, et que cette protection pouvait être levée par l'addition de RANKL soluble [Nyambo et coll. (2004)]. Nos résultats montrent une action directe de RANKL sur la prolifération des cellules POS-1 et concordent avec les données publiées par Bharti et coll. concernant l'implication de RANKL dans l'inhibition de la prolifération cellulaire, mais en diffèrent par l'absence d'induction des mécanismes pro-apoptotiques dans notre modèle [Barthi et coll. (2004)].

En outre, les cellules tumorales opposent classiquement différenciation cellulaire et prolifération. Les travaux de Otsuka et coll. démontrent l'induction d'une différenciation ostéoblastique à partir de précurseurs myoblastiques et l'induction de l'expression de RANKL

par ceux-ci en présence de BMP-2 [Otsuka et coll. (2003)]. Ces données sont en accord avec notre étude révélant une diminution de la prolifération cellulaire en présence de RANKL corrélée à une induction de l'expression des transcrits de la BMP-2. Néanmoins, dans notre modèle expérimental, RANKL, via RANK, diminue la prolifération cellulaire et induit l'expression (ARNm et protéine) de la BMP-2 sans modifier la capacité de minéralisation des cellules tumorales ni l'expression d'autres marqueurs de différenciation ostéoblastique.

Pris dans leur globalité, ces résultats suggèrent la mise en place d'une boucle de rétrocontrôle positif entre RANKL et la BMP-2. Cependant, Brubaker et coll. ont montré que la BMP-2 pouvait à l'inverse stimuler l'expression de l'OPG par la lignée d'adéno-carcinome prostatique PC3 [Brubaker et coll. (2004)].

Par ailleurs, les BMPs, décrites à l'origine pour leur capacité à stimuler la formation osseuse et cartilagineuse, sont également impliquées dans l'induction de l'apoptose de cellules de myélome et l'inhibition de la prolifération de cellules adénome prostatique. En outre, Nozaki et coll. ont mis en évidence la capacité de la BMP-2 humaine à induire la différenciation et l'apoptose de cellules d'ostéosarcome canin [Nozaki et coll. (1999)]. Par ailleurs, l'expression du récepteur à la BMP-2 a été décrit dans différentes lignées tumorales et renforce l'hypothèse d'une action directe de la BMP-2 sur les cellules tumorales. En outre, nous avons également montré au sein de notre équipe que RANKL induit l'expression du récepteur à la BMP-2 dans la lignée MDA-MB d'adénocarcinome mammaire et des études sont en cours pour déterminer l'induction ou non par RANKL de ce récepteur dans la lignée POS. Cependant, l'incubation des cellules POS-1 avec de la BMP-2 n'induit ni effet anti-prolifératif, ni variation d'activité de l'alkaline phosphatase ou de la Caspase-3.

Néanmoins, outre son implication dans la stimulation de la réponse immunitaire, RANKL pourrait également exercer un effet anti-tumoral via l'inhibition de la prolifération tumorale.

Ce rôle semble cependant en contradiction avec celui joué dans l'érosion de la matrice osseuse et le développement d'un contexte favorable à la croissance tumorale.

Par ailleurs, notre laboratoire a pu établir l'expression des transcrits du récepteur RANK dans plusieurs lignées cellulaires d'ostéosarcome (MG63, SaOA2, 1547), d'adéno-carcinome mammaire (MCF7, T47D, MDA-MB231) et d'adéno-carcinome prostatique (PC3, DU145) et confirmer cette expression dans plusieurs biopsies d'ostéosarcomes et d'adéno-carcinome mammaires humains. Par conséquent, RANK pourrait représenter un marqueur des tumeurs osseuses justifiant l'étude de l'activité biologique de RANKL sur ces cellules.

Ainsi, les résultats obtenus montrent pour la première fois la fonctionnalité d'un récepteur RANK exprimé par une lignée cellulaire ostéosarcomateuse du fait de sa capacité à transduire un signal et une activité biologique en présence de son ligand.

Influence de la surexpression systémique des protéines recombinantes RANK-Fc et OPG sur le développement de tumeurs osseuses primitives.

Introduction

Une des hypothèses permettant d'expliquer l'association entre le développement tumoral en site osseux et l'apparition de lésions ostéolytiques repose sur le concept du « cercle vicieux » [Guise et coll. (1998)], c'est-à-dire la mise en place d'un environnement favorable à la résorption osseuse, elle-même responsable de la libération de facteurs locaux favorables à la croissance tumorale. L'article V et les revues publiées par Wittrant et coll. (2004) ainsi que Theoleyre et coll. (2004) ont démontré la pertinence mais également la complexité du potentiel de la triade OPG/RANK/RANKL dans le développement de nouvelles approches thérapeutiques. Ce chapitre expose les résultats obtenus *in vivo* sur la libération par transfert de gène d'OPG et de RANK-Fc dans un modèle animal d'ostéosarcome de rat. Ce modèle est issu d'un ostéosarcome initialement radio-induit chez le rat Sprague-Dawley OFA par du Ce^{144} et dont l'évolution correspond aux données cliniques recueillies chez l'homme [Allouche et coll. (1980)]. Le développement tumoral s'accompagne d'un remodelage osseux important associé à l'apparition de lésions ostéolytiques et d'une dissémination métastatique pulmonaire [Guinebretière et coll. (2001)] ([Figure 11](#)). Ce modèle est transplantable et présente l'avantage de disposer, pour les études *in vitro*, de la lignée cellulaire correspondante appelée OSRGa.

Les constructions plasmidiques pAdTrackCMV-mRANK-Fc et pAdTrackCMV-mOPG sont utilisées pour la production systémique des protéines recombinantes murines RANK-Fc et OPG et sont délivrées *in vivo* par transfert de gène à l'aide de virus défectifs.

Les données recueillies *in vivo* montrent une production systémique importante de la molécule recombinante RANK-Fc associée à une activité anti-résorptive sans influence sur le développement tumoral ni la survie des animaux. A l'inverse, les résultats obtenus mettent en évidence une augmentation du taux de survie des animaux traités avec l'adénovirus défectif contenant le transgène OPG, corrélée à une augmentation modérée de la concentration systémique de la cytokine.

Par conséquent, ces travaux contribuent à étendre les connaissances du potentiel thérapeutique de l'OPG dans les tumeurs osseuses primitives. En outre, si les effets observés dans les modèles animaux se révèlent être transposables à l'homme en terme de bénéfices cliniques, l'utilisation de ces molécules, notamment l'OPG, pourrait constituer un champ d'application présentant des potentiels thérapeutiques nouveaux dans le traitement de patients atteints de tumeurs osseuses pour lesquels les traitements conventionnels ont échoué.

Matériels et Méthodes

Modèles animaux.

Le modèle d'ostéosarcome de rat OSRGa a été obtenu par collaboration avec le Dr. Jean-Paul Thiéry de l'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 radio-induit. Les animaux âgés de quatre semaines reçoivent par greffe para-tibiale, un fragment tumoral non nécrotique (10 mm³) 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. Le fragment tumoral est maintenu en place par la masse musculaire. L'évolution tumorale est suivie sur une période maximale de 5 semaines.

Culture cellulaire.

Les cellules OSRGa sont cultivées dans du milieu DMEM (Bio Whittaker, Verviers, Belgium) complété avec 5% de sérum de veau fœtal (SVF) (Dominique Dutscher, Brumath, France) et 1% d'une solution d'antibiotiques à 5000 unités/ml de pénicilline-G-sodium et 5000 µg/ml de streptomycine sulfate (Invitrogen). Les cellules sont placées à l'étuve à 37°C, dans une atmosphère humide à 95% d'air et 5% de CO₂. A confluence, les cellules sont décollées à l'aide d'une solution de trypsine (0.5 g/l)/EDTA (0.2 g/l) (Cambrex Bio Sciences, Verviers, Belgium) etensemencées à la densité de 10000 cellules/cm².

Constructions plasmidiques.

Les constructions contenant les transgènes d'intérêt ont été cordialement fournies par le Dr C. Dunstan (Amgen Inc, USA) pour la construction plasmidique de la forme murine complète de l'OPG (pRS/CMV-mOPG) et par le Dr I. Anegon (Inserm U643 – Nantes) pour la construction de la forme murine soluble du récepteur RANK (pAdTrackCMV-mRANK-Fc). La forme murine complète de l'OPG a été sous-clonée dans le même vecteur pAdTrackCMV

que la forme murine soluble du récepteur RANK, permettant la comparaison stricte entre chaque construction en terme d'efficacité d'infection ([Figure 12](#)). Par ailleurs, la construction pAdTrackCMV-GFP est utilisée comme contrôle.

Infections virales.

La production des particules virales est assurée par le Laboratoire de Thérapie Génique de Nantes. Lorsque la tumeur est palpable (environ 12 jours post-implantation), les rats sont anesthésiés par une injection de Nesdonal (5mg/100g) et infectés dans une zone de confinement P2. Afin de déterminer l'influence de la surexpression systémique de la protéine recombinante mRANK-Fc sur le développement de tumeurs osseuses primitives, trois groupes de 6 rats sont : (i) infectés par une injection intra-portale de 10^9 particules virales/animal contenant la construction pAdTrackCMV-mRANK-Fc ; (ii) infectés par une injection intra portale de 10^9 particules virales/animal contenant la construction témoin pAdTrackCMV-GFP ; (iii) ne sont pas infectés. D'autre part, pour l'étude de l'influence de la surexpression systémique de l'OPG sur le développement tumoral dans le même modèle, trois groupes de 5 rats sont infectés : (i) par une injection intra veineuse de 5.10^9 particules virales/animal contenant la construction pAdTrackCMV-mOPG ; (ii) par une injection intra veineuse de 5.10^9 particules virales/animal contenant la construction pAdTrackCMV-GFP ; (iii) non infectés. Les rats sont gardés 7 jours en observation dans une atmosphère contrôlée du laboratoire P2 puis transférés en animalerie conventionnelle pour l'analyse des paramètres étudiés.

Production des transgènes.

L'ensemble des animaux inclus dans cette étude subit un prélèvement sanguin toutes les semaines à partir du jour de l'infection. Les échantillons sanguins sont centrifugés et les plasmas sont conservés et stockés à -80°C . La détermination du taux de protéines recombinantes circulantes est effectuée au moyen de kits de détection ELISA pour mRANK-

Fc et pour l'OPG murine (R&D Systems, Lille – France). Les dosages s'effectuent selon le protocole du fournisseur.

Remodelage osseux et évolution tumorale.

Le suivi de la progression tumorale s'effectue par mesure du volume tumoral deux fois par semaine, donné par la formule : $(L \times l^2)/2$, avec L représentant le plus grand axe de la tumeur et l, le plus petit axe. La progression tumorale est suivie sur un maximum de 5 semaines post-implantation afin d'éviter toute souffrance inutile des animaux. En outre, tout animal présentant une détresse respiratoire ou un des deux diamètres tumoraux supérieur à 40 mm est immédiatement euthanasié. Les animaux sont autopsiés pour déterminer la présence de métastases pulmonaires. La radiographie des membres postérieurs affectés par le développement tumoral permet d'obtenir des renseignements sur la qualité du tissu osseux remodelé au voisinage de la tumeur en terme de densité minérale osseuse et d'épaisseur des travées osseuses et de la corticale.

Résultats

La protéine recombinante murine RANK-Fc est fortement exprimée de façon systémique.

La courbe de production de mRANK-Fc recombinant a été déterminée sur plus de 120 jours montrant une expression transitoire du transgène, maximale à 10 jours post-infection, avec une décroissance progressive en fonction du temps ([Figure 13](#)). Le pic de production se situe vraisemblablement aux alentours de 7 jours post-infection, cependant aucun prélèvement sanguin n'est possible lorsque les animaux sont dans la zone P2. Néanmoins, les prélèvements sanguins réalisés sur les rats permettent de mettre en évidence une forte concentration sérique de mRANK-Fc tout au long de la phase du développement tumoral. En effet, cette production de mRANK-Fc reste supérieure à 400µg/ml deux semaines après l'infection soit quatre semaines après l'implantation tumorale, ce qui correspond à la durée maximale de cette étude. La perte d'expression du transgène est effective 120 jours après l'infection virale.

RANK-Fc stimule la formation osseuse et prévient de l'ostéolyse.

Les clichés radiographiques des membres postérieurs droits des rats inclus dans l'étude permettent d'évaluer la qualité du remodelage osseux lors du développement de l'ostéosarcome chez les rats traités ou non par pAdTrackCMV-mRANK-Fc ([Figure 14](#)). Ces clichés montrent un remodelage osseux important avec discontinuité de la corticale osseuse au contact de la tumeur chez les rats non infectés ou infectés avec le vecteur contrôle ([Figure 14A et B](#)). A l'inverse, la [figure 14C](#) permet de mettre en évidence une densité minérale osseuse plus importante au niveau des métaphyses tibiales et une corticale continue au contact de la tumeur, suggérant que la surexpression systémique de mRANK-Fc recombinant stimule l'apposition osseuse et prévient de l'ostéolyse associée à la croissance tumorale.

La production systémique de RANK-Fc n'influence pas le développement tumoral.

La surproduction systémique de mRANK-Fc prévient de l'ostéolyse associée au développement tumoral cependant celle-ci ne permet pas d'influencer la progression tumorale ([Figure 15](#)). En effet, les courbes des volumes tumoraux moyens observées présentent une pente similaire et l'étude statistique des résultats (test de Student) révèle que l'augmentation des volumes tumoraux n'est pas significativement différente entre les différents groupes étudiés.

L'infection des rats par les particules virales contenant la construction mOPG induit une surexpression modérée de la protéine recombinante.

Le graphe de la [figure 16](#) révèle que l'infection des rats par les particules virales contenant le transgène mOPG induit une surexpression de la protéine recombinante. Cependant, cette augmentation de la concentration sérique est négligeable en comparaison de celle induite par l'infection par la construction pAdTrackCMV-mRANK-Fc. En effet, la concentration de l'OPG détectée dans le sérum des animaux infectés par la construction pAdTrackCMV-mOPG est inférieure à 1ng/ml soit 10^6 à 10^5 fois moins que pour la construction pAdTrackCMV-mRANK-Fc. Néanmoins, l'infection des rats par ces particules virales contenant la construction pAdTrackCMV-mOPG induit une augmentation de la concentration sérique de l'OPG murine d'un facteur 7 par rapport au vecteur contrôle. Par ailleurs, même si la production de l'OPG murine est très faible, celle-ci est stable pendant la durée de l'expérimentation animale.

OPG prévient de l'ostéolyse associée au développement tumoral.

Les clichés radiographiques des membres postérieurs droits des rats inclus dans l'étude montrent un remodelage osseux important et une discontinuité de la corticale osseuse associés au développement local de la tumeur chez les rats non infectés ([Figure 17A](#)). A l'inverse, la [figure 17C](#) révèle la présence de zones plus denses au niveau des métaphyses tibiale et

fémorale suggérant une stimulation de la formation osseuse par la surexpression de l'OPG murine recombinante.

L'infection des rats par les particules virales contenant la construction mOPG induit une régression tumorale.

L'évolution du volume tumoral en fonction du temps chez des rats surexprimant ou non l'OPG murine ([Figure 18](#)) démontre que l'ensemble des rats traités par la construction pAdTrackCMV-mOPG présentent une régression tumorale complète, associée à une augmentation de la survie des animaux. A l'inverse, l'évolution tumorale est progressive lorsque les animaux ne surexpriment pas l'OPG. L'utilisation d'un test statistique (test de Student) permet de confirmer une différence significative du volume tumoral entre les différents groupes.

Discussion / conclusion

Le développement du myélome multiple [Croucher et coll. (2001)], des métastases osseuses [Zhang et coll. (2001)] et la progression de tumeurs osseuses primitives telles que les Tumeurs à Cellules Géantes (TCG) [Atkins et coll. (2001)] ou l'ostéosarcome [Grimaud et coll. (2003)] sont associées à une augmentation du rapport RANKL/OPG. L'élévation de ce ratio stimule l'activité ostéoclastique et favorise la dégradation osseuse. Par conséquent, l'interaction RANKL/RANK représente une cible potentielle pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques dans le traitement de pathologies ostéolytiques malignes.

Lors de cette étude, les protéines recombinantes RANK-Fc et OPG ont été délivrées de façon systémique grâce à l'utilisation d'un virus défectif permettant l'infection des cellules de rat et l'expression des transgènes par celles-ci. Les résultats obtenus valident l'expression et la fonctionnalité des protéines recombinantes exprimées, notamment pour mRANK-Fc fortement exprimé chez les rats infectés et dont la sur-production induit une apposition osseuse accrue. Ces résultats concordent avec des études portant sur des modèles animaux de tumeur osseuses secondaires montrant que le récepteur RANK soluble pouvait diminuer l'hypercalcémie maligne et, à titre préventif, inhiber le développement de métastases osseuses et l'apparition de lésions associées [Zhang et coll. (2003)].

Cependant, dans notre modèle d'ostéosarcome de rat, la forte concentration sérique de RANK-Fc ne suffit pas à infléchir la progression tumorale ni la dissémination métastatique pulmonaire associée. A l'inverse, des travaux portant sur des modèles animaux de myélome multiple [Oyajobi et coll. (2003) ; Sordillo et coll. (2003)] et d'adéno-carcinome prostatique [Zhang et coll. (2003)] révèlent des effets thérapeutiques prometteurs de la construction RANK-Fc avec une diminution des lésions osseuses et une réduction du volume tumoral, sans inhiber l'induction des mécanismes pro-apoptotiques médiée par la cytokine TRAIL dans les cellules tumorales [Théoleyre et coll. (2004)].

Néanmoins, l'activité anti-tumorale de RANK-Fc est contestée [Théoleyre et coll. (2004) ; Wittrant et coll. (2004)]. Par ailleurs, des données récentes mettent en évidence la capacité du récepteur γ au fragment Fc à favoriser l'activité ostéoclastique en présence de RANKL [Koga et coll. (2004)]. Par conséquent, la partie chimérique de la protéine recombinante RANK-Fc pourrait également être à l'origine de l'absence d'effet anti-tumoral.

Les données recueillies, lors de l'étude de l'influence de la surexpression systémique de l'OPG murine sur le développement tumoral dans notre modèle, révèlent que la concentration de la protéine est effectivement augmentée dans les rats infectés par la construction virale correspondante. Cependant le niveau de production détecté par la méthode d'ELISA est extrêmement faible par rapport à celui de la protéine RANK-Fc et contraste avec l'étude menée par Bolon et coll. montrant que l'infection de souris par des constructions virales similaires contenant les transgènes humain ou murin de l'OPG complète provoque une surexpression de la cytokine avec une concentration plasmatique de l'ordre de 100 ng/ml à 27 jours post-infection [Bolon et coll. (2001)].

La faible détection observée dans notre étude peut être causée par l'utilisation d'héparine lors des prélèvements sanguins. En effet, l'OPG possède un domaine de liaison à l'héparine et cette interaction OPG-héparine pourrait empêcher la reconnaissance de l'OPG par les anticorps utilisés dans le kit ELISA et ainsi introduire un biais dans la détection de la protéine recombinante dans le plasma des rats [Mizuno et coll. (1998)]. Toutefois, la détection de cette sur-expression discrète est corrélée à l'induction de l'apposition osseuse ainsi qu'à une forte diminution de la progression tumorale dans les rats traités, démontrant une activité biologique du transgène.

Outre la possibilité d'un biais méthodologique, la différence de concentration sérique entre les deux protéines recombinantes ne peut s'expliquer par une différence de vecteur d'expression puisque les deux transgènes sont insérés dans le même type de construction virale. De plus,

les deux protéines recombinantes appartiennent à l'espèce murine, ne permettant pas d'incriminer la dégradation d'une protéine par rapport à l'autre à la suite d'une réaction immune allogénique. En revanche, des études *in vitro* menées au laboratoire montrent que l'OPG est rapidement internalisée dans des cultures de cellules de la lignée 2.93 exprimant RANKL et des ostéoblastes primaires suggérant la possibilité d'un tel mécanisme *in vivo* et expliquant éventuellement la faible concentration sérique observée [Kwan tat et coll. (2005)]. Malgré cette faible détection au niveau sérique, les résultats obtenus démontrent la capacité de l'OPG à induire la régression tumorale dans notre modèle d'ostéosarcome de rat. Ainsi, l'OPG, contrairement à RANK soluble, présente, en plus de son rôle classiquement décrit d'agent anti-résorptif par inhibition de la fixation de RANKL, la possibilité d'une action anti-tumorale. Des modèles animaux de tumeurs osseuses secondaires ont permis de mettre en évidence que l'OPG, comme le récepteur RANK soluble, pouvait inhiber l'hypercalcémie maligne et prévenir le développement de métastases ostéolytiques [Capparelli et coll. (2000) ; Luger et coll. (2001) ; Body et coll. (2003) ; Zhang et coll. (2003) ; Atkins et coll. (2001) ; Corey et coll. (2005)]. Cependant, aucune étude ne démontre le potentiel curatif de l'OPG sur le développement de tumeur osseuse primitive.

L'activité anti-tumorale de l'OPG, observée lors de ces travaux, est cohérente avec son rôle dans la prévention de la mise en place d'un contexte favorable au développement tumoral en site osseux (cercle vicieux, inhibition de l'activité ostéoclastique via la fixation de RANKL). Cependant, la protéine recombinante soluble RANK-Fc présente les mêmes caractéristiques mais n'induit pas de régression tumorale dans notre modèle d'ostéosarcome de rat, suggérant une activité anti-tumorale de l'OPG indépendante supplémentaire à l'inhibition de la fixation de RANKL sur RANK.

Nos résultats contrastent avec certaines données de la littérature démontrant l'absence d'effet ou la prévalence d'une activité pro-tumorale de l'OPG, notamment due à sa capacité de fixer

TRAIL dans le cadre du gliome [Naumann et coll. (2004)], mais également due à sa participation dans la carcinogenèse, l'invasion et la dissémination métastatique du carcinome gastrique [Ito et coll. (2003)]. D'autre part, l'OPG intervient également dans la régulation de la réponse immune et inhibe notamment l'effet de RANKL sur l'augmentation de la survie des cellules dendritiques [Anderson et coll. (1997) ; Wong et coll. (1997)]. Par conséquent OPG pourrait jouer un rôle dans l'inhibition de la réponse immunitaire anti-tumorale. Nos résultats contrastent également avec la stimulation de l'activité enzymatique de la MMP-9 dans des cultures d'ostéoclastes primaires par l'OPG-Fc (article I), en raison de l'implication de cette enzyme dans le recrutement des ostéoclastes [Si et coll. (2003)] et l'invasion tumorale en site osseux [Dong et coll. (2005)]. Néanmoins, nous avons montré que l'OPG-Fc diminue l'expression et l'activité de la Cathepsine K (article I et II). Cette enzyme est impliquée dans la progression tumorale du carcinome prostatique et mammaire [Littlewood-Evans et coll. (1997) ; Brubaker et coll. (2003)] et l'inhibition de l'activité de cette enzyme par l'OPG pourrait contribuer à expliquer l'activité anti-tumorale de l'OPG observée dans le modèle d'ostéosarcome.

Par ailleurs, l'équipe de MT Gillespie a établi que l'influence de l'OPG sur le développement tumoral dépend de la structure de la protéine, démontrant une activité pro-tumorale pour la forme complète de l'OPG et, à l'inverse, une activité anti-tumorale lorsque la protéine est déletée de son domaine de liaison à l'héparine [Fisher et coll. (2003)].

Dans notre étude l'OPG complète induit une régression tumorale dans un modèle animal de tumeur osseuse primitive par des mécanismes qui restent à déterminer. Nous avons suggéré dans les articles III et IV que l'OPG complète pourrait former un complexe ternaire avec le dimère RANKL/RANK et fixer un récepteur spécifique (éventuellement un protéoglycane). Cependant, des travaux récents au sein de notre laboratoire montrent que l'héparine inhibe la fixation de l'OPG sur le complexe RANKL/RANK. De plus, Kyrtsolis et coll. ont établi une

corrélation entre la diminution de l'espérance de vie de patients atteints de myélome multiple et l'augmentation de la concentration sérique du syndécanne-1 et de l'OPG [Kirtsonis et coll. (2004)]. A l'inverse, Modrowski et coll. ont mis en évidence l'induction des mécanismes apoptotiques dans les cellules de la lignée d'ostéosarcome humain MG63 lors de la surexpression du syndécanne-2 [Modrowski et coll. (2005)]. En outre, afin de déterminer l'influence de ces protéoglycannes sur la lignée correspondant à notre modèle d'ostéosarcome, la surexpression de ces molécules dans les cellules OSRGa sera prochainement étudiée.

Néanmoins, l'OPG (complète ou tronquée 1-194) possède un Death Domain qui pourrait être à l'origine de son activité anti-tumorale lors d'une sur-expression relative de la protéine [Mizuno et coll. (1998)]. De plus, l'internalisation de l'OPG par les ostéoblastes *in vitro* suggèrent la possibilité d'une internalisation de la cytokine par les cellules ostéosarcomateuses (d'origine ostéoblastique) pouvant être à l'origine d'une activité biologique, notamment une activité anti-tumorale, avant d'être dégradée. Toutefois, cette hypothèse contraste avec les conclusions des travaux de Standal et coll. montrant que l'internalisation de l'OPG par les cellules de myélome pourrait expliquer en partie l'agressivité de cette tumeur en site osseux [Standal et coll. (2002)].

La corrélation de toutes ces données apparaît complexe en raison d'arguments plus ou moins contradictoires et nécessite d'être approfondie.

Néanmoins, il s'agit de la première mise en évidence de l'activité anti-tumorale directe de l'OPG dans un modèle de tumeur osseuse primitive de rat. En conséquence, l'OPG pourrait constituer un champ d'application présentant des potentiels thérapeutiques nouveaux dans le suivi de patients atteints de tumeurs osseuses pour lesquels les traitements conventionnels ont échoué.

D'autre part, en raison des propriétés immunogènes des particules virales, les travaux s'orientent désormais vers le développement des vecteurs synthétiques permettant la

transfection de constructions plasmidiques *in vivo* [Pitard et coll. (2002 ; 2004)] afin de s'affranchir du caractère infectieux des virus pour une possible application clinique chez l'homme.

Synthèse et conclusions de la seconde partie.

La mise en place de nouveaux protocoles de traitements des pathologies osseuses tumorales (ou non) nécessite une meilleure connaissance de la physiologie du tissu osseux. Les résultats de la première partie ont permis de contribuer à étendre ces connaissances, notamment dans la détermination des activités biologiques de la triade moléculaire OPG, RANK, RANKL sur les cellules ostéoclastiques.

Trois approches se démarquent pour l'élaboration de traitements des pathologies osseuses ostéolytiques dont (i) l'utilisation de constructions recombinantes de ces trois cytokines (molécules recombinantes ou transfert de gène), (ii) le développement de peptides inhibiteurs et (iii) l'utilisation d'inhibiteurs des voies de signalisation activées par OPG/RANK/RANKL.

Les différentes données rassemblées montrent que l'élaboration de ces protocoles thérapeutiques semble complexe [Wittrant et coll (2004) ; Theoleyre et coll. (2004)]. Cependant, elles révèlent la pertinence du potentiel thérapeutique de ces molécules et pourraient être résumées par une adaptation du titre de la revue écrite par Hofbauer LC et coll. : « RANK, RANK ligand and Osteoprotegerin : the good, the bad, and the ugly in bone tumours diseases ». En effet, en terme de traitement des tumeurs osseuses secondaires RANK montre des effets anti-tumoraux (principalement l'inhibition du développement tumoral en site osseux) ou pas d'effets, et de plus, quelque soit le modèle RANK ne présente pas d'effets secondaires. A l'inverse RANKL est clairement impliqué dans la création d'un contexte favorable au développement tumoral et l'OPG montre à la fois des effets anti-tumoraux (inhibition de prolifération et régression tumorale) et pro-tumoraux (fixation de TRAIL et inhibition de l'apoptose des cellules tumorales) suivant la structure étudiée.

Pour la première fois dans un modèle de tumeur osseuse primitive, nos travaux ont pu mettre en évidence dans un modèle d'ostéosarcome de rat, une régression tumorale complète chez les

rats traités avec de l'OPG, mais l'absence d'effets anti-tumoraux en présence de RANK soluble. Par ailleurs, nos résultats expérimentaux démontrent également une diminution de la prolifération des cellules de la lignée d'ostéosarcome POS-1 *in vitro* en présence de RANKL. Par conséquent, même s'il s'agit de deux modèles et de deux traitements différents, une des perspectives de cette étude sera de déterminer l'influence de la construction murine de RANKL soluble recombinant (pAdTrackCMV-mRANKLs) sur le développement tumoral dans nos deux modèles d'ostéosarcome chez le rat et la souris. Les paramètres de l'évolution tumorale seront suivis sur le plan osseux mais également au niveau de la réponse immunitaire en raison de l'implication de RANKL dans l'augmentation de la survie des cellules dendritiques et de la réponse lymphocytaire cytotoxique [Anderson et coll. (1997) ; Wong et coll. (1997) ; Cremer et coll. (2002) ; Witethe et coll. (2003)].

Par ailleurs, en raison des travaux de l'équipe de MT Gillespie, nous envisageons également, à l'aide de la construction pAdTrackCMV-mOPG1-194 que nous avons récemment obtenue par sous-clonage, de réaliser une étude comparative de l'activité anti-tumorale des deux formes d'OPG (complète et tronquée). En outre, afin d'écarter l'hypothèse selon laquelle les effets observés pourrait être restreints au modèle d'ostéosarcome de rat OSRGa, la même expérimentation de thérapie génique devra être conduite sur le modèle murin POS-1. L'objectif de cette étude est de déterminer le potentiel thérapeutique de la triade OPG/RANK/RANKL et de développer des protocoles cliniques transposables à l'homme. Par conséquent, afin de s'affranchir du caractère infectieux des virus, nous développons actuellement au sein de notre laboratoire en collaboration avec le Dr. Bruno Pitard (INSERM U533 – Nantes) des protocoles de transferts de gènes *in vivo* utilisant des agents de transfection synthétiques.

Les résultats obtenus, ou recueillis dans la littérature, sont pertinents, notamment en terme d'inhibition de la résorption osseuse associée à la progression tumorale en site osseux en

présence de RANK ou d'OPG. Cependant, leur activité anti-tumorale semble complexe et versatile et l'absence d'effets anti-tumoraux pour certains modèles constituent déjà une limite pour la mise en place de protocoles cliniques chez l'homme, en terme d'indication thérapeutique, d'application mais également de risques éventuels d'effets secondaires.

Par conséquent, le développement de ces protocoles de thérapie génique nécessitera à terme d'être renforcés. Parmi les perspectives, l'immunothérapie semble la plus adaptée en raison d'une part, de l'implication de la triade OPG/RANK/RANKL dans la régulation du système immunitaire et de l'expression d'antigènes tumoraux connus pour l'ostéosarcome.

Introduction à la troisième partie.

Parmi les nouvelles approches thérapeutiques des ostéosarcomes, les thérapies géniques telles qu'elles ont été présentées dans les chapitres précédents, mais également des thérapies cellulaires par l'utilisation de l'immunothérapie semblent les plus encourageantes. En effet, la cellule tumorale représente une cible potentielle pour les mécanismes de défense et bien que dérivant du soi, elle peut devenir immunogène [Davis et coll. (2003)]. Lors de la carcinogenèse, la cellule subit une modification de ses propriétés biologiques corrélée à une instabilité génétique et peut, dans certaines conditions, présenter à sa surface des antigènes, reconnus comme étrangers par le système immunitaire [Renkvist et coll. (2001)].

Les protocoles d'immunothérapie active sont principalement ciblés sur l'utilisation de cytokines [Lens et coll. (2002) ; Elhilali et coll (2001) ; Rosenberg et coll. (1999)] ou de cellules présentatrices d'antigènes destinées à orienter et à stimuler les effecteurs de la réponse immunitaire contre les cellules tumorales [Hsueh et coll. (1998) ; Rosenberg et coll. (1998) ; Panelli et coll. (2000) ; Spisek et coll. (2001) ; Brugger et coll. (2001)]. D'origine hématopoïétique, la cellule dendritique (DC) est une cellule présentatrice d'antigène dite professionnelle [Janeway et coll. (1996)]. Il existe plusieurs sous-populations de DCs et leur classification selon leur appartenance à la lignée myéloïde ou lymphoïde demeure controversée. Néanmoins, on distingue selon l'espèce, trois sous-populations chez l'homme (les Myeloid Dendritic Cells (MDCs) 1 et 2 et plasmacytoïdes) [Ito et coll. (2005)], trois chez le rat (les DCs CD11b/CD4+, les DCs CD11b/CD4- et les cellules dendritiques plasmacytoïdes) [Trinité et coll. (2000) ; Voisin et coll. (2002)], et six chez la souris (dont les DCs CD8+, les DCs CD4+ et les DCs plasmacytoïdes) [Henri et coll. (2001) ; Ardavin et col. (2003)]. L'ensemble des rôles de ces cellules dendritiques n'est pas connu, cependant les DCs

sont classiquement décrites dans la littérature pour leur capacité à capter des antigènes en périphérie de l'organisme.

La capture d'antigènes tumoraux associée à un contexte cytokinique inflammatoire entraîne la maturation des DCs et ainsi leur migration vers les tissus lymphoïdes secondaires, où les lymphocytes reconnaissent les antigènes présentés par les DCs et reçoivent les signaux de co-stimulation, de prolifération et d'éducation nécessaires à l'initiation et à l'orientation de la réponse immunitaire anti-tumorale [Spisek et coll. (2001) ; Brugger et coll. (2001)].

Ces protocoles ont déjà fait leur preuve dans le traitement de diverses pathologies telles que le mélanome, le carcinome rénal, le carcinome pulmonaire, le mésothéliome ou la dissémination de métastases pulmonaires associées au développement de tumeurs solides [Panelli et coll. (2000) ; Kugler et coll. (2000) ; Gregoire et coll. (2003) ; Ebstein et coll. (2004) ; Hegmans et coll. (2005) ; Geiger et coll. (2000)].

Trieb et coll. ont étudié la relation entre l'expression de molécules du CMH II et l'infiltration intra-tumorale lymphocytaire de patients atteints d'ostéosarcome [Trieb et coll. (1998)]. Par ailleurs, Wongkajornsilp et coll. mis en évidence une activité cytotoxique envers une lignée humaine de sarcome d'Ewing de cellules NK générée in vitro [Wongkajornsilp et coll. (2005)]. Cependant aucune publication ne fait état de travaux portant sur l'élaboration de protocoles d'immunothérapie cellulaire active dans le cadre de pathologies osseuse tumorales primitives. Pourtant, ces résultats prometteurs obtenus par l'immunothérapie passive, encouragent l'extension de la faisabilité d'un tel projet à d'autres pathologies tumorales et notamment à l'ostéosarcome.

En effet, les cellules ostéosarcomateuses, dérivant de cellules osseuses normales, acquièrent parfois l'expression d'antigènes tumoraux tels que SART-3 [Tsuda et coll. (2001)]. Cette protéine de liaison à l'ARN exprimée dans le foie fœtal, est absente de l'environnement

cellulaire osseux dans des conditions physiologiques normales et représente ainsi une cible pour les effecteurs de la réponse immunitaire.

Nous avons donc entrepris la mise en place de protocoles d'immunothérapie active par l'utilisation de cellules dendritiques, dérivées de la moelle osseuse dans le modèle d'ostéosarcome murin POS-1. Ces protocoles reposent sur la capacité des précurseurs myéloïdes à se différencier en cellules dendritiques [Spisek et coll. (2001) ; Brugger et coll. (2001)] capables de phagocyter et de présenter des antigènes tumoraux exprimés par les cellules malignes pour activer la réponse immunitaire anti-tumorale. Par ailleurs, les protocoles, mis au point pour le traitement du modèle OSRGa d'ostéosarcome de rat, sont basés sur l'utilisation d'une sous-population de cellules dendritiques ($CD11b^+ CD103^+ CD4^-$) issues du tissu splénique de rat et récemment décrite pour sa capacité à développer une puissante activité cytotoxique directe contre des lignées tumorales *in vitro* mais pas contre des cellules normales [Trinité et coll. (2000)].

L'objectif de ce travail est de démontrer le potentiel thérapeutique, la pertinence et la faisabilité de l'utilisation de l'immunothérapie active dans le cadre des traitements de l'ostéosarcome, notamment grâce aux modèles animaux précédemment cités, et ainsi confirmer la possibilité d'étendre ces protocoles à d'autres pathologies tumorales.

Il s'agit de développer une approche novatrice pour la conception d'outils thérapeutiques, par l'adaptation de protocoles décrits ou la mise en place de nouveaux protocoles d'immunothérapie active, notamment par l'utilisation de cellules dendritiques cytotoxiques. Ce projet s'explique par la nécessité de définir de nouvelles bases pour le développement de protocoles cliniques chez l'homme en relation avec des pathologies ostéolytiques tumorales dont les traitements conventionnels ont pour l'instant échoué ou ne sont pas tolérés [Alapetite et coll. (2001) ; Trieb et coll. (2001)].

Immunothérapie active par l'utilisation de cellules dendritiques cytotoxiques dans un modèle d'ostéosarcome de rat.

Introduction

Récemment, l'équipe du Dr Régis Josien (INSERM U643 – Nantes) a mis en évidence une puissante activité cytotoxique directe exercée par une sous-population de cellules dendritiques issues du tissu splénique de rat ($CD11b^+ CD103^+ CD4^-$), contre des lignées tumorales *in vitro* mais pas contre des cellules normales [Trinité et coll. (2000)]. L'influence de ces cellules dendritiques $CD4^-$ a alors été évaluée sur la progression tumorale dans un modèle d'ostéosarcome initialement radio-induit chez le rat, transplantable et dont l'évolution clinique est transposable à celle observée chez l'homme ([Figure 11](#)). Les résultats *in vitro* montrent que les cellules $CD4^-$ exercent une forte activité cytotoxique contre la lignée OSRGa et le potentiel anti-tumoral de cette sous-population de DC est confirmé *in vivo*. Ces résultats montrent une approche novatrice dans le traitement anti-tumoral de pathologies osseuses par thérapie cellulaire, utilisant la fonction cytotoxique d'un contingent de cellules dendritiques.

Matériels et méthodes

Modèle d'ostéosarcome de rat.

Le modèle d'ostéosarcome de rat a été obtenu grâce au Dr. Jean-Paul Thiéry de l'hôpital Paris Brousse (Villejuif, France). La souche de rats Sprague Dawley OFA (SPD-OFA) (Elevage Charles River, Arbresle, France) a été utilisée pour le développement du modèle tumoral *in vivo*. Ce modèle dérive d'un ostéosarcome transplantable de rat initialement radio-induit [Allouche et coll. (1980)]. Les animaux âgés de quatre semaines reçoivent une greffe paratibiale d'un fragment tumoral non nécrotique (environ 10 mm³) issu d'une tumeur parentale. Après résection de la peau, les plans musculaires sont écartés et la pièce tumorale est placée au contact du tissu osseux à la suite de l'avivement du périoste. Le fragment de tumeur est maintenu en place par la masse musculaire. Un volume tumoral seuil de 1200 mm³ a été déterminé pour sélectionner les animaux qui seront inclus dans l'étude et dont la tumeur ne pourra plus régresser spontanément. L'évolution tumorale est suivie sur une période maximale de 5 semaines.

Production des cellules dendritiques.

Des rats Sprague Dawley OFA âgés de 8 semaines sont infectés avec un adénovirus recombinant défectif contenant la construction Flt3 Ligand de rat afin de stimuler la prolifération des cellules dendritiques chez ces animaux. Les particules virales sont injectées par voie intra-veineuse à raison de 5.10⁹ pfu par animal. A J7 post-infection, les rats sont sacrifiés et les tissus spléniques prélevés pour permettre l'obtention des cellules dendritiques. Les rates sont découpées puis digérées à l'aide d'une solution de 2 mg/ml collagenase D (Roche, Meylan, France) dans du milieu RPMI 1640 / 1% SVF pendant 15 minutes à 37°C. Une solution d'EDTA 10 mM est ajoutée pendant 5 minutes puis les fragments du tissu splénique sont broyés et filtrés à l'aide d'un tamis cellulaire (cell strainer 100µm, BD Biosciences) pour libérer les splénocytes totaux des tissus conjonctifs. Les cellules sont lavées

avec une solution PBS / 2mM EDTA / SVF 1%, puis les cellules de faible densité sont isolées par centrifugation (15 minutes à 2800 rpm sans frein à 4°C) sur gradient de densité par l'utilisation d'une solution de Nycodenz à 14.5% (Nycomed, Oslo, Norvège).

La déplétion des lymphocytes T et en partie des B est réalisée par l'incubation avec des anticorps anti-TCR $\alpha\beta$ et $\gamma\delta$ mAbs, nommés R7.3 et V65 respectivement, suivie par l'addition d'un mélange d'anticorps IgG anti-souris et anti-rat conjugués à des billes magnétiques (DynaL Biotech, Oslo, Norvège). La déplétion des lymphocytes T avoisinant les 97% est confirmée par l'absence de marquage CD3 sur les populations isolées. La sélection des sous-populations de DCs OX62⁺(CD103⁺) s'effectue par l'utilisation des anticorps Anti-Rat DC (OX62) MicroBeads (Miltenyi Biotec). Après un lavage, les cellules sont resuspendues dans 500 μ l de PBS/SVF/EDTA et triées par une colonne magnétique (MACS). Seules les cellules OX62⁺ sont éluées dans la fraction positive. Les cellules OX62⁺ obtenues ont une pureté supérieure à 95%. La séparation des cellules CD4⁺ et CD4⁻ est réalisée par tri cellulaire (FACS Aria) à l'aide des anticorps de marquage MHC class II-FITC (clone OX6) et CD4-PE (clone OX35).

Culture cellulaire.

Les cellules OSRGa, dérivées de l'ostéosarcome de rat *in vivo*, sont des cellules adhérentes cultivées dans du milieu DMEM (Bio Whittaker) complété avec 5% de sérum de veau fœtal (Dominique Dutscher) et 1% d'une solution d'antibiotiques à 5000 unités/ml de pénicilline-G-sodium et 5000 μ g/ml de streptomycine sulfate (Invitrogen). Les cellules sont placées à l'étuve à 37°C, dans une atmosphère humide à 95% d'air et 5% de CO₂. A confluence, les cellules sont décollées à l'aide d'une solution de trypsine (0.5 g/l)/EDTA (0.2 g/l) (Cambrex Bio Sciences) et semencées à la densité de 10000 cellules/cm².

Les lignées cellulaires YAC (lymphome murin) et JURKAT (lymphome T humain) sont sensibles à la lyse par les cellules dendritiques cytotoxiques (CD11b⁺ CD103⁺ CD4⁻). La

lignée YAC est utilisée comme témoin positif de l'activité lytique des DCs. La lignée JURKAT est utilisée comme témoin négatif de l'efficacité anti-tumorale des cellules (CD11b⁺ CD103⁺ CD4⁻) par présentation d'antigènes tumoraux spécifiques par rapport aux cellules OSRGa. En effet, de toutes les lignées testées, les cellules YAC sont les plus sensibles à l'activité cytotoxique des splénocytes (CD11b⁺ CD103⁺ CD4⁻), elles servent donc de référent pour l'étude de la sensibilité d'autres lignées cellulaires. Par ailleurs, les cellules JURKAT utilisées dans le protocole vaccinal sont supposées être d'origine assez éloignées de la lignée OSRGa pour ne pas exprimer d'antigènes tumoraux communs avec celle-ci. Ces cellules sont cultivées dans du milieu milieu RPMI-1640 complet [RPMI-1640 (Sigma, St Louis, USA), sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté 10% (Biowest, France), solution d'acides aminés non essentiels (Sigma), pyruvate de sodium 1mM (Sigma), tampon Hepes 1mM (Sigma), L-glutamine 2mM (Sigma), pénicilline 100U/ml et streptomycine 0,1mg/ml (Sigma), β-mercaptoéthanol 50mM (Sigma)]. Les cultures sont maintenues à une densité cellulaire comprise entre 3.10⁵ et 9.10⁵ cellules/ml de milieu.

Les cellules stromales osseuses sont issues de fragments osseux. Ces fragments sont obtenus après broyage des fémurs d'un rat Sprague Dawley OFA et cultivés *in vitro* dans du milieu DMEM complémenté avec 10% de SVF et 1% d'une solution d'antibiotiques à 5000 unités/ml de pénicilline-G-sodium et 5000 µg/ml de streptomycine sulfate. Après dix jours de culture, les fragments osseux sont éliminés et les cellules adhérentes utilisées pour la détermination de leur sensibilité à l'activité cytotoxique des splénocytes (CD11b⁺ CD103⁺ CD4⁻).

Les splénocytes (CD11b⁺ CD103⁺ CD4⁻) sont sélectionnés selon le protocole décrit ci-dessus puis incubés pendant 12 heures avec les cellules cibles dans un rapport 25/1 (effecteur/cible) dans du milieu RPMI complet.

A la fin de la période d'incubation, les cellules subissent de nouveau une sélection par centrifugation (15 minutes à 2800 rpm sans frein à 4°C) sur gradient de densité (Nycodenz à 14.5%) afin d'éliminer les cellules tumorales résiduelles. Les DCs sont ensuite lavées et reprises dans du PBS à la concentration de 10^7 cellules / ml.

Test de cytotoxicité *in vitro* et *ex-vivo*

L'activité cytotoxique des cellules dendritiques est déterminée par mesure du relargage du ^{51}Cr pendant 6 heures par les cellules cibles OSRGa, YAC, JURKAT, par des cellules tumorales fraîchement isolées et des cellules stromales osseuses saines. Brièvement, 10^6 cellules cibles sont marquées avec une solution de ^{51}Cr (Amersham Biosciences, USA) pendant 45 minutes à 37°C dans du milieu complet. Une dilution sériée des cellules dendritiques est effectuée dans du milieu complet. Trois mille cellules cibles sont ensuite incubées avec un nombre croissant de DCs dans une plaque 96 puits à fond conique. Les différents ratios sont effectués en triplicata. Les cellules sont ensuite centrifugées 3 minutes à 1500g, et incubées 6 h à 37°C, 5% CO_2 . Les surnageants cellulaires sont analysés afin de déterminer la quantité de ^{51}Cr relargué dans le milieu de culture par l'utilisation des procédures de scintillation standard (Packard Instruments). L'activité de cytotoxicité est exprimée en pourcentage de Chrome relargué, et calculée selon la formule $[100 \times (\text{relargage expérimental} - \text{relargage spontané}) / (\text{relargage maximum} - \text{relargage spontané})]$.

Protocole d'expérimentation *in vivo*

A J+7 après la greffe des fragments tumoraux en site para-osseux, 2 rats sains Sprague Dawley OFA sont infectés avec la construction virale recombinante contenant le transgène Flt3 Ligand de rat. A J+14 après la greffe (J+7 post-infection), les rats infectés sont sacrifiés et leur rate prélevée pour isoler les cellules dendritiques. Les splénocytes ($\text{CD11b}^+ \text{CD103}^+ \text{CD4}^-$) sont sélectionnés et incubés pendant 12 heures avec la protéine antigénique KLH

(contrôle de la présentation antigénique) et les cellules tumorales soit de la lignée OSRGa soit de la lignée JURKAT (lymphome T humain).

A J+15 post-implantation, les animaux dont le volume tumoral est supérieur à 1200 mm³, sont repartis de façon aléatoire en 3 groupes (n=27). Ces groupes se distinguent par le type de traitement qu'ils vont recevoir : un groupe non traité et deux groupes traités avec des splénocytes (CD11b+ CD103+ CD4-) préalablement incubés avec des cellules de la lignée OSRGa ou des cellules de la lignée JURKAT. Le même jour, les rats subissent un prélèvement sanguin pour l'étude de la réponse immunitaire anti-KLH et reçoivent ensuite une injection sous-cutanée en plusieurs sites soit d'une suspension de splénocytes (CD11b+ CD103+ CD4-) « chargés avec les antigènes tumoraux » / PBS pour les rats traités soit de PBS seul pour les rats non traités. Ces manipulations sont répétées 3 fois avec un intervalle de 7 jours entre chaque vaccination.

Suivi de l'évolution tumorale.

Le suivi de l'évolution de la tumeur s'effectue par mesure du volume tumoral deux fois par semaine. Cette mesure est donnée par la formule $(L \cdot l^2)/2$ (L : le plus grand axe de la tumeur et l : le plus petit). La progression tumorale est suivie sur un maximum de 5 semaines. Tout animal présentant un axe de la tumeur supérieur à 40 mm ou une détresse respiratoire est immédiatement euthanasié. Les animaux sont autopsiés pour déterminer la présence de métastases pulmonaires.

Résultats

Les splénocytes CD11b+ CD103+ CD4- exercent une activité cytotoxique contre la lignée tumorale OSRGa (*in vitro*) et des cellules fraîchement isolées de fragments tumoraux (*ex vivo*) mais pas contre des cellules normales.

L'activité cytolytique des splénocytes est testée sur une vingtaine de lignées cellulaires. La [figure 19A](#) révèle une sensibilité variable des différentes populations cellulaires étudiées comprise entre 5 et 60 % de lyse spécifique pour un ratio effecteurs : cibles de 25/1. Les lignées OSRGa et JURKAT comptent parmi les plus sensibles avec un pourcentage de lyse spécifique de 35 et 40 % respectivement. A l'inverse, les splénocytes n'exercent pas d'activité cytotoxique à l'encontre des cellules stromales osseuses normales (CSO).

Par ailleurs, cette lyse spécifique est également effective *ex vivo* sur des cellules fraîchement isolées de fragments tumoraux issus du même modèle d'ostéosarcome de rat malgré une sensibilité plus faible par rapport à la lignée OSRGa ([Figure 19B](#)).

L'activité cytotoxique des splénocytes est restreinte à la sous-population CD11b+ CD103+ CD4-.

Les sous-populations de splénocytes CD11b+ CD103+ CD4- et CD11b+ CD103+ CD4+ sont utilisées pour la détermination d'une activité cytotoxique contre la lignée OSRGa. Les résultats obtenus démontrent que seule la sous-population CD4- est capable d'induire une lyse importante des cellules OSRGa ([Figure 20](#)). En effet, l'absence de variation importante du pourcentage de lyse de la lignée OSRGa (+/- 10 %) par les splénocytes CD11b+ CD103+ CD4+ quelque soit le ratio effecteurs : cibles par rapport à la population CD11b+ CD103+ CD4- traduit la non spécificité de l'activité cytotoxique de cette sous-population cellulaire.

Stabilité de la sensibilité du clone cellulaire OSRGa 1 à la lyse par les splénocytes CD11b+ CD103+ CD4-.

Les premiers résultats de protocoles d'immunothérapie *in vivo* utilisant des splénocytes CD11b⁺ CD103⁺ CD4⁻ ont permis d'obtenir des résultats préliminaires encourageants notamment en terme d'inhibition de la progression tumorale et d'augmentation de la survie des animaux traités. Cependant, en raison d'une instabilité du modèle animal, du petit nombre d'animaux inclus par groupe de traitement et de la difficulté à isoler les splénocytes d'intérêt, la reconnaissance statistique des données recueillies n'a pas pu être confirmée. De plus, une diminution de la sensibilité de la lignée OSGRa à la lyse par les splénocytes CD11b⁺ CD103⁺ CD4⁻ a été observée *in vitro* après plusieurs passages (données non présentées).

En conséquence, le nombre d'animaux inclus par groupe a été augmenté de 50 % (9 rats/groupe au lieu de 6), la production des splénocytes CD11b⁺ CD103⁺ CD4⁻ a été stimulée chez les rats donneurs par une surexpression systémique de la cytokine recombinante Flt3L humain et la lignée OSRGa a été clonée afin de vérifier les variations de la sensibilité à la lyse par les splénocytes CD11b⁺ CD103⁺ CD4⁻ de chaque clone en fonction du temps de culture et de la stimulation de la production des splénocytes.

Les résultats obtenus montrent une grande variabilité d'un clone à un autre, avec une sensibilité plus importante des clones 1, 4 et 8 à la lyse par les splénocytes CD11b⁺ CD103⁺ CD4⁻ comparée à la lignée YAC-1 utilisée comme témoin positif ([Figure 21A](#)). De plus, seuls ces clones 1, 4 et 8 conservent leur sensibilité lorsqu'ils sont maintenus en culture pendant une période de 60 jours. A l'inverse, la lignée parentale (Lp) non clonale perd sa sensibilité au cours du temps ([Figure 21B](#)).

Par ailleurs, la stimulation de la production des splénocytes CD11b⁺ CD103⁺ CD4⁻ par le Flt3L induit une diminution de leur activité cytotoxique ([Figure 21C](#)). Cependant, cette baisse de l'activité lytique varie d'un clone à l'autre. Ainsi, le clone 1 de la lignée OSRGa est peu affecté (environ -10% de lyse spécifique) et conserve après 120 jours de culture *in vitro* une sensibilité suffisante pour la mise en place des protocoles d'immunothérapie *in vivo*.

L'injection de splénocytes CD11b+ CD103+ CD4- préalablement incubés avec des cellules OSRGa (clone 1) ralentit la progression tumorale et induit une augmentation de la survie.

La [figure 22](#) montre l'évolution du volume tumoral et du taux de survie en fonction des différents protocoles d'immunothérapie appliqués aux groupes de rats ayant développé une tumeur locale progressive. Les résultats révèlent une plus faible évolution du volume tumoral moyen lorsque les rats sont traités sur trois semaines avec une injection hebdomadaire d'une suspension de splénocytes CD11b+ CD103+ CD4- préalablement incubés avec des cellules du clone 1 issus de la lignée OSRGa (DCs/OSRGa1). A l'inverse, ni l'incubation de ces splénocytes avec la lignée JURKAT (DCs/JURKAT), ni l'injection de PBS n'altère le développement tumoral. En effet, le graphe de la [figure 22A](#) montre une croissance tumorale linéaire des rats traités avec les DCs/OSRGa1 et en revanche une croissance exponentielle des volumes tumoraux des rats traités avec les DCs/JURKAT ou du PBS seul. La différence des volumes tumoraux est confirmée statistiquement par la réalisation d'un « test de Student » permettant d'obtenir une valeur $p < 0,05$ pour les deux dernières mesures des volumes tumoraux.

Par ailleurs, le ralentissement de l'évolution tumorale s'accompagne d'une augmentation du taux de survie des rats traités avec les DCs/OSRGa1 par rapport aux rats témoins traités avec du PBS (respectivement 60 % et 20 % de rats vivants à 5 semaines) ([Figure 22B](#)).

Discussion / conclusion.

Au cours de ce travail nous avons pu mettre en évidence sur un modèle animal de tumeur osseuse primitive, une approche novatrice non seulement dans le cadre des traitements des ostéosarcomes mais également dans le cadre des immunothérapies actives par l'utilisation de l'activité cytotoxique d'une sous-population de cellules dendritiques récemment isolée chez le rat [Trinité et coll. (2000) ; Voisine et coll. (2002)].

Les résultats obtenus révèlent notamment que les cellules tumorales OSRGa issues du modèle d'ostéosarcome de rat sont sensibles à l'activité cytotoxique de la sous-population de splénocytes CD11b⁺ CD103⁺ CD4⁻ et que l'injection de ces splénocytes préalablement incubés avec ces cellules tumorales ralentit la progression tumorale et induit une augmentation de la survie des animaux. Ces données soulignent la pertinence de l'utilisation de cette population dans l'élaboration de protocoles d'immunothérapie anti-tumorale.

En outre, 5 rats appartenant au groupe traité avec une injection hebdomadaire d'une suspension de splénocytes CD11b⁺ CD103⁺ CD4⁻ préalablement incubés avec des cellules du clone 1 issus de la lignée OSRGa présentent une régression tumorale complète. Ces résultats confirment les données obtenues lors des études préliminaires et révèlent le potentiel curatif de ce protocole de thérapie cellulaire. D'autre part, les rats présentant une régression tumorale subiront prochainement une nouvelle implantation d'un fragment d'ostéosarcome afin de déterminer l'induction ou non d'une mémoire de la réponse anti-tumorale.

Cependant, ces résultats (obtenus avec un clone de la lignée d'ostéosarcome ayant conservé sa sensibilité à la lyse par les splénocytes CD11b⁺ CD103⁺ CD4⁻) soulèvent quelques questions. En effet, l'ostéosarcome est une tumeur osseuse présentant une forte hétérogénéité cellulaire (61) et, de plus, la lignée parentale OSRGa perd sa sensibilité à la lyse par les splénocytes au cours du temps. Ces données suggèrent une dérive de la lignée ostéosarcomateuse notamment par l'émergence de populations moins sensibles et plus prolifératives, entraînant un certain

nombre d'interrogations sur le sens biologique et la généralisation de ce protocole pour le traitement des ostéosarcomes.

L'infection des rats par la construction virale défective contenant le transgène Flt3L permet d'induire la prolifération des précurseurs hématopoïétiques et d'obtenir un nombre suffisant de splénocytes d'intérêt pour la vaccination des rats développant une tumeur progressive. Cette induction de la prolifération concorde avec les données de la littérature [Marroquin et coll. (2002) ; Karsunky et coll. (2003)]. Néanmoins, la diminution de l'activité cytotoxique des splénocytes CD11b⁺ CD103⁺ CD4⁻ des rats infectés contrastent avec les travaux de Braun et coll., et Chakravarty et coll. montrant l'induction d'une activité anti-tumorale médiée par le Flt3L [Braun et coll. (1999) ; Chakravarty et coll. (1999)].

Les rats traités reçoivent une injection sous-cutanée de 5.10^6 cellules dendritiques. Ces paramètres ont été choisis en raison de la publication de Kalos M. révélant un rôle essentiel de la voie d'administration des DCs dans l'établissement de la réponse lymphocytaire avec une meilleure efficacité d'induction de la réponse anti-tumorale pour les voies d'injection intra-nodale et intra-dermique [Kalos (2003)]. Par ailleurs, Ludewig et coll. ont démontré que l'efficacité de la réponse anti-tumorale médiée par les cellules dendritiques dépend plus de la force d'interaction DCs/lymphocytes T que du nombre de DCs injectées [Ludewig et coll. (2004)]. Dans notre étude un nombre maximal de splénocytes est injecté aux rats compte tenu de l'absence d'information concernant l'interaction des splénocytes CD11b⁺ CD103⁺ CD4⁻ avec les cellules T.

D'autre part sur le plan mécanistique, nous ne savons pas pourquoi il existe une sélectivité dans le choix de la cible des cellules cytotoxiques CD11b⁺ CD103⁺ CD4⁻ du tissu splénique, ni si ces variations de sensibilité sont dues à l'état de différenciation des cellules tumorales en relation avec l'expression d'antigènes spécifiques. Des travaux récents menés par Hubert et coll. ont montré que les splénocytes CD11b⁺ CD103⁺ CD4⁻ expriment un large spectre de

Toll Like Receptors (TLRs) [Hubert et coll. (2004)]. De plus, ces cellules exercent une activité cytotoxique contre plusieurs lignées tumorales d'origine différente suggérant une reconnaissance médiée par les mécanismes de l'immunité innée et probablement l'expression par celles-ci d'antigènes tumoraux communs et conservés.

Des investigations se poursuivent actuellement pour tenter de définir les mécanismes de cette cytotoxicité et son intérêt soit dans la présentation d'antigènes tumoraux et l'activation lymphocytaire, soit dans une activité anti-tumorale directe. Néanmoins, les résultats présentés permettent d'émettre quelques hypothèses. Ainsi, si la lyse des cellules tumorales *in vitro* est vraisemblablement due à l'activation des mécanismes de l'immunité innée, en revanche la réponse anti-tumorale *in vivo* semble être médiée par une immunité adaptative. En effet, la moindre réponse anti-tumorale observée dans le groupe de rats traités par les DCs/JURKAT par rapport au groupe de rats traités par les DCs/OSRGa suggère une immunisation dépendante de la présentation d'antigènes exprimés spécifiquement par OSRGa et non d'une action cytotoxique directe *in situ*.

En conséquence, afin de déterminer l'efficacité des splénocytes CD11b⁺ CD103⁺ CD4⁻ à présenter des peptides antigéniques et à induire une réponse immunitaire, les Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) issus de prélèvements sanguins des différents groupes de rats ont été isolés par centrifugation sur gradient de densité et la production d'IFN γ par les lymphocytes en réponse à la présence de la protéine antigénique KLH sera prochainement mesurée par ELISPOT.

L'interrogation majeure demeure liée à l'intérêt de cette activité cytotoxique des splénocytes CD11b⁺ CD103⁺ CD4⁻ par rapport aux protocoles d'immunothérapie « classiques ». En effet, des travaux récents réalisés par Chauvin et coll. (données non publiées) montrent que seuls les splénocytes CD11b⁺ CD103⁺ CD4⁻ immatures sont capables d'activité cytotoxique, or Morel et coll. ont décrit l'implication des cellules dendritiques immatures dans la mise en place des

mécanismes tolérogènes [Morel et coll. (2003)]. Par ailleurs, les données de la littérature montrent que la source antigénique est déterminante pour l'efficacité d'un traitement anti-tumoral par immunothérapie. En effet, selon le mode de chargement des cellules dendritiques avec des antigènes tumoraux et la préparation des antigènes tumoraux (corps apoptotiques ou lysats cellulaire), la réponse immunitaire conduit à la mise en place de mécanismes soit immunogènes soit tolérogènes [Gregoire et coll. (2003) ; Ebstein et coll. (2004)]. Dans notre étude, la cellule dendritique organise elle-même la lyse des cellules tumorales et le chargement des antigènes tumoraux, et induit une réponse anti-tumorale.

Récemment, Shi et coll. ont montré que les cellules dendritiques humaine issues de sang de cordon ombilical possèdent une activité cytotoxique contre des lignées tumorales mais pas contre des précurseurs hématopoïétiques normaux, offrant ainsi des perspectives cliniques à notre étude [Shi et coll. (2005)]. Cependant, la généralisation de ces travaux semble limitée en raison de la résistance de certaines lignées tumorales à la lyse par ces splénocytes CD11b+ CD103+ CD4- chez le rat.

Néanmoins, ces résultats constituent une approche encourageante dans le développement de nouveaux outils thérapeutiques pour le traitement des pathologies osseuses tumorales primitives par l'utilisation de la fonction cytotoxique d'une sous-population de cellules dendritiques du tissu splénique chez le rat.

Immunothérapie active par l'utilisation de cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse dans un modèle d'ostéosarcome de souris.

Introduction

Le modèle d'ostéosarcome murin POS-1 dérive du développement spontané d'un ostéosarcome dans la souche murine syngénique C3H dont l'évolution clinique est comparable à l'homme [Uesugi et coll. (2000) ; Shiratori et coll. (2001) ; Kamijo et coll. (2002)]. La lignée cellulaire POS-1 a été caractérisée dans l'article V et exprime un antigène de tumeur appelé SART-3. Cet antigène est normalement absent de l'environnement cellulaire osseux dans des conditions physiologiques normales et représente ainsi une cible pour les effecteurs de la réponse immunitaire [Tsuda et coll. (2001)].

Lors de cette étude nous avons entrepris d'adapter, à notre modèle animal d'ostéosarcome, les protocoles d'immunothérapie active déjà mis en place pour le traitement du mésothéliome chez l'homme [Gregoire et coll. (2003) ; Ebstein et coll. (2004)]. Les cellules dendritiques murines CD11c+ [Metlay et coll. (1990)] actrices de cette immunothérapie sont obtenues par différenciation et maturation des précurseurs de la moelle osseuse en présence de corps apoptotiques de cellules tumorales. L'objectif de ce travail est de démontrer la pertinence de ces protocoles d'immunothérapie et la possibilité d'étendre ces traitements à d'autres pathologies tumorales notamment l'ostéosarcome.

Matériels et méthodes

Le modèle d'ostéosarcome murin.

La lignée cellulaire POS-1 dérive du développement spontané d'un ostéosarcome dans la souche murine C3H, dont l'évolution clinique est comparable à l'homme. La progression tumorale s'accompagne de lésions osseuses et d'une dissémination métastatique pulmonaire pour les stades les plus avancés. Cette lignée a été obtenue grâce à une collaboration avec le Kanagawa Cancer Center (Kanagawa, Japan). Les souris âgées de 4 semaines reçoivent une injection de $2 \cdot 10^6$ cellules dans le coussinet plantaire. La tumeur est palpable à J+10 post-injection et la progression tumorale est suivie sur 5 semaines. Tout animal présentant une détresse respiratoire (signe de la présence de métastases pulmonaires) est immédiatement euthanasié.

Extraction des ARN totaux et RT-PCR.

Les cellules sont lysées et les ARN totaux extraits à l'aide du réactif TRIzol[®] (Invitrogen) suivant le protocole préconisé par le fournisseur. Brièvement, les ARN totaux sont isolés dans la phase aqueuse de la solution TRIzol[®]/chloroforme suite à la lyse des cellules. Les ARN sont ensuite respectivement précipités puis lavés par de l'isopropanol absolu et de l'éthanol 75%. Le culot d'ARN est finalement repris dans 20 µl d'eau DEPC. De façon à éliminer tout risque de contamination par de l'ADN génomique, les ARN totaux sont traités à la DNase I avant d'être rétro-transcrits. Un volume correspondant à 5 µg d'ARN totaux est incubé à température ambiante pendant 15 minutes en présence de 2,7 µl de DNase I (1 U/µl, Invitrogen), 2,7 µl de tampon 10X (Invitrogen), et une quantité suffisante d'eau DEPC pour atteindre le volume final de 27 µl. A l'issue de ces 15 minutes, l'enzyme est inactivée par 3 µl d'EDTA 25 mM (Invitrogen) suivi d'un cycle de 15 minutes à 65°C.

Les réactions de RT-PCR s'effectuent respectivement à partir des mélanges réactionnels suivants : (1) *pour la transcription inverse* : 30 µl de la solution d'ARN totaux traités à la

DNase I, 1 µl d'oligo-dT (500 µg/ml, Promega), 10 µl de tampon 5X (Invitrogen), 5 µl de DTT (100 mM, Invitrogen), 2,5 µl de dNTP (10 mM, Promega), 0,5 µl de RNAsine (40 U/µl, Promega), 2 µl de MMLV-RT (200 U/µl, Invitrogen) (2) *pour les réactions de PCR* : 2 µl de produits de RT, 3 µl d'oligo-nucléotides sens et anti-sens (10 pmoles/µl chaque) (Tableaux II et III), 31,75 µl de H₂O-DTT (0,09%), 5 µl de tampon 10X (Eurobio), 3 µl de MgCl₂ (50 mM, Eurobio), 2 µl de dNTP (10 mM, Promega), 0,25 µl de TaqPolymérase (5 U/µl, Eurobio). Les réactions de PCR sont réalisées en phase exponentielle d'amplification à l'aide des couples d'amorces pour le 18S et SART-3 [respectivement (5'tcaagaacgaaagtcggaggttcg3' / 3'ttattgctcaatctcgggtggct5' - 462pb - 94°C/1min-62°C/1min-72°C/1min – 26 cycles) et (5'aggagcagctgtccatcaat3'/3'ctcttgacggaccaaggtct5' - 730pb - 94°C/1min-60°C/1min-72°C/1min – 40 cycles)]. Le profil d'expression est visualisé par l'électrophorèse des produits obtenus dans un gel d'agarose à 1% et quantifié par le logiciel de traitement d'image Imagequant (Molecular Dynamics). Le profil d'expression étudié par RT-PCR semi-quantitative est comparé au gène de référence 18S. L'expression relative du témoin est arbitrairement rapportée à 100.

Production des cellules dendritiques.

Les précurseurs myéloïdes sont obtenus à partir de la moelle osseuse des fémurs et tibias de souris C3H âgées de 5 à 6 semaines. Brièvement, à J0, les os longs sont prélevés stérilement et les extrémités cartilagineuses éliminées. Une aiguille 23g est introduite dans la cavité médullaire et la moelle est expulsée à l'aide d'une seringue contenant du milieu complet [RPMI 1640 complété avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) inactivé, 1% d'une solution d'antibiotiques à 5000 unités/ml de pénicilline-G-sodium et 5000 µg/ml de streptomycine sulfate, 1% d'une solution d'acides aminés non essentiels et 50 mM de β-mercaptoethanol]. Les précurseurs myéloïdes sont débarrassés des tissus conjonctifs à l'aide d'un tamis cellulaire (100µm). Les cellules sont lavées deux fois dans du milieu complet à

raison de 20 ml de milieu par souris etensemencées à une densité de 5.10^5 cellules/cm² et $4.2.10^6$ cellules/ml de milieu complet en présence de mGM-CSF et mIL-4 (AbCys, Paris, France) respectivement à la concentration de 100ng/ml et 50ng/ml pendant 6 jours pour induire leur différenciation en cellules dendritiques. Le milieu de culture est changé au bout de 72h post-prélèvement. Après cinq jours de culture les cellules dendritiques sont incubées avec les corps apoptotiques des cellules tumorales POS-1 pendant 24 heures (voir ci-dessous), puis le surnageant cellulaire est éliminé et les cellules incubées avec les facteurs de maturation suivants : poly I:C (Sigma, St Louis, USA) et mTNF α (AbCys, Paris, France) respectivement à la concentration de 50 μ g/ml et 20ng/ml pendant 24 heures. Les cellules CD11c⁺ sont ensuite isolées par tri magnétique à l'aide d'anticorps anti-mouse CD11c MicroBeads (Miltenyi Biotec, France).

Production des corps apoptotiques.

Les cellules POS-1 sont cultivées dans du milieu RPMI complémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal et 1% d'une solution d'antibiotiques à 5000 unités/ml de pénicilline-G-sodium et 5000 μ g/ml de streptomycine sulfate. Les cellules sont placées à l'étuve à 37°C, dans une atmosphère humide à 95% d'air et 5% de CO₂. A J+3 post-prélèvement, les cellules POS-1 sontensemencées dans une flasque de culture avec un rapport 2 entre cellules POS-1 et DCs. A J+4, les cellules adhérentes POS-1 sont lavées deux fois dans du milieu complet. Elles subissent alors un choc thermique à 42°C pendant 30 minutes, puis après 5 heures, les cellules sont traitées aux rayons U.V. afin d'induire l'ensemble des cellules tumorales en apoptose. Les cellules POS-1 sont ensuite replacées à l'étuve à 37°C, dans une atmosphère humide à 95% d'air et 5% de CO₂ pendant 24 heures. L'activation des mécanismes d'apoptose est vérifiée par coloration de la chromatine au Hoechst et détermination de l'activité caspase-3 à l'aide du kit CaspACEtm Assay System (Promega, Madison, USA). Brièvement, vingt quatre heures après leur traitement aux rayons U.V. les surnageants de culture sont éliminés et les

cellules cultivées sur lamelles sont lavées avec du tampon PBS. Les cellules sont ensuite incubées avec une solution de Hoechst 33258 (Sigma, St Louis, USA) à 10µg/ml pendant 30 minutes à 37°C puis rincées. La fragmentation de la chromatine est visualisée entre 340 et 380 nm. Concernant l'activité Caspase-3, les cellules induites en apoptose sont lysées à l'aide du tampon de lyse RIPA [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]. Dix microlitres des lysats cellulaires sont ensuite utilisés pour mesurer l'activité de dégradation d'un substrat fluorogénique Caspase-3 spécifique. L'intensité de fluorescence est déterminée à 360/460 nm (excitation/émission). Par ailleurs, l'apoptose de la totalité des cellules POS-1 est vérifiée par l'absence de prolifération cellulaire après dix jours de culture.

Les corps apoptotiques issus des cellules POS-1 sont ensuite incubés avec les cellules de la moelle en différenciation à J+5, afin d'induire leur phagocytose.

Analyse de la phagocytose par microscopie confocale

Afin de vérifier la phagocytose des corps apoptotiques issus des cellules POS-1 par les cellules dendritiques en cours de différenciation, une étude par microscopie confocale est réalisée afin de déterminer la co-localisation des deux types cellulaires. Les cellules POS-1 induite en apoptose sont marquées à J+3 à l'aide du fluorochrome membraine PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Kit (Sigma) suivant le protocole fourni tandis que les cellules de la moelle cultivées sur lamelles de verre sont marquées à J+6 à l'aide des anticorps R-PhycoErythrin (R-PE)-Conjugated Hamster Anti-Mouse CD11c Monoclonal Antibody, R-PhycoErythrin (R-PE)-Conjugated Mouse IgG2b, κ Monoclonal Immunoglobulin Isotype Control (BD Biosciences, San Jose, USA). Les cellules sont ensuite lavées trois fois avec du PBS à 4°C puis fixées avec du méthanol à -20°C pendant 5 minutes. Les cellules sont mises à sécher jusqu'à évaporation complète du méthanol puis rincées deux fois avec de l'eau distillée

à 4°C avant d'être marquées par l'anticorps anti-souris CD11c-PE dilué au 1/100^{ème} dans du PBS. Le montage des cellules entre lames et lamelles s'effectue à l'aide du kit ProLong® Antifade (Invitrogen) selon le protocole décrit par le fournisseur. L'analyse des lames est réalisée en microscopie confocale lorsque la solution ProLong® Antifade est polymérisée, soit 24 heures après le montage des lames.

Cytométrie en flux

Afin de déterminer les paramètres de différenciation et de maturation des précurseurs myéloïdes, les cellules issues de la moelle osseuse sont marquées à J0, J+6 et J+7 à l'aide des anticorps Allophycocyanin (APC)-Conjugated Hamster Anti-Mouse CD11c (Integrin α x chain) Monoclonal Antibody, APC-Conjugated Hamster IgG1*, λ 1 Monoclonal Immunoglobulin Isotype Control, R-PhycoErythin (R-PE)-Conjugated Mouse Anti-Mouse I-Ak (A α k) Monoclonal Antibody, R-PE-Conjugated Mouse IgG2b, κ Monoclonal Immunoglobulin Isotype Control, Fluorescein Isothiocyanate (FITC)- conjugated Hamster Anti-Mouse CD80 (B7-1) Monoclonal Antibody, FITC-conjugated Hamster IgG2*, κ Monoclonal Immunoglobulin Isotype Control, FITC-conjugated Rat Anti-Mouse CD86 (B7-2) Monoclonal Antibody, FITC-conjugated Rat IgG2a, κ Monoclonal Immunoglobulin Isotype Control (BD Biosciences, San José, USA).

L'expression des molécules de classe I par les cellules POS-1 est déterminée par l'utilisation des anticorps R-PE-Conjugated Mouse Anti-Mouse H2Kk Monoclonal Antibody, R-PE-Conjugated Mouse IgG2b, κ Monoclonal Immunoglobulin Isotype Control (BD Biosciences). Brièvement, les cellules non adhérentes sont conservées et additionnées aux cellules adhérentes décollées par l'utilisation d'une solution de Versène (Sigma). Les cellules sont ensuite lavées trois fois dans une solution de PBS puis réparties dans une plaque 96 puits à fond conique à raison de 2.10^5 cellules par puits. Les cellules sont ensuite incubées 15 minutes dans une solution de PBS/BSA1% puis marquées avec 0,2 μ g des anticorps

précédemment cités, dilués dans du PBS/BSA1% pendant 1 heure à 4°C. Après trois lavages dans du PBS, les cellules sont analysées par cytométrie en flux (FACs calibur, BD Biosciences).

Tri cellulaire

A J+7 post-prélèvement, les cellules CD11c⁺ sont isolées par tri magnétique à l'aide d'anticorps anti-mouse CD11c MicroBeads (Miltenyi Biotec) selon le protocole décrit par le fournisseur. Brièvement, les cellules non adhérentes sont conservées et additionnées aux cellules adhérentes décollées par l'utilisation d'une solution de Versène. Les cellules sont ensuite lavées trois fois dans une solution de PBS, comptées puis incubées 15 minutes, à 4°C, dans 500µl d'une solution d'anticorps anti-mouse CD11c MicroBeads (Miltenyi Biotec) diluée au 1/10^{ème} dans du PBS/SVF inactivé 0,1%. Après trois lavages dans du PBS, les cellules marquées sont retenues dans une colonne placée dans un champ magnétique, puis éluées dans une solution de PBS/SVF inactivé 0,1% avant d'être utilisées pour les expérimentations de Réactions Lymphocytaires Mixtes et de cytotoxicité. Le rendement et la purification sont régulièrement supérieurs à 85%.

Réactions Lymphocytaires Mixtes (MLR)

A J+6 et J+7, les cellules CD11c⁺ (respectivement immatures et matures) sont incubées avec 10⁵ PBMCs allogéniques afin d'obtenir les ratios 1/5, 1/10, 1/20, 1/40 et 1/80 (DCs/PBMCs) et cultivées en triplicata, pendant 72 heures, dans un volume final de 200µl de milieu complet en plaque 96 puits à fond plat. A l'issue de cette période, les cellules non adhérentes sont recueillies et incubées avec de la Thymidine tritiée pendant 18 heures [0.5 µCi of [³H]TdR (Amersham Biosciences, USA)] à 37°C, dans une atmosphère humide à 95% d'air et 5% de CO₂. A la suite de ce marquage, les cellules sont adsorbées sur un filtre de fibre de verre et l'incorporation de [³H]TdR est mesurée par les procédures de scintillation standard (Packard Institute, Meriden, CT).

Tests de Cytotoxicité

Après avoir été isolés du sang périphérique par centrifugation sur gradient de densité à l'aide d'une solution de Biocoll, les PBMCs autologues sont activés par incubation avec les cellules CD11c+ « chargées et matures » à J+7. Les PBMCs autologues subissent deux stimulations par les cellules dendritiques à une semaine d'intervalle (J+7 et J+14). Au cours de cet intervalle, les PBMCs sont cultivés dans du milieu complet en présence d'IL-2 humaine recombinante à la concentration de 300U.I./ml. Un témoin négatif est réalisé par l'incubation des PBMCs autologues avec des cellules CD11c+ « matures mais non chargées » dans les mêmes conditions de culture.

L'activité cytotoxique des PBMCs « stimulés » contre les cellules de la lignée tumorale POS-1 est déterminée à J+17, par mesure du relargage du ^{51}Cr par les cellules cibles (POS-1) pendant 6 heures. Brièvement, 10^6 cellules cibles sont marquées avec une solution de ^{51}Cr (Amersham Biosciences) pendant 45 minutes à 37°C dans du milieu complet. Une dilution sériée des PBMCs « stimulés » est effectuée dans du milieu complet. Trois mille cellules cibles sont ensuite incubées avec un nombre croissant de PBMCs dans une plaque 96 puits à fond conique. Les différents ratios sont effectués en triplicata. Les cellules sont ensuite centrifugées 3 minutes à 1500g, et incubées 6 h à 37°C, en présence de 5% CO_2 . Les surnageants cellulaires sont analysés pour déterminer la quantité de ^{51}Cr relargué dans le milieu de culture par l'utilisation des procédures de scintillation standard (Packard Instruments). L'activité de cytotoxicité est exprimée en pourcentage de Chrome relarguée, et calculée selon la formule $[100 \times (\text{relargage expérimentale} - \text{relargage spontané}) / (\text{relargage maximum} - \text{relargage spontané})]$.

Résultats

Les cellules de la lignée POS-1 expriment l'antigène SART-3 et présentent le même Complexe Majeure d'Histocompatibilité de classe I que la souche murine C3H/HanRJ.

Les cellules de la lignée POS-1 sont analysées par cytométrie en flux pour la détermination de l'haplotype des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I ([Figure 23](#)). L'analyse des histogrammes révèle que la fluorescence des cellules POS-1 marquées avec anticorps anti-H2Kd est de même intensité que celle obtenue en présence de l'anticorps contrôle isotypique correspondant ([Figure 23A](#)). En revanche, l'intensité de fluorescence est dix fois plus importante pour les cellules POS-1 marquées avec l'anticorps anti-H2Kk couplé à la phyco-érythrine ([Figure 23C](#)). Les souris de la souche C3H/HanRJ possède un haplotype CMH I de type H2Kk vérifié par le fournisseur. Les données présentées dans la [figure 23](#) montrent que les cellules POS-1 expriment le même haplotype H2Kk que les souris de la souche C3H/HanRJ, mais n'expriment pas l'haplotype H2Kd.

Par ailleurs, l'analyse des produits de RT-PCR pour l'expression de l'antigène SART-3 démontre que celui-ci est exprimé par les cellules de la lignée POS-1 mais pas par les ostéoblastes primaires de souris ([Figure 24](#)).

Les précurseurs myéloïdes cultivés en présence de mGM-CSF et de mIL-4 acquièrent un phénotype CD11c+.

Le CD11c est un marqueur de la différenciation des cellules dendritiques murines. L'étude de cytométrie en flux révèle une augmentation d'un facteur 500 de l'intensité de fluorescence des cellules de la moelle osseuse marquées avec un anticorps anti-CD11c couplé à l'allophycocyanine lorsque celles-ci sont cultivées en présence de mGM-CSF (100 ng/ml) et de mIL-4 (50 ng/ml) pendant 6 jours par rapport à des cellules naïves de moelle osseuse. Les histogrammes de la [figure 25](#) montrent également un changement de morphologie des cellules

notamment une augmentation de la taille et de la granulométrie des cellules différenciées ([Figure 25](#)).

Cette augmentation de l'intensité de fluorescence correspond à une augmentation du pourcentage de cellules exprimant le CD11c ([Figure 26A](#)) mais surtout celle-ci est corrélée à une augmentation du nombre de cellules positives pour le marquage CD11c ([Figure 26B](#)) par rapport à une population de cellules naïves de la moelle osseuse. Il ne s'agit donc pas seulement de la sélection d'une population cellulaire par rapport à une autre, mais de l'acquisition d'un phénotype CD11c+ par différenciation de précurseurs myéloïdes CD11c-.

Le traitement aux rayons U.V. des cellules tumorales POS-1 induit l'apoptose de l'ensemble des cellules en culture.

Afin d'induire l'apoptose des cellules tumorales POS-1 et d'assurer l'absence de survie de ces cellules lors de l'utilisation des corps apoptotiques dans les protocoles d'immunothérapie, les cellules POS-1 sont traitées aux rayons U.V. pendant différentes durées. La [figure 27A](#) montre une corrélation entre l'augmentation du nombre de cellules POS-1 en apoptose et un allongement de la durée du traitement des cellules aux rayons U.V., 24 heures après traitement. Le pourcentage de cellules apoptotiques visualisé par une coloration au Hoescht atteint 65% lorsque les cellules subissent un traitement aux rayons U.V. pendant 60 secondes. La Caspase-3 est une enzyme effectrice terminale du processus d'apoptose cellulaire. Ainsi, l'induction des mécanismes d'apoptose par le traitement aux rayons U.V. est confirmée par l'augmentation de l'activité Caspase-3 en comparaison de cellules POS-1 non traitées ([Figure 27B](#)).

Par ailleurs, un traitement des cellules POS-1 aux rayons U.V. pendant un temps minimum de 60 secondes permet d'induire la mort de l'ensemble de la population cellulaire traitée, 10 jours après le traitement ([Figure : 27C](#)), et par conséquent de prévenir tout risque de prolifération tumorale dans les protocoles *in vivo*.

Les cellules CD11c⁺ phagocytent les corps apoptotiques issus des cellules POS-1.

La détermination de l'activité de phagocytose des corps apoptotiques des cellules POS-1 par les cellules CD11c⁺ dérivées de la moelle osseuse est réalisée en microscopie confocale. Cette technique permet de mettre en évidence une co-localisation des corps apoptotiques marqués en vert et des cellules CD11c⁺ marquées en rouge sur la [figure 28](#). En outre, l'obtention de corps apoptotiques à partir de cellules POS-1 ayant subi un rayonnement U.V. pendant 120 ou 240 secondes n'influence pas leur phagocytose par les cellules dendritiques CD11c⁺ ([Figure : 28A et B](#)).

Le poly-IC et de mTNF α induisent une augmentation de l'expression des molécules du CMH II et de la molécule de co-stimulation CD86 par les cellules CD11c⁺.

L'expression des molécules du CMH II et de co-stimulation CD80 et CD86 par les cellules CD11c⁺ est analysée par cytométrie en flux à J+6 et J+7 après le début de la différenciation des précurseurs myéloïdes. La transition entre J+6 et J+7 correspond à l'étape de maturation des cellules dérivées de la moelle osseuse cultivées en présence de poly-IC (50 μ g/ml) et de mTNF α (20 ng/ml). Les résultats révèlent que l'étape de maturation des cellules ne modifie pas le niveau d'expression du CD11c mais que le pourcentage des cellules exprimant ce marqueur par rapport à l'ensemble des cellules en culture est augmenté ([Figure : 29A et 30](#)). D'autre part, la présence de poly-IC (50 μ g/ml) et de mTNF α (20 ng/ml) dans le milieu de culture induit une augmentation de l'expression des molécules du CMH II et de la molécule de co-stimulation CD86 par les cellules CD11c⁺ ([Figure : 29B et C](#)) de même qu'une augmentation du pourcentage de cellules co-exprimant le CD11c avec l'une de ces deux molécules par rapport à l'ensemble de la population cellulaire ([Figure 30](#)). Par ailleurs, cette étape de maturation ne modifie pas l'expression de la molécule de co-stimulation CD80 par les cellules CD11c⁺ ([Figure 29D](#)).

La phagocytose de corps apoptotiques par les cellules CD11c+ n'influence pas l'étape de maturation.

Les [figures 31, 32](#) et [33](#) résultent de l'analyse par cytométrie en flux des cellules dérivées de la moelle osseuse à J+6 et J+7 après le début de la différenciation des précurseurs myéloïdes, incubées ou non avec différentes sources d'antigènes tumoraux en association ou non avec de l'IFN γ humain à la concentration de 50 ng/ml. L'IFN γ humain est utilisé pour stimuler la maturation des cellules dendritiques notamment par l'augmentation de l'expression des molécules du CMH.

Les histogrammes obtenus révèlent que l'incubation avec des antigènes tumoraux provenant de lysats de cellules POS-1 entraîne une diminution de l'expression du CD11c par les cellules dérivées de la moelle osseuse ainsi qu'une inhibition de l'induction de l'expression des molécules du CMH II et des molécules de co-stimulation CD86 par les cellules CD11c+ cultivées en présence de poly-IC (50 μ g/ml) et de mTNF α (20 ng/ml). En outre, ni la présence d'IFN γ humain, ni la présence de corps apoptotiques de cellules de la lignée POS-1, ni la durée du rayonnement utilisée pour l'obtention de ces corps apoptotiques n'influence l'expression des paramètres étudiés.

La maturation des cellules CD11c+ induit la prolifération de PBMCs allogéniques.

La cytométrie en flux a permis de mettre en évidence une induction de l'expression des molécules de co-stimulation CD86 lors de l'étape de maturation des cellules. Afin de vérifier la fonctionnalité de ces molécules, des tests de réactions lymphocytaires mixtes ont été entrepris. Les cellules CD11c+ sont sélectionnées par tri magnétique à J+6 et J+7 (avant et après l'étape de maturation) puis incubées avec des PBMCs allogéniques. Le graphe de la [figure 34](#) révèle une élévation du niveau d'incorporation de thymidine tritiée par les PBMCs allogéniques lorsqu'ils sont incubés avec des cellules CD11c+ préalablement cultivées 24 heures en présence de poly-IC (50 μ g/ml) et de mTNF α (20 ng/ml). Cette incorporation accrue

de thymidine traduit un état prolifératif plus important, et atteste de la fonctionnalité des molécules de co-stimulation exprimées par les cellules CD11c⁺ dérivées de la moelle osseuse.

La stimulation de PBLs par les cellules CD11c⁺ « maturées » ayant phagocyté des corps apoptotiques n'induit pas de réponse cytotoxique contre la lignée POS-1 *in vitro*.

Cette expérimentation préalable à la mise en place de protocole *in vivo* n'a pas permis de mettre en évidence une activité cytotoxique *in vitro* des PBLs stimulés par les cellules CD11c⁺ « maturées » ayant phagocyté des corps apoptotiques contre la lignée cellulaire POS-1. Le pourcentage de lyse spécifique obtenu est nul et traduit l'absence de réponse immunitaire dirigée contre la lignée tumorale POS-1 (résultats non présentés).

Discussion / conclusion

L'objectif de ce travail était de démontrer la pertinence des protocoles d'immunothérapie pour l'élaboration de nouveaux traitements dans le cadre des pathologies tumorales osseuses et notamment l'ostéosarcome.

Les résultats montrent notamment que les conditions de culture des cellules dérivées de la moelle osseuse de souris C3H/HanRJ permettent d'obtenir un enrichissement de la population cellulaire en cellules dendritiques CD11c⁺ capables de phagocyter des corps apoptotiques de cellules tumorales et d'induire la prolifération de PBLs allogéniques. Cet enrichissement ne résulte pas seulement de la sélection d'une sous-population de cellules myéloïdes par rapport à une autre mais surtout de l'induction de l'expression de marqueurs de différenciation par les précurseurs myéloïdes.

La mise en place de ces protocoles dans notre modèle d'ostéosarcome murin repose sur l'adaptation de protocoles d'immunothérapie décrits chez l'homme dans le cadre notamment du traitement du mésothéliome [Gregoire et coll. (2003) ; Ebstein et coll. (2004)] ou des métastases pulmonaires issues de fibrosarcome primaire [Geiger et coll (2000)], mais également sur une adaptation des protocoles d'immunothérapie réalisés chez la souris pour d'autres modèle tumoraux tel que le carcinome colique [Tasaki et coll (1998) ; Saha et coll. (2003)]. Les résultats obtenus concordent avec les données de la littérature [Gregoire et coll. (2003) ; Ebstein et coll. (2004) ; Geiger et coll (2000) ; Tasaki et coll (1998) ; Saha et coll. (2003)] et montrent la possibilité de généraliser ces protocoles d'immunothérapie tant ils semblent transposables d'une espèce à une autre.

Néanmoins, si les cellules CD11c⁺ issues de notre modèle murin permettent d'induire une prolifération lymphocytaire, elles échouent dans la mise en place d'une réponse anti-tumorale *in vitro*, en raison de l'absence de lyse spécifique contre la lignée POS-1 (résultats préliminaires).

Plusieurs hypothèses peuvent être évoquées, à différents niveaux. En effet, (i) les lymphocytes peuvent présenter un défaut d'activation, (ii) être activés mais ne pas reconnaître les cellules tumorales, (iii) les cellules tumorales peuvent être résistante à la lyse spécifique ou non des cellules immunitaires, ou (iiii) induire l'apoptose des lymphocytes activés via l'expression de molécules telles que FAS Ligand.

Des données de la littérature montrent que la phagocytose de corps apoptotiques entraîne parfois une diminution de l'état de maturation des cellules dendritiques [Ebstein et coll. (2004)]. Pourtant, nos travaux révèlent dans notre modèle que cette étape ne modifie pas le niveau de différenciation des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse ni le niveau d'expression des molécules du CMH II ou des molécules de co-stimulation CD86 ([Figures : 31, 32 et 33](#)).

Au cours du processus de tumorigenèse, les cellules tumorales perdent l'expression de marqueurs de différenciation au profit d'une prolifération accrue [Sung et coll. (2002)]. Ce processus induit également dans certains cas une diminution de l'expression des molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité [Cabera et coll. (1998)] comme cela a pu être observé avec la lignée d'ostéosarcome murin POS-1. En effet, la culture des cellules POS-1 pendant un temps supérieur à six mois induit une diminution de l'expression des molécules du CMH I mais sans affecter l'expression de l'antigène tumoral SART-3 par celles-ci (données non présentées). Par conséquent, la diminution de l'expression des molécules du CMH I par les cellules POS-1 pourrait permettre à ces cellules d'échapper à une réponse lymphocytaire cytotoxique *in vitro* et expliquer en partie l'absence de lyse spécifique observée. Cette hypothèse nécessite d'être vérifiée par la réalisation de nouveaux tests *in vitro* de cytotoxicité lymphocytaire dirigée contre les cibles cellulaires de la lignée POS-1 exprimant fortement (cellules ayant subi peu de passages) ou faiblement les molécules du CMH I (durée de culture supérieure à 6 mois).

Par ailleurs, la molécule CTLA-4 a été décrite pour son rôle inhibiteur dans la réponse immunitaire [Janeway et coll. (1996)]. En effet, l'injection d'anticorps anti-CTLA4, combinée à une surexpression du CD80 par les cellules ostéosarcomateuses LM-8, induit une régression tumorale dans un modèle murin d'ostéosarcome sous-cutané [Nagamori et coll. (2002)]. Par ailleurs, Davila et coll. ont démontré que l'utilisation d'un anticorps anti-CTLA4 augmentait la réponse lymphocytaire anti-tumorale et la survie des animaux dans un modèle de mélanome murin [Davila et coll. (2003)]. En conséquence, une analyse de l'expression de cette molécule par les cellules de la lignée POS-1 ainsi que l'utilisation, le cas échéant, d'un anticorps bloquant seront nécessaires afin de déterminer le rôle potentiel du CTLA-4 dans l'absence de réponse anti-tumorale observée *in vitro*. La même investigation sera entreprise pour vérifier l'expression du Fas Ligand par les cellules POS-1.

Cependant, si différents mécanismes d'échappement des tumeurs à la réponse anti-tumorale ont été décrits, il existe également des sous-populations de cellules du système immunitaire capables de réguler et d'inhiber la réponse lymphocytaire cytotoxique [Morel et coll. (2003) ; Goldschneider et coll. (2003)].

La sélection par tri magnétique des cellules CD11c⁺ ne permet pas d'exclure une quelconque contamination par d'autres cellules dérivées de la moelle osseuse (environ 15% de cellules contaminantes) mais surtout ne distingue pas les sous-populations de cellules dendritiques CD11c⁺. Une suite à ce travail sera donc dans un premier temps de caractériser les cellules contaminantes puis d'isoler chaque sous-population de cellules CD11c⁺/CD8⁺, CD11c⁺/CD4⁺ et CD11c⁺/CD45R⁺ afin d'évaluer leur potentiel inhibiteur et de déterminer leur efficacité respective dans l'établissement d'une réponse cytotoxique *in vitro*. En effet, Suss et coll. ont mis en évidence le rôle tolérogène médié par l'expression du Fas Ligand des DCs murines CD8 α + [Suss et coll. (1996)].

Malgré ces interrogations, les travaux réalisés montrent que ce modèle murin d'ostéosarcome demeure encourageant pour la mise au point de protocoles d'immunothérapie active dans le cadre du traitement des pathologies osseuses tumorales primitives. Ces investigations sont d'autant plus prometteuses que les cellules de la lignée d'ostéosarcome POS-1 expriment le CD80 et le CD86 (données non présentées). En effet, les travaux de Nagamori et coll. et Tsuji et coll. révèlent les bénéfices thérapeutiques de la surexpression de B7.1 par les cellules tumorales, sur la dissémination métastatique et la survie des animaux traités, dans deux modèles d'ostéosarcome de souris et de rat [Nagamori et coll (2002) ; Tsuji et coll. (2002 ; 2003)]. Les recherches s'orientent désormais vers la détermination des mécanismes d'inhibition de la cytotoxicité *in vitro* afin de pouvoir les lever et permettre le développement des protocoles *in vivo* chez la souris.

Enfin, afin de déterminer l'importance de l'antigène SART-3 dans la réponse anti-tumorale contre les cellules ostéosarcomateuses de la lignée POS-1, des essais de surexpression et de knock-down du gène de la protéine SART-3 sont envisagés.

Synthèse et conclusions de la troisième partie.

Les deux modèles d'immunothérapie que nous avons utilisés offrent de nombreuses perspectives et même si les travaux portant sur l'utilisation de cellules dendritiques cytotoxiques apparaissent plus aboutis, le développement du potentiel thérapeutique des DCs « classiques », dérivées de la moelle osseuse dans le modèle d'ostéosarcome murin POS-1, se justifie par des résultats préliminaires *in vitro* encourageants (phagocytose et stimulation de la prolifération de PBMCs) et l'expression par les cellules POS-1 de l'antigène tumoral SART-3. La comparaison des populations de DCs spléniques de rat avec les DC murines est difficile en raison de l'absence du marqueur CD8 α sur les DC de rat. Le marqueur CD4 a finalement permis de séparer les DC murines en CD4⁺ et CD4⁻ [Vremec et coll. (2000)]. De nombreux arguments *in vitro* permettent d'établir un lien entre les DCs CD4⁻ chez le rat et la population murine CD8⁺/CD4⁻ notamment en terme de forte production d'IL-12 et de l'expression commune du CD103 [McLellan et coll. (2002)]. Par conséquent, afin de corrélérer ces résultats, une des perspectives futures sera de déterminer par tri cellulaire, l'efficacité des différentes sous-populations de DC murines, notamment spléniques, dans l'établissement d'une réponse anti-tumorale dans le modèle d'ostéosarcome murin POS-1.

Par ailleurs, le développement de ces nouveaux outils thérapeutiques dans le cadre des pathologies osseuses tumorales primitives apparaît comme une suite logique de l'évolution d'une nouvelle thématique que constitue l'ostéo-immunologie. En effet, les données de la littérature révèlent une augmentation constante des données concernant les multiples interactions existant entre les systèmes osseux et immunitaire [Walsh et coll. (2003)]. L'ostéoclaste est une cellule d'origine hématopoïétique qui partage des précurseurs communs avec les cellules dendritiques. Des études montrent la possibilité de formation de cellules ostéoclastiques à partir de cultures de splénocytes *in vitro* [Hayashi et coll. (2003)]. Plus

récemment deux équipes ont démontré la plasticité des cellules dendritiques murines immatures et matures et leur capacité à se transdifférencier en ostéoclastes [Rivollier et coll. (2004) ; Blin-Wakkach et coll. (2004)].

Par ailleurs, la triade moléculaire OPG/RANK/RANKL est largement impliquée dans chacun des deux systèmes. En effet, les modèles murins transgéniques RANK^{-/-} et RANKL^{-/-} mettent en évidence l'apparition d'une ostéopétrose sévère, en relation avec l'absence de formation ostéoclastique associée à un défaut de la formation des nœuds lymphatiques et de la maturation des lymphocytes B et T [Kong et coll. (1999)]. D'autre part, les rhumatismes inflammatoires conduisent à une érosion osseuse et la production de RANKL par les lymphocytes T activés est capable d'induire la formation d'ostéoclastes fonctionnels [O'Gradaigh et coll. (2004)]. En outre, le rôle de RANKL dans le système immunitaire a été étendu et plusieurs équipes ont démontré que RANKL augmente la survie des DCs [Anderson et coll. (1997) ; Wong et coll. (1997) ; Cremer et coll. (2002) ; Wiethe et coll. (2003)].

Par conséquent, la surexpression systémique de RANKL soluble sera prochainement étudiée dans notre modèle d'ostéosarcome de rat en association avec le protocole d'immunothérapie utilisant les splénocytes CD4⁻, afin de déterminer l'influence de cette cytokine sur la balance résorption osseuse/ réponse anti-tumorale et la survie des DCs.

D'autre part, les interactions entre le tissu osseux et le système immunitaire ne se limitent pas à la triade moléculaire OPG/RANK/RANKL. En effet, l'équipe de Matthew Gillespie a récemment découvert une nouvelle lectine de type C nommée OsteoClast Inhibitory Lectine (OCIL), exprimée par les ostéoblastes, les cellules dendritiques et les populations lymphocytaire, et capable d'inhiber la formation ostéoclastique [Zhou et coll. (2001)]. De plus, cette molécule joue également un rôle dans la régulation de l'activité des cellules Natural Killer [Iizuka et coll. (2003)] et de la prolifération des cellules T [Marzio et coll. (1999)]. Ces découvertes renforcent les liens entre l'environnement osseux et les effecteurs de la réponse

immunitaire et soulignent encore un peu plus la pertinence du développement des protocoles d'immunothérapie pour le traitement des pathologies osseuses tumorales.

Conclusions générales et perspectives.

Le tissu osseux est un tissu conjonctif minéralisé dont la composition, l'organisation et la dynamique assurent sa fonction mécanique de soutien et son rôle dans l'homéostasie minérale. Pour conserver ses propriétés, l'os est constamment détruit puis reconstruit au cours des différentes phases de résorption et de formation qui équilibrent le remodelage osseux. Ainsi, le tissu osseux résulte de l'équilibre entre les activités ostéoblastique et ostéoclastique, c'est-à-dire, qu'il évolue au rythme des interactions entre les tissus mésenchymateux et hématopoïétiques qui le composent. Ces relations inter-tissulaires sont principalement régulées par des cytokines appartenant à la superfamille des Tumor Necrosis Factors (TNF) et de leurs récepteurs. A cet effet, la triade OPG, RANK, RANKL représente un pivot moléculaire vers lequel convergent la plupart des systèmes régulateurs de la résorption osseuse connus à ce jour.

Dans la première partie de cette thèse, nous avons pu confirmer les effets pro-résorptifs et anti-résorptifs respectivement des cytokines RANKL et OPG sur un modèle de cultures primaires d'ostéoclastes de lapereaux. Ces activités n'ont cependant pas pu être confirmées dans des cultures de cellules différenciées de la lignée RAW 264.7.

Néanmoins, chacun des deux modèles a permis de mettre en évidence le résultat majeur de cette première partie, à savoir la démonstration d'un effet direct de l'OPG sur l'activité des cellules ostéoclastiques (transcription, activité enzymatique, signalisation intra-cellulaire). En effet, l'OPG a été largement décrite comme simple récepteur leurre, inhibiteur de la fixation de RANKL sur son récepteur RANK à la surface des précurseurs ostéoclastiques, et empêchant par conséquent la différenciation et l'activation de ceux-ci. Ainsi, les résultats présentés montrent pour la première fois un effet direct de l'OPG sur l'activité enzymatique de cellules ostéoclastiques.

Un des objectifs de cette recherche a donc été de démontrer la présence d'un récepteur spécifique à l'OPG sur les ostéoclastes. Des travaux réalisés au laboratoire ont permis de dégager et de vérifier par BIAcore quelques hypothèses, notamment la possibilité de la fixation de l'OPG à des protéoglycanes de surface, mais également la possibilité de formation d'un complexe trimérique OPG-RANKL-RANK. Cependant, nous ne savons pas si ces interactions représentent une réalité biologique et nous n'avons pas pu mettre en évidence d'autres récepteurs ostéoclastiques spécifiques de l'OPG. Par conséquent, l'objectif de départ n'est que partiellement atteint mais des travaux se poursuivent actuellement pour tenter de déterminer des structures cellulaires réceptrices potentielles.

La mise en place de nouveaux protocoles de traitements des pathologies osseuses tumorales (ou non) nécessite une meilleure connaissance de la physiologie du tissu osseux. Les résultats de la première partie ont permis de contribuer à étendre ces connaissances, notamment dans la détermination des activités biologiques de la triade moléculaire OPG, RANK, RANKL sur les cellules ostéoclastiques. OPG et RANKs représentent un potentiel thérapeutique pour l'élaboration de traitements des pathologies osseuses. Afin de définir nos axes de recherche, nos résultats ont été confrontés à ceux de la littérature. Les données révèlent la pertinence du potentiel thérapeutique de ces molécules et pourraient être résumées par une adaptation du titre de la revue écrite par Hofbauer LC et collaborateurs : *RANK, RANK ligand and Osteoprotegerin : the good, the bad, and the ugly in bone tumours diseases* [Hofbauer et coll. (2001)]. En effet, en terme de traitement des tumeurs osseuses secondaires RANK semble avoir quelques effets anti-tumoraux (inhibition du développement tumoral en site osseux) ou pas d'effets, mais quelque soit le modèle RANK soluble ne présente pas d'effets secondaires. A l'inverse RANKL est clairement impliqué dans la création d'un contexte favorable au développement tumoral et l'OPG montre à la fois des effets anti-tumoraux (inhibition de

prolifération et régression tumorale) et pro-tumoraux (fixation de TRAIL et inhibition de l'apoptose des cellules tumorales).

Nos travaux ont pu mettre en évidence sur un modèle de tumeur osseuse primitive de rat, l'absence d'effets anti-tumoraux en présence de RANK soluble et à l'inverse une régression tumorale complète chez les rats traités avec une construction virale recombinante d'OPG. Des travaux, présentés au congrès de l'ASBMR 2004, démontrent l'effet pro-tumoral de la forme complète de l'OPG et à l'inverse l'effet anti-tumoral de la forme tronquée de l'OPG (acides aminés 1-194) sur un modèle murin d'adéno-carcinôme mammaire. Afin de compléter cette étude, la construction virale contenant la forme tronquée de l'OPG est en cours de production et sera prochainement testée dans notre modèle d'ostéosarcome de rat en comparaison avec la forme complète. En outre, afin d'éviter les biais méthodologiques dus à la spécificité d'un modèle par rapport à un autre, le même travail devra être réalisé sur le modèle d'ostéosarcome de souris POS-1.

Par ailleurs, compte tenu de l'implication de RANKL dans la diminution de la prolifération des cellules tumorales POS-1 et dans la survie des cellules dendritiques, une étude est envisagée pour tester l'influence de la surexpression systémique de RANKL sur le développement tumoral dans chacun des modèles d'ostéosarcome de rat et de souris. Enfin, de façon à s'affranchir du caractère immunogène des particules virales et afin de transposer ces stratégies thérapeutiques à l'homme, un des objectifs de ce travail consiste actuellement à développer, en collaboration avec l'équipe de Bruno Pitard (Inserm, U533, Nantes), de nouveaux vecteurs synthétiques de transfert de gène capables d'induire la surexpression une construction recombinante in vivo.

En raison de leur complexité, le développement des protocoles de thérapie génique nécessitera à terme d'être renforcés notamment par l'immunothérapie active. Ces thérapies cellulaires se justifient dans le cadre du traitement des pathologies osseuses tumorales primitives et

secondaires en raison, (i) des limites des traitements conventionnels, (ii) de l'implication de la triade OPG/RANK/RANKL dans la régulation du système immunitaire et (iii) de l'expression d'antigènes tumoraux connus pour l'ostéosarcome.

L'objectif des travaux de cette troisième partie était de démontrer la pertinence et la faisabilité de l'utilisation des protocoles d'immunothérapie active, déjà décrits pour d'autres pathologies malignes, et de les transposer à des modèles animaux d'ostéosarcome.

Mais il s'agissait également d'explorer de nouvelles stratégies par l'utilisation de sous-populations de cellules dendritiques présentant des spécificités dans le cadre des réponses anti-tumorales.

Les deux modèles d'immunothérapie offrent de nombreuses perspectives. Ainsi, les travaux portant sur l'utilisation de cellules dendritiques cytotoxiques montrent une action anti-tumorale dans le modèle d'ostéosarcome de rat et le développement du potentiel thérapeutique des DCs « classiques », dérivées de la moelle osseuse dans le modèle d'ostéosarcome murin POS-1, se justifie par l'obtention de résultats préliminaires *in vitro* encourageants (phagocytose et stimulation de la prolifération de PBMCs) et l'expression par les cellules POS-1 de l'antigène tumoral SART-3.

A l'avenir, les perspectives de cette étude seront de déterminer les mécanismes d'action des DCs cytotoxiques et leur intérêt soit dans la présentation d'antigènes tumoraux et l'activation lymphocytaire, soit dans une activité anti-tumorale directe. Par ailleurs, des expériences de knockdown (siRNA) et de surexpression de l'antigène SART-3 par les cellules POS-1 seront réalisées afin de tester le rôle de cet antigène dans la réponse anti-tumorale. En outre, la mise en place de ces protocoles sera couplée à l'étude de surexpression systémique de RANKL.

Depuis le début jusqu'à la conclusion de cet ouvrage, nous sommes passés de l'étude du remodelage osseux à l'étude de la réponse immunitaire anti-tumorale. Cette transition illustre les relations inter-tissulaires privilégiées qui s'établissent entre le tissu osseux et le tissu

hématopoïétique et mettent en évidence une thématique en constante progression : l'ostéo-immunologie.

Cette thématique est renforcée par la possibilité de transdifférenciation des cellules dendritiques en ostéoclastes. Si l'inverse s'avère également réalisable, alors ces résultats pourraient positionner l'ostéoclaste en partie en tant que source et solution des pathologies osseuses tumorales.

Références Bibliographiques

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

Aiello EJ, Tworoger SS, Yasui Y, Stanczyk FZ, Potter J, Ulrich CM, Irwin M, McTiernan A. Associations among Circulating Sex Hormones, Insulin-Like Growth Factor, Lipids, and Mammographic Density in Postmenopausal Women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14:1411-7.

Alapetite C, Blay JY. Traitements non chirurgicaux des tumeurs des os : chimiothérapie et radiothérapie. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale* 14-702 (2001)

Allouche M, Delbruck HG, Klein B, Masse R, Matar A, Morin M, Lafuma J, Jasmin C. Malignant bone tumours induced by a local injection of colloidal radioactive ¹⁴⁴Cerium in rats as a model for human osteosarcomas. *Int J Cancer*. 1980;26:777-82.

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

Ardavin C. Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells. *Nat Rev Immunol*. 2003;3:582-90.

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 and Dougall WC. A RANK/TRAFF6-dependent signal transduction pathway is essential for osteoclast cytoskeletal organization and resorptive function, *J Biol Chem* 2002;277:44347-56.

Atkins GJ, Bouralexis S, Haynes DR, Graves SE, Geary SM, Evdokiou A, Zannettino AC, Hay S, Findlay DM. Osteoprotegerin inhibits osteoclast formation and bone resorbing activity in giant cell tumors of bone. *Bone*. 2001;28:370-7.

Berzofsky JA, Terabe M, Oh S, Belyakov IM, Ahlers JD, Janik JE, Morris JC. Progress on new vaccine strategies for the immunotherapy and prevention of cancer. *J Clin Invest*. 2004;113:1515-25.

Bharti AC, Aggarwal BB. Ranking the role of RANK ligand in apoptosis. *Apoptosis*. 2004;9:677-90.

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.

Blin-Wakkach C, Wakkach A, Rochet N, Carle GF. Characterization of a novel bipotent hematopoietic progenitor population in normal and osteopetrotic mice. *J Bone Miner Res*. 2004;19:1137-43.

Body JJ, Greipp P, Coleman RE, Facon T, Geurs F, Fermand JP, Harousseau JL, Lipton A, Mariette X, Williams CD, et al. A phase I study of AMG-007, a recombinant osteoprotegerin construct, in patients with multiple myeloma or breast carcinoma related bone metastases. *Cancer*. 2003;97:887-92.

Bolon B, Carter C, Daris M, Morony S, Capparelli C, Hsieh A, Mao M, Kostenuik P, Dunstan CR, Lacey DL, Sheng JZ. Adenoviral delivery of osteoprotegerin ameliorates bone resorption in a mouse ovariectomy model of osteoporosis. *Mol Ther*. 2001;3:197-205.

Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003;423:337-42.

Bramwell VH. Osteosarcomas and other cancers of bone. *Curr Opin Oncol*. 2000;12:330-6.

Braun SE, Chen K, Blazar BR, Orchard PJ, Sledge G, Robertson MJ, Broxmeyer HE,

Cornetta K. Flt3 ligand antitumor activity in a murine breast cancer model: a comparison with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and a potential mechanism of action. *Hum Gene Ther*. 1999;10:2141-51.

Brubaker KD, Corey E, Brown LG, Vessella RL. Bone morphogenetic protein signaling in prostate cancer cell lines. *J Cell Biochem*. 2004;91:151-60.

Brubaker KD, Vessella RL, True LD, Thomas R, Corey E. Cathepsin K mRNA and protein expression in prostate cancer progression. *J Bone Miner Res*. 2003;18:222-30.

Brugger W, Schneider A, Schammann T, Dill P, Grunebach F, Buhning HJ, Kanz L, Brossart P. Dendritic cell-based vaccines in patients with hematological malignancies. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;938:359-62

Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J and Caparelli C et al. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification, *Gene Dev* 1998;12:1260–1268.

Cabrera T, Collado A, Fernandez MA, Ferron A, Sancho J, Ruiz-Cabello F, Garrido F. High frequency of altered HLA class I phenotypes in invasive colorectal carcinomas. *Tissue Antigens*. 1998;52:114-23.

Cancedda R, Castagnola P, Cancedda FD, Dozin B, Quarto R. Developmental control of chondrogenesis and osteogenesis. *Int J Dev Biol*. 2000;44:707-14.

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.

Castelli C, Rivoltini L, Andreola G, Carrabba M, Renkvist N, Parmiani G. T-cell recognition of melanoma-associated antigens. *J Cell Physiol*. 2000;182:323-31

Cavalcant-Adam EA, Shapiro IM, Composto RJ, Macarak EJ, Adams CS. RGD peptides immobilized on a mechanically deformable surface promote osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res*. 2002;17:2130-40.

Cecchini MG, Hofstetter W, Halasy J, Wetterwald A, Felix R. Role of CSF-1 in bone and bone marrow development. *Mol Reprod Dev.* 1997;46:75-83; discussion 83-4.

Chakravarty PK, Alfieri A, Thomas EK, Beri V, Tanaka KE, Vikram B, Guha C. Flt3-ligand administration after radiation therapy prolongs survival in a murine model of metastatic lung cancer. *Cancer Res.* 1999;59:6028-32.

Charnaux N, Brule S, Hamon M, Chaigneau T, Saffar L, Prost C, Lievre N, Gattegno L. Syndecan-4 is a signaling molecule for stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/ CXCL12. *FEBS Letters* 2005;272:1937-51.

Chavassieux P, Meunier P. Histologie et cytologie de l'os normal. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale* 14-002-A-10 (2003)

Chenu C, Delmas PD. Physiologie de l'os. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale* 14-002-B-10 (1994)

Chipoy C, Berreur M, Couillaud S et al Down-regulation of osteoblast markers and induction of the glial fibrillary acidic protein by Oncostatin M in osteosarcoma cells require PKC α and STAT3. *J Bone Miner Res* 2004; 19:1850-1861.

Chirgwin JM, Guise TA. Molecular mechanisms of tumor-bone interactions in osteolytic metastases. *Crit. Rev. Eukaryot Gene Expr* 2000;10:159-178

Corey E, Brown LG, Kiefer JA, Quinn JE, Pitts TE, Blair JM, Vessella RL. Osteoprotegerin in prostate cancer bone metastasis. *Cancer Res.* 2005;65:1710-8.

Cremer I, Dieu-Nosjean MC, Marechal S, Dezutter-Dambuyant C, Goddard S, Adams D, Winter N, Menetrier-Caux C, Sautes-Fridman C, Fridman WH, Mueller CG. Long-lived immature dendritic cells mediated by TRANCE-RANK interaction. *Blood.* 2002;100:3646-55.

Croucher PI, Shipman CM, Lippitt J, Perry M, Asosingh K, Hijzen A, Brabbs AC, van Beek EJ, Holen I, Skerry TM, Dunstan CR, Russell GR, Van Camp B, Vanderkerken K. Osteoprotegerin inhibits the development of osteolytic bone disease in multiple myeloma. *Blood.* 2001;98:3534-40.

Dasmin JG, Djenadi K, Josset P, Wioland M. Cartilage de croissance et croissance en orthopédie. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale* 14-009-A-10 (1996)

Davila E, Kennedy R, Celis E. Generation of antitumor immunity by cytotoxic T lymphocyte epitope peptide vaccination, CpG-oligodeoxynucleotide adjuvant, and CTLA-4 blockade. *Cancer Res.* 2003;63:3281-8.

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

Delaissé J-M, Andersen TL, Engsig MT, Henriksen K, Troen T, Blavier L. Matrix Metalloproteinases (MMP) and Cathepsin K contribute differently to osteoclastic activities. *Microsc Res Tech* 2003; 61: 504-513.

Delaisse JM, Engsig MT, Everts V, del Carmen Ovejero M, Ferreras M, Lund L, Vu TH, Werb Z, Winding B, Lochter A, et al. Proteinases in bone resorption: obvious and less obvious roles. *Clin Chim Acta*. 2000;291:223-34.

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

Dubousset J, Forest M, Tomeno B. Tumeurs des os. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale* 14-700 (2001)

Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, and Karsenty G (1997). *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89; 747-754.

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.

Ebstein F, Sapede C, Royer PJ, Marcq M, Ligeza-Poisson C, Barbieux I, Cellerin L, Dabouis G, Gregoire M. Cytotoxic T cell responses against mesothelioma by apoptotic cell-pulsed dendritic cells. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;169:1322-30.

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.

Enneking WF, Spanier SS, Goodman MA. A system for the surgical staging of musculoskeletal sarcoma. *Clin Orthop* 1980 ; 153 : 106-20

Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*. 2003;3:453-8.

Finke J, Ferrone S, Frey A, Mufson A, Ochoa A. Where have all the T cells gone? Mechanisms of immune evasion by tumors. *Immunol Today*. 1999;20:158-60.

Fisher, J.L., Thomas-Mudge, R.J., Elliot, J., Hards, D.K., Sims, N.A., Dunstan, C.R., Slavin, J., Martin, T.J., & Gillespie, M.T.. Fc-OPG osteoclast activity while tumor-derived OPG enhances tumor growth [abstract]. *J Bone Miner Res* 2003;18:S63.

Geiger J, Hutchinson R, Hohenkirk L, McKenna E, Chang A, Mule J. Treatment of solid tumours in children with tumour-lysate-pulsed dendritic cells. *Lancet*. 2000;356:1163-5.

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.

Glowacki J, Rey C, Glimcher MJ, Cox KA, Lian J. A role for osteocalcin in osteoclast differentiation. *J Cell Biochem*. 1991;45:292-302.

Goldschneider I, Cone RE. A central role for peripheral dendritic cells in the induction of acquired thymic tolerance. *Trends Immunol*. 2003;24:77-81.

Gregoire M, Ligeza-Poisson C, Juge-Morineau N, Spisek R. Anti-cancer therapy using dendritic cells and apoptotic tumour cells: pre-clinical data in human mesothelioma and acute myeloid leukaemia. *Vaccine*. 2003;21:791-4.

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.

Guinebretière M, Le Cesne A, Le Péchoux C, Missenard G, Bonvalot S, Terrier P, Vanel D. Ostéosarcome de forme commune. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale* 14-704 (2001)

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

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.

Hang 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.

Hauschka PV, Mavrakos AE, Iafrati MD, Doleman SE, Klagsburn M. Growth factors in bone matrix. Isolation of multiple types by affinity chromatography on heparin sepharose. *J Biol Chem* 1986 ; 261 : 12665-74

Hay E, Lemonnier J, Fromigue O, Marie PJ. Bone morphogenetic protein-2 promotes osteoblast apoptosis through a smad-independent, protein kinase C-dependent signaling pathway. *J Biol Chem* 2001; 276: 29028-29036.

Hayashi S, Yamada T, Tsuneto M, Yamane T, Takahashi M, Shultz LD, Yamazaki H. Distinct osteoclast precursors in the bone marrow and extramedullary organs characterized by responsiveness to Toll-like receptor ligands and TNF-alpha. *J Immunol*. 2003;171:5130-9.

Hegmans JP, Hemmes A, Aerts JG, Hoogsteden HC, Lambrecht BN. Immunotherapy of murine malignant mesothelioma using tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171:1168-77.

Henri S, Vremec D, Kamath A, Waithman J, Williams S, Benoist C, Burnham K, Saeland S, Handman E, Shortman K. The dendritic cell populations of mouse lymph nodes. *J Immunol.* 2001;167:741-8.

Hofbauer LC, Heufelder AE, Erben RG. Osteoprotegerin, RANK, and RANK ligand: the good, the bad, and the ugly in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2001;28:685-7.

Hofbauer LC, Heufelder AE. Role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med* 2001;79:243-53

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 : 4743-46

Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR et al Tumor Necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 3540-3545.

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 L, Cheng YY, Chow LTC, Zheng MH, Kumta SM. Tumour cells produce receptor activator of NF-kB ligand (RANKL) in skeletal metastases. *J Clin Pathol* 2002; 55:877-878.

Hubert FX, Voisine C, Louvet C, Heslan M, Josien R. Rat plasmacytoid dendritic cells are an abundant subset of MHC class II+ CD4+CD11b-OX62- and type I IFN-producing cells that exhibit selective expression of Toll-like receptors 7 and 9 and strong responsiveness to CpG. *J Immunol.* 2004;172:7485-94.

Hussain MA, Schmitz O, Christiansen JS, Zapf J, Froesch ER. Metabolic effects of insulin-like growth factor-I: a focus on insulin sensitivity. *Metabolism.* 1995;44:108-12.

Iizuka K, Naidenko OV, Plougastel BF, Fremont DH, Yokoyama WM. Genetically linked C-type lectin-related ligands for the NKRP1 family of natural killer cell receptors. *Nat Immunol.* 2003;4:801-7.

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.

Inoue H, Nishimura K, Oka D, Nakai Y, Shiba M, Tokizane T, Arai Y, Nakayama M, Shimizu K, Takaha N, Nonomura N, Okuyama A. Prostate cancer mediates osteoclastogenesis through two different pathways. *Cancer Lett.* 2005;223:121-8.

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

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.

Ito R, Nakayama H, Yoshida K, Kuraoka K, Motoshita J, Oda N, Oue N, Yasui W. Expression of osteoprotegerin correlates with aggressiveness and poor prognosis of gastric carcinoma. *Virchows Arch.* 2003;443:146-51.

Ito T, Liu YJ, Kadowaki N. Functional diversity and plasticity of human dendritic cell subsets. *Int J Hematol.* 2005;81:188-96.

Janeway CA, Travers P and Travers J. Immunobiology, second edition. Current Biology Ltd. (1996)

Kafienah W, Bromme D, Buttle DJ, Croucher LJ, Hollander AP. Human cathepsin K cleaves native type I and II collagens at the N-terminal end of the triple helix. *Biochem J* 1998; 331: 727-732.

Kalos M. Tumor antigen-specific T cells and cancer immunotherapy: current issues and future prospects. *Vaccine.* 2003;21:781-6.

Kamijo A, Koshino T, Uesugi M, Nitto H, Saito T. Inhibition of lung metastasis of osteosarcoma cell line POS-1 transplanted into mice by thigh ligation. *Cancer Lett.* 2002;188:213-9.

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

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

Karsunky H, Merad M, Cozzio A, Weissman IL, Manz MG. Flt3 ligand regulates dendritic cell development from Flt3⁺ lymphoid and myeloid-committed progenitors to Flt3⁺ dendritic cells in vivo. *J Exp Med.* 2003;198:305-13.

Kawamura C, Kizaki M, Ikeda Y. Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) induces apoptosis in human myeloma cells. *Leuk Lymphoma* 2002; 43: 635-639.

Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology* 2001;142:5050-55

Kim HH, Lee DE, Shin JN, Lee YS, Jeon YM and Chung CH et al., Receptor activator of NF- κ B recruits multiple TRAF family adaptors and activates c-Jun N-terminal kinase, *FEBS Lett* 1999;443:297–302.

Kiviranta R, Morko J, Alatalo SL, NicAmhlaoibh R, Risteli J, Laitala-Leinonen T, Vuorio E. Impaired bone resorption in cathepsin K-deficient mice is partially compensated for by enhanced osteoclastogenesis and increased expression of other proteases via an increased RANKL/OPG ratio. *Bone.* 2005;36:159-72.

Klein ML, Kenan S, Lewis MM. Osteosarcoma: clinical and pathological considerations. *Orthop Clin North Am* 1989; 20:327-345.

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.

Kong YY, Feige U, Sarosi I, Bolon B, Tafuri A, Morony S, Capparelli C, Li J, Elliott R, McCabe S, Wong T, et al. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature*. 1999;402:304-9.

Kontny HU, Lehnbecher TM, Chanock SJ, Mackall CL. Simultaneous expression of Fas and nonfunctional Fas ligand in Ewing's sarcoma. *Cancer Res*. 1998;58:5842-9.

Kugler A, Stuhler G, Walden P, Zoller G, Zobywalski A, Brossart P, Trefzer U, Ullrich S, Muller CA, Becker V, Gross AJ, Hemmerlein B, Kanz L, Muller GA, Ringert RH. Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids. *Nat Med*. 2000;6:332-6.

Kurata K, Uemura T, Nemoto A, Tateishi T, Murakami T, Higaki H, Miura H, Iwamoto Y. Mechanical strain effect on bone-resorbing activity and messenger RNA expressions of marker enzymes in isolated osteoclast culture. *J Bone Miner Res*. 2001;16:722-30.

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

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.

Kyrtsonis MC, Vassilakopoulos TP, Siakantaris MP, Kokoris SI, Gribabis DA, Dimopoulou MN, Angelopoulou MK, Pangalis GA. Serum syndecan-1, basic fibroblast growth factor and osteoprotegerin in myeloma patients at diagnosis and during the course of the disease. *Eur J Haematol*. 2004;72:252-8.

Lee ZH, Kim H-H. Signal transduction by receptor activator of nuclear factor kappa B in osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 305 :211-214.

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

Littlewood-Evans AJ, Bilbe G, Bowler WB, Farley D, Wlodarski B, Kokubo T, Inaoka T, Sloane J, Evans DB, Gallagher JA. The osteoclast-associated protease cathepsin K is expressed in human breast carcinoma. *Cancer Res*. 1997;57:5386-90.

Loutit JF, Nisbet NW. The origin of osteoclasts. *Immunobiology*. 1982;161:193-203.

Ludewig B, Krebs P, Junt T, Metters H, Ford NJ, Anderson RM, Bocharov G. Determining control parameters for dendritic cell-cytotoxic T lymphocyte interaction. *Eur J Immunol*. 2004;34:2407-18.

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.

Mandelin J, Li TF, Hukkanen M, Liljestrom M, Salo J, Santavirta S, Konttinen YT. Interface tissue fibroblasts from loose total hip replacement prosthesis produce receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand, osteoprotegerin, and cathepsin K. *J Rheumatol.* 2005;32:713-20.

Marroquin CE, Westwood JA, Lapointe R, Mixon A, Wunderlich JR, Caron D, Rosenberg SA, Hwu P. Mobilization of dendritic cell precursors in patients with cancer by flt3 ligand allows the generation of higher yields of cultured dendritic cells. *J Immunother.* 2002;25:278-88.

Martin TJ, Ng KW. Mechanisms by which cells of the osteoblast lineage control osteoclast formation and activity. *J Cell Biochem.* 1994;56:357-66.

Marzio R, Mauel J, Betz-Corradin S. CD69 and regulation of the immune function. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 1999;21:565-82.

Masuda R, Sakiyama H, Nonaka T et al Establishment and characterization of tartrate-resistant acid phosphatase and alkaline phosphatase double positive cell lines. *Cell Tissue Res* 2001; 304: 351-359.

Matsushita M, Matsuzaki K, Date M, Watanabe T, Shibano K, Nakagawa T, Yanagitani S, Amoh Y, Takemoto H, Ogata N, Yamamoto C, et al. Down-regulation of TGF-beta receptors in human colorectal cancer: implications for cancer development. *Br J Cancer.* 1999;80:194-205.

McLellan AD, Kapp M, Eggert A, Linden C, Bommhardt U, Brocker EB, Kammerer U, Kampgen E. Anatomic location and T-cell stimulatory functions of mouse dendritic cell subsets defined by CD4 and CD8 expression. *Blood.* 2002;99:2084-93.

McMahon C, Will A, Hu P, Shah GN, Sly WS, Smith OP. Bone marrow transplantation corrects osteopetrosis in the carbonic anhydrase II deficiency syndrome. *Blood.* 2001;97:1947-50.

Metlay JP, Witmer-Pack MD, Agger R, Crowley MT, Lawless D, Steinman RM. The distinct leukocyte integrins of mouse spleen dendritic cells as identified with new hamster monoclonal antibodies. *J Exp Med.* 1990;171:1753-71.

Michigami T, Ihara-Watanabe M, Yamazaki M, Ozono K. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) is a key molecule of osteoclast formation for bone metastasis in a newly developed model of human neuroblastoma. *Cancer Res.* 2001;61:1637-44.

Miyamoto N, Higuchi Y, Mori K et al Human osteosarcoma-derived cell lines produce soluble factor(s) that induces differentiation of blood monocytes to osteoclast-like cells. *Int Immunopharmacol* 2002; 2: 25-38.

Mizuno A, Murakami A, Nakagawa N, Yasuda H, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K. Structure of the mouse osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) gene and its expression in embryogenesis. *Gene.* 1998;215:339-43.

Modrowski D, Basle M, Lomri A, Marie PJ. Syndecan-2 is involved in the mitogenic activity and signaling of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in osteoblasts. *J Biol Chem*. 2000;275:9178-85.

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 (sous presse)

Moran CS, McCann M, Karan M, Norman P, Ketheesan N, Golledge J. Association of osteoprotegerin with human abdominal aortic aneurysm progression. *Circulation*. 2005;111:3119-25.

Morel PA, Feili-Hariri M, Coates PT, Thomson AW. Dendritic cells, T cell tolerance and therapy of adverse immune reactions. *Clin Exp Immunol*. 2003;133:1-10.

Motyckova G, Weilbaeher 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

Mundy GR, Boyce B, Hughes D, Wright K, Bonewald L, Dallas S, Harris S, Ghosh-Choudhury N, Chen D, Dunstan C, et al. The effects of cytokines and growth factors on osteoblastic cells. *Bone*. 1995;17:71S-75S.

Murray EJ, Murray SS, Tram KK, Lee DB. PTH and PTH-rP elicit dissimilar retractile responses in murine MC3T3-E1 osteoblasts. *Exp Cell Res*. 1994;215:241-8.

Nagamori M, Kawaguchi S, Murakami M, Wada T, Nagoya S, Yamashita T, Inobe M, Uede T. Intrinsic and extrinsic manipulation of B7/CTLA-4 interaction for induction of anti-tumor immunity against osteosarcoma cells. *Anticancer Res*. 2002;22:3223-7.

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.

Narita T, Kawakami-Kimura N, Sato M et al Alteration of integrins by heparin-binding EGF-like growth factor in human breast cancer cells. *Oncology* 1996;53:374-381.

Naumann U, Wick W, Beschorner R, Meyermann R, Weller M. Expression and functional activity of osteoprotegerin in human malignant gliomas. *Acta Neuropathol*. 2004;107:17-22.

Nozaki K, Kadosawa T, Nishimura R, Mochizuki M, Takahashi K, Sasaki N. 1,25-Dihydroxyvitamin D3, recombinant human transforming growth factor-beta 1, and recombinant human bone morphogenetic protein-2 induce in vitro differentiation of canine osteosarcoma cells. *J Vet Med Sci*. 1999;61:649-56.

Nyambo R, Cross N, Lippitt J, Holen I, Bryden G, Hamdy FC, Eaton CL. Human bone marrow stromal cells protect prostate cancer cells from TRAIL-induced apoptosis. *J Bone Miner Res.* 2004;19:1712-21.

Odgren PR, Kim N, van Wesenbeeck L, MacKay C, Mason-Savas A, Safadi FF, Popoff SN, Lengner C, van-Hul W, Choi Y, Marks SC Jr. Evidence that the rat osteopetrotic mutation toothless (tl) is not in the TNFSF11 (TRANCE, RANKL, ODF, OPGL) gene. *Int J Dev Biol.* 2001;45:853-9.

O'Gradaigh D, Compston JE. T-cell involvement in osteoclast biology: implications for rheumatoid bone erosion. *Rheumatology (Oxford).* 2004;43:122-30.

O'Hara RJ, Greenman J, MacDonald AW, Gaskell KM, Topping KP, Duthie GS, Kerin MJ, Lee PW, Monson JR. Advanced colorectal cancer is associated with impaired interleukin 12 and enhanced interleukin 10 production. *Clin Cancer Res.* 1998;4:1943-8.

Olstad OK, Gautvik VT, Reppe S et al Molecular heterogeneity in human osteosarcoma demonstrated by enriched mRNAs isolated by directional tag PCR subtraction cloning. *Anticancer Res* 2003; 23: 2201-2216.

Otsuka E, Notoya M, Hagiwara H. Treatment of myoblastic C2C12 cells with BMP-2 stimulates vitamin D-induced formation of osteoclasts. *Calcif Tissue Int.* 2003;73:72-7.

Oyajobi BO, Mundy GR. Receptor activator of NF-kappaB ligand, macrophage inflammatory protein-1alpha, and the proteasome: novel therapeutic targets in myeloma. *Cancer.* 2003;97:813-7.

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

Pang M, Martinez AF, Jacobs J, Balkan W, Troen BR. RANK ligand and interferon gamma differentially regulate cathepsin gene expression in pre-osteoclastic cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;328:756-63.

Peyron J, Stanescu V. Cartilage articulaire normal de l'adulte. Anatomie, physiologie, métabolisme, vieillissement. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale* 14-003-A-10 (1994)

Pitard B, Bello-Roufai M, Lambert O, Richard P, Desigaux L, Fernandes S, Lanctin C, Pollard H, Zeghal M, Rescan PY, Escande D. Negatively charged self-assembling DNA/poloxamine nanospheres for in vivo gene transfer. *Nucleic Acids Res.* 2004;32:e159.

Pitard B, Pollard H, Agbulut O, Lambert O, Vilquin JT, Cherel Y, Abadie J, Samuel JL, Rigaud JL, Menoret S, Anegon I, Escande D. A nonionic amphiphile agent promotes gene delivery in vivo to skeletal and cardiac muscles. *Hum Gene Ther.* 2002;13:1767-75.

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.

Rifas L, Arackal S, Weitzmann MN. Inflammatory T cells rapidly induce differentiation of human bone marrow stromal cells into mature osteoblasts. *J Cell Biochem.* 2003; 88: 650-659.

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;134:213-221

Rivollier A, Mazzorana M, Tebib J, Piperno M, Aitsiselmi T, Rabourdin-Combe C, Jurdic P, Servet-Delprat C. Immature dendritic cell transdifferentiation into osteoclasts: a novel pathway sustained by the rheumatoid arthritis microenvironment. *Blood.* 2004;104:4029-37.

Roodman GD. Advances in bone biology: the osteoclast. *Endocr Rev* 1996;17:308-332.

Rosenberg SA, Yang JC, Schwartzentruber DJ, Hwu P, Marincola FM, Topalian SL, Restifo NP, Dudley ME, Schwarz SL, Spiess PJ, Wunderlich JR, Parkhurst MR, Kawakami Y, Seipp CA, Einhorn JH, White DE. Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat Med.* 1998;4:321-7.

Rosenberg SA, Yang JC, Schwartzentruber DJ, Hwu P, Marincola FM, Topalian SL, Restifo NP, Sznol M, Schwarz SL, Spiess PJ, et al. 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.

Roux S, Meignin V, Quillard J, Meduri G, Guiochon-Mantel A, Ferman J, Milgrom E, Mariette X. RANK (receptor activator of nuclear factor-kappaB) and RANKL expression in multiple myeloma. *Br J Haematol.* 2002;117:86-92.

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

Saha A, Chatterjee SK, Foon KA, Primus FJ, Bhattacharya-Chatterjee M. Murine dendritic cells pulsed with an anti-idiotypic antibody induce antigen-specific protective antitumor immunity. *Cancer Res.* 2003;63:2844-54.

Scheven BA, Visser JW, Nijweide PJ. In vitro osteoclast generation from different bone marrow fractions, including a highly enriched haematopoietic stem cell population. *Nature.* 1986;321:79-81.

Shalhoub V, Faust J, Boyle WJ, Dunstan CR, Kelley M, Kaufman S, Scully S, Van G, Lacey DL. Osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand effects on osteoclast formation from human peripheral blood mononuclear cell precursors. *J Cell Biochem* 1999;72:251-61

Shi J, Ikeda K, Fujii N, Kondo E, Shinagawa K, Ishimaru F, Kaneda K, Tanimoto M, Li X, Pu Q. Activated human umbilical cord blood dendritic cells kill tumor cells without damaging normal hematological progenitor cells. *Cancer Sci.* 2005;96:127-33.

Shindo K, Kawashima N, Sakamoto K, Yamaguchi A, Umezawa A, Takagi M, Katsube K, Suda H. Osteogenic differentiation of the mesenchymal progenitor cells, Kusa is suppressed by Notch signaling. *Exp Cell Res*. 2003;290:370-80.

Shiratori H, Koshino T, Uesugi M, Nitto H, Saito T. Acceleration of lung metastasis by up-regulation of CD44 expression in osteosarcoma-derived cell transplanted mice. *Cancer Lett*. 2001;170:177-82.

Si AI, Huang L, Xu J, Kumta SM, Wood D, Zheng MH. Expression and localization of extracellular matrix metalloproteinase inducer in giant cell tumor of bone. *J Cell Biochem*. 2003;89:1154-63.

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997;89:309-19

Skoumal M, Haberhauer G, Kolarz G, Hawa G, Woloszczuk W, Klingler A. Serum cathepsin K levels of patients with longstanding rheumatoid arthritis: correlation with radiological destruction. *Arthritis Res Ther*. 2005;7:R65-70.

Soda H, Raymond E, Sharma S et al Antiproliferative effects of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on human tumor colony-forming units. *Anticancer Drugs* 1998; 9: 327-331.

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

Spisek R, Bretaudeau L, Barbieux I, Meflah K, Gregoire M. Standardized generation of fully mature p70 IL-12 secreting monocyte-derived dendritic cells for clinical use. *Cancer Immunol Immunother*. 2001;50:417-27.

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.

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

Sung SY, Chung LW. Prostate tumor-stroma interaction: molecular mechanisms and opportunities for therapeutic targeting. *Differentiation*. 2002;70:506-21.

Suss G, Shortman K. A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis. *J Exp Med*. 1996 ;183:1789-96.

Swaminathan R. Biochemical markers of bone turnover. *Clin Chim Acta*. 2001;313:95-105.
Takeshita S, Kaji K, Kudo A. Identification and characterization of the new osteoclast progenitor with macrophage phenotypes being able to differentiate into mature osteoclasts. *J Bone Miner Res*. 2000;15:1477-88.

Tasaki K, Gunji Y, Matsubara H, Takenaga K, Suzuki T, Asano T, Ochiai T, Isono K, Kouzu T, Sakiyama S, Tagawa M. Induction of T cell dependent acquired immunity in syngeneic mice by the combined expression of interleukin-4 and granulocyte macrophage-colony stimulating factor gene in murine colon carcinoma cells. *Anticancer Res.* 1998;18:1453-6.

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.* 2004;15:457-75.

Thomas RJ, Guise TA, Yin JJ et al Breast cancer cells interact with osteoblasts to support osteoclast formation. *Endocrinology* 1999;140:4451-4458.

Tometsko M, Armstrong A, Miller RE et al RANK Ligand directly induces osteoclastogenic, angiogenic, chemoattractive and invasive factors on RANK-expressing human cancer cells MDA-MB-231 and PC3. *J Bone Miner Res* 2004; 19: S25.

Trieb K, Kotz R. Proteins expressed in osteosarcoma and serum levels as prognostic factors. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001;33:11-7.

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.

Trinite B, Voisine C, Yagita H, Josien R. A subset of cytolytic dendritic cells in rat. *J Immunol.* 2000;165:4202-8.

Tsuchiya H, Kanazawa Y, Abdel-Wanis ME et al Effect of timing of pulmonary metastases identification on prognosis of patients with osteosarcoma: the Japanese Musculoskeletal Oncology Group study. *J Clin Oncol* 2002; 20:3470-3477.

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.

Tsuji H, Kawaguchi S, Wada T, Nagoya S, Inobe M, Yagita H, Okumura K, Yamashita T, Uede T. Concurrent induction of T-cell activation and apoptosis of osteosarcoma cells by adenovirus-mediated B7-1/Fas chimeric gene transfer. *Cancer Gene Ther.* 2003;10:717-25.

Tsuji H, Kawaguchi S, Wada T, Nagoya S, Inobe M, Yamashita T, Ishii S, Uede T. Adenovirus-mediated in vivo B7-1 gene transfer induces anti-tumor immunity against pre-established primary tumor and pulmonary metastasis of rat osteosarcoma. *Cancer Gene Ther.* 2002;9:747-55.

Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, Tanaka H, Sasaki T, Nishihara T, Koga T, Martin TJ, Suda T. Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87:7260-4.

Udelsman R. Primary hyperparathyroidism. *Curr Treat Options Oncol.* 2001;2:365-72.

Uesugi M, Koshino T, Mitsugi N, Hiruma T. Predictive value of serum immunosuppressive acidic protein for lung metastasis after amputation of murine osteosarcoma of the lower limb. *Cancer Lett.* 2000;155:169-72.

Voisine C, Hubert FX, Trinite B, Heslan M, Josien R. Two phenotypically distinct subsets of spleen dendritic cells in rats exhibit different cytokine production and T cell stimulatory activity. *J Immunol.* 2002;169:2284-91.

Vremec D, Pooley J, Hochrein H, Wu L, Shortman K. CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *J Immunol.* 2000;164:2978-86.

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.

Weiss SW, Goldblum JR. *Enzinger and Weiss' soft tissue tumors* (4th edition). St Louis, Mosby, 2001.

Wiethe C, Dittmar K, Doan T, Lindenmaier W, Tindle R. Enhanced effector and memory CTL responses generated by incorporation of receptor activator of NF-kappa B (RANK)/RANK ligand costimulatory molecules into dendritic cell immunogens expressing a human tumor-specific antigen. *J Immunol.* 2003;171:4121-30.

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

Wong BR, 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.* 1997;186:2075-80.

Wongkajornsilp A, Sangsuriyong S, Hongeng S, Waikakul S, Asavamongkolkul A, Huabprasert S. Effective osteosarcoma cytotoxicity using cytokine-induced killer cells pre-inoculated with tumor RNA-pulsed dendritic cells. *J Orthop Res.* 2005 (sous presse)

Woo KM, Choi Y, Ko SH, Ko JS, Oh KO, Kim KK. Osteoprotegerin is present on the membrane of osteoclasts isolated from mouse long bones. *Exp Mol Med.* 2002;34:347-52.

Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:3597-602.

Yoshikawa H, Ohishi M, Kohriki S, Yoshiura M, Ohsaki Y. Establishment and characterisation of an osteoblastic clonal cell line from human mandibular osteosarcoma (HMOS-1). *Oral Oncol* 1997; 33: 163-168.

Yun TJ, Chaudhary PM, Shu GL, Frazer JK, Ewings MK and Schwartz SM et al., A TNF receptor family member, is expressed in lymphoid cells and is up-regulated by ligating CD40, J Immunol 1998;161:6113–21

Zhang J, Dai J, Qi Y, Lin DL, Smith P, Strayhorn C, Mizokami A, Fu Z, Westman J, Keller ET. Osteoprotegerin inhibits prostate cancer-induced osteoclastogenesis and prevents prostate tumor growth in the bone. J Clin Invest. 2001;107:1235-44.

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.

Zhou H, Kartsogiannis V, Hu YS, Elliott J, Quinn JM, McKinstry WJ, Gillespie MT, Ng KW. A novel osteoblast-derived C-type lectin that inhibits osteoclast formation. J Biol Chem. 2001;276:14916-23.

Nouvelles approches thérapeutiques des Ostéosarcomes.

Ostéosarcome, ostéoclaste, OPG, RANK, RANKL, cellules dendritiques.

L'ostéosarcome est la plus fréquente des tumeurs osseuses primitives non hématologiques affectant une population relativement jeune, dont les thérapies conventionnelles montrent désormais leurs limites, et nécessite par conséquent de développer de nouveaux traitements. Récemment découverte, la triade moléculaire Receptor Activator of NFkB / RANK Ligand / Ostéoprotégérine (RANK / RANKL / OPG) représente un pivot dans la régulation de la balance apposition/ résorption osseuse. Cet équilibre est affecté lors développement de l'ostéosarcome. L'objectif de cette thèse a été de développer de nouvelles approches thérapeutiques dans des modèles expérimentaux d'ostéosarcomes basées sur une meilleure connaissance de la biologie osseuse, notamment le rôle physiologique et le potentiel thérapeutique de triade. Par ailleurs, en raison de l'interaction des systèmes osseux et immunitaire, l'élaboration de protocoles d'immunothérapie active par l'utilisation de cellules dendritiques a été entreprise.

New opportunities in osteosarcoma therapeutic design.

Osteosarcoma, osteoclast, OPG, RANK, RANKL, dendritic cells.

Osteosarcoma is the most frequent primary bone tumour that develops mainly in the young, the median age of diagnosis being 18 years. Despite recent improvements, current strategy for treatment of high-grade osteosarcoma lead to pulmonary metastasis apparition and new therapeutic approaches need to be developed. Recently discovered, the molecular triad Receptor Activator of NFkB / RANK Ligand / Ostéoprotégérine (RANK / RANKL / OPG) is a pivotal key in bone formation/degradation balance regulation. Osteosarcoma affects this regulation. The aim of this thesis was to develop new therapeutic design based upon better knowledge in bone biology, most notably physiologic role and therapeutic potential of OPG/RANK/RANKL using animal models. Moreover, due to bone and immune systems interaction, we started active immunotherapy's protocols using dendritic cells.

WITTRANT Yann

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

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