UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE ET PHARMACIE

SYSTEMES VASCULAIRE ET OSSEUX : INTERACTIONS MOLECULAIRES

THESE DE DOCTORAT

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

présentée et soutenue publiquement le 27 octobre 2009 par

Marc BAUD'HUIN

JURY

Rapporteurs

Mme BLEICHER Françoise	Professeur des universités, Faculté d'Odontologie de Lyon
Mme MAZZORANA Marlène	Chargée de recherche, UMR 5242, Lyon
Examinateurs	
Mme FISCHER Anne-Marie	Professeur des universités - Praticien Hospitalier, Hôpital Georges Pompidou, Paris
M FOUASSIER Marc	Praticien Hospitalier, CHU Hôtel-Dieu, Nantes
Mme JEGO Laurence	Ingénieur de recherche, CHU Hôtel-Dieu, Nantes
Directeur de thèse	
M HEYMANN Dominique	Professeur des universités - Praticien Hospitalier, Faculté de Médecine, Nantes.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	
INTRODUCTION	
I. Structure de l'os	
1. Organisation générale	
A. Os compact	
B. Os spongieux (ou trabéculaire)	13
2. Organisation microscopique	13
A. La matrice extracellulaire	13
B. Les ostéoblastes	15
C. Les ostéocytes	
D. Les ostéoclastes	19
3. La croissance osseuse	25
A. Ossification primaire	
1. Ossification membranaire	
2. Ossification périostique 3. Ossification endochondrale	
B. Ossification secondaire	
4. Le remodelage osseux	
II. Les principaux régulateurs de la résorption osseuse	
1. La triade OPG / RANK / RANKL	
A. RANKL	
B. RANK	
C. Ostéoprotégérine (OPG)	
2. Les autres protagonistes impliqués dans le remodelage osseux	
A. Les facteurs hormonaux	
1. La parathormone ou PTH	
2. Le 1,25-dihydroxycholécalciférol ou 1,25 DHCC	
3. La calcitonine	
B. Les principales cytokines contrôlant le remodelage osseux	40
1 M-CSF et II - 34	40
2. TNFα	
3. TRAIL	
4. IL-1	
5. Autres interteuxines influençuni i osteoclasiogenese	

6. Effets de l'interleukine-6 sur l'ostéoclastogenèse	
a. L'interleukine-6, cytokine de l'inflammation	
UII Système vasculaire et tissu osseux	
1 Rôle de la vascularisation dans le développement osseux	лования и лаконски и л Дага и лаконски и лаконс
2 Internations de l'andothálium at de l'as	۲۲ ۸۹
2 La triada ODC / DANK / DANKL dans la biologia vasculaira	40 50
S. La thate OF O / KAINK / KAINKL that's la biologie vasculaite	
DADATE LA COMPLEXE EVILLE CAPELO DE MON MALA EDDAND ET DE	
PARTIE I : COMPLEXE F VIII/FACTEUR DE VON WILLEBRAND ET BIO OSSEUSE	JLOGIE
I. Introduction	
1. Rôles dans l'hémostase	
A. L'hémostase primaire	
B. L'hémostase secondaire	
2. Biosynthèse des FVIII et FvW	
3. Importance de la formation du complexe FVIII/FvW	
4. Pathologies hémorragiques et phénotype osseux	
II. Article 1	
III. Discussion	
PARTIE II: GLYCOSAMINOGLYCANES ET OSTEOCLASTOGENESE	
I. Introduction	
1. L'héparine : découverte, structure, fonction et effets sur l'os	
2. Les autres membres de la famille des glycosaminoglycanes	
3. Les protéoglycanes et leurs effets dans la biologie osseuse	
II. Article 2	
III. Discussion	
IV. Travaux complémentaires	
1. Introduction	
2. Résultats	
3. Discussion	
PERSPECTIVES ET CONCLUSIONS GENERALES	
ANNEXES	
Bibliographie	
Liste des publications	
Articles et revue cités dans le manuscrit	

Ce travail a été réalisé dans le :

Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs

Osseuses Primitives - EA 3822 - INSERM UMRS 957



Je tiens à remercier :

Monsieur Dominique Heymann, pour avoir dirigé ce travail durant ces quatre années. Merci pour ses qualités exceptionnelles : sa confiance, sa patience, son dynamisme... Merci de m'avoir permis de réaliser ma thèse dans de si bonnes conditions.

Madame Laurence Jego, pour m'avoir encadré et coaché. Tu m'as formé, conseillé et soutenu pendant ces quatre ans. Merci pour ta disponibilité, ton aide précieuse et ta bonne humeur quotidienne.

Mesdames Françoise Bleicher et Marlène Mazzorona qui me font un grand honneur en acceptant d'être rapporteurs de ce travail.

Madame Anne-Marie Fischer pour avoir accepté de faire partie du jury de ma thèse.

Monsieur Marc Fouassier pour avoir accepté de faire partie du jury de ma thèse et pour son enrichissante collaboration.

Tous les soutiens financiers, et plus particulièrement UNIVALOIRE, qui m'ont permis de réaliser ce travail.

Messieurs Mike Maillasson et Philippe Hulin, pour leur aide et leurs conseils techniques.

Tous les membres du laboratoire pour leur aide, leur soutien et la bonne ambiance quotidienne : Françoise, Yannick, Marc, Frédéric, Valérie, Séverine, Céline, Martine, Anne, Stéphane, François, Marie-Françoise, Marie-Hélène, Nathalie, Céline, Guillaume, Jean-Marie, Loïc, Pierre, Benoît, Steven, Sandra, Steeve, Julie ...merci pour les bons moments !

Ben pour ces deux années de complicité et nos nombreuses discussions.

François « La débrouille », pour m'avoir fait découvrir toutes les bonnes combines.

Béné, pour avoir partagé ces quatre années : une nouvelle vie commence...

Gatien dit « Gatineau », le plus sportif et le plus beau gosse des thésards. Merci pour ton soutien et ton coaching sportif.

Julie pour les délires du vendredi après-midi.

Carmen pour sa bonne humeur méditerranéenne.

Steven, Pierre pour les soirées pizza-foot.

Régis, pour les délicieux gâteaux, merci pour les kilos.

Gaëlle, pour sa bonne humeur.

Emmanuelle, pour m'avoir fait l'honneur d'être membre de son jury de thèse.

Mes parents, ma famille et mes amis pour leur soutien sans faille...

Clémentine, pour ton écoute, ta patience et ton amour. Tu as toujours été à mes côtés dans les bons comme dans les mauvais moments.

LISTE DES ABREVIATIONS

ARN : acide ribonucléique AT III : anti-thrombine **BMP** : bone morphogenetic protein c-fms : macrophage colony-stimulating factor receptor **CFU-GM** : colony forming unit-granulocyte macrophage CLC : cardiotrophin-like cytokine **CNTF** : ciliary neurotrophic factor Coll I : collagène de type I CS : chondroïtine sulfate CT-1: cardiotrophine-1 **CTR** : calcitonin receptor **DS** : dermatane sulfate ERK1/2 : extra-cellular regulated kinase FAK : focal adhesion kinase FGF : fibroblast growth factor FVIII : facteur 8 de la coagulation FvW : facteur de von Willebrand GAG : glycosaminoglycane gp130 : glycoprotéine 130 HS : héparane sulfate HSC : hematopoietic stem cells HUVEC : human umbilical vein endothelial cell ICAM-1: intercellular adhesion molecule-1 **IFN** γ : interferon γ IkB : inhibitor of NF-kappaB kinase **IL-**: interleukine JAK : janus kinase JNK : c-jun N-terminal kinase LIF : leukemia inhibitory factor MAPK : mitogen activated protein kinase M-CSF : macrophage-colony stimulating factor **MMPs** : matrix metalloproteinases MSC : mesenchymal stem cells OC : ostéocalcine **OP** : ostéopontine **OPG** : ostéoprotégérine **OSM** : oncostatine M **PAL** : phosphatase alcaline

PCR : polymerase chain reaction **PG** : protéoglycane PGE2 : prostaglandine E2 PI3K : phosphatidylinositol-3 kinase **PPARγ2** : proliferator activated receptor gamma 2 PTH : hormone parathyroïdienne **PYK2** : proline rich tyrosine kinase 2 RANK : receptor activator of nuclear factor kB RANKL : RANK ligand **RGD** : peptide arginine, glycine, acide aspartique SLRP : small leucine rich proteoglycan STAT : signal transducer and activator of transcription TCG : tumeur à cellules géantes **TGF** β : transforming growth factor β TLR : toll-like receptor **TNF** : tumor necrosis factor **TRAIL** : TNF-related apoptosis-inducing ligand **TRAP** : tartrate resistant acidic protein VCAM-1: vascular cell adhesion molecule-**VEGF** : vascular endothelial growth factor

INTRODUCTION

Dès l'apparition des animaux pluricellulaires, le squelette fut nécessaire. Par son rôle de soutien, il permet de lutter efficacement contre la gravité et de maintenir la cohérence de l'organisme. Ce squelette est généralement constitué de parties dures mais peut aussi être de composition liquidienne comme chez les Némathelminthes. Chez les Spongiaires, le squelette est diffus et se compose de spicules (calcaires ou siliceuses) qui participent à la bonne tenue de l'animal. L'exosquelette des Arthropodes, composé principalement de chitine et de carbonate de calcium, a permis à cet embranchement de coloniser le milieu aérien en s'affranchissant de la gravité et de la déshydratation. Chez les Vertébrés, le squelette devient interne ; d'abord cartilagineux il va se minéraliser par la suite pour donner l'os.

D'un point de vue biologique, il est très étonnant de constater que l'un des seuls vestiges de nos ancêtres est leur squelette, capable de résister à l'altération du milieu extérieur. Pourtant, dans l'organisme, l'os est le siège d'un perpétuel remaniement conduisant au remplacement d'environ 10% du squelette par an chez l'adulte. Les deux principales cellules du tissu osseux sont l'ostéoclaste, capable de résorber l'os et l'ostéoblaste, responsable de sa formation. Il réside un parfait équilibre entre ces deux processus afin de maintenir la masse osseuse. Le dérèglement de cette balance mène à l'apparition de pathologies ostéo-articulaires qui sont ostéocondensantes ou ostéolytiques. La connaissance des mécanismes fondamentaux impliqués dans la biologie de l'os et notamment celle de l'ostéoclaste permet de mieux comprendre la physiopathologie de ces maladies, et surtout peut conduire à la découverte de nouveaux traitements.

I. Structure de l'os

Le squelette humain est composé de plus ou moins 206 os, sur lesquels viennent s'insérer des ligaments et des tendons. L'os le plus long du corps humain est le fémur (50 cm pour un homme de 1,80 m), et le plus petit os, l'étrier (2,6 à 3,4 mm), se situe dans l'oreille interne.

Le tissu osseux qui compose ce squelette est un tissu conjonctif spécialisé formé, d'une fraction organique et d'une fraction minérale, qui lui confèrent ses propriétés de rigidité et d'élasticité. Il s'agit d'un tissu de soutien servant de point d'ancrage au système musculaire squelettique. Il remplit également des fonctions de protection pour un certain nombre d'organes vitaux en formant de grandes cavités : les os du crâne protègent les hémisphères cérébraux et le cervelet, le rachis renferme la moelle épinière et la cage thoracique préserve le cœur et les poumons. Enfin, le tissu osseux possède un rôle métabolique important puisqu'il constitue la principale réserve d'ions minéraux de l'organisme (calcium, phosphate, magnésium, ...)

1. Organisation générale

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

- <u>les os longs</u>, comme l'humérus, le fémur ou le tibia, servent classiquement de modèle pour décrire la structure des os.
- <u>les os courts</u>, comme les vertèbres et les phalanges, sont composés d'un noyau d'os spongieux entouré d'une corticale d'os compact (comme les os longs).

• *les os plats*, comme le sternum et les os pariétaux, ont une dimension nettement plus courte que les deux autres. Ils sont composés de deux couches d'os compact, les tables externe et interne, enfermant une couche d'os spongieux.

Un os long typique chez l'adulte est constitué d'une partie centrale cylindrique appelée diaphyse, et de deux extrémités élargies et arrondies appelées épiphyses, couvertes de cartilage articulaire. Des régions coniques, appelées métaphyses, connectent la diaphyse à chaque épiphyse. La forme particulière des os longs et leur organisation macroscopique leur confèrent la capacité à résister aux forces de tension, de traction et de cisaillement. Histologiquement, on distingue l'os compact (ou cortical) et l'os spongieux (ou trabéculaire), l'ensemble étant entouré d'une "enveloppe externe", le périoste, sauf au niveau du cartilage articulaire et aux endroits d'insertion des tendons et des ligaments. Ces mêmes ligaments sont constitués d'un tissu conjonctif composé de deux couches : l'une, interne, à capacité ostéogène et l'autre, externe vascularisée assurant le lien avec les tissus voisins.

L'endoste constitue la face interne de l'os et sépare l'os cortical (ou trabéculaire) de la moelle osseuse. Il a un rôle dans l'ostéoformation et dans le remaniement osseux (figure 1).

La croissance en longueur des os longs est possible grâce à la persistance d'une plaque cartilagineuse appelée "cartilage de conjugaison" entre les épiphyses et la diaphyse. Cette plaque épiphysaire de cartilage contient de nombreux chondrocytes en multiplication tandis que les points d'ossification diaphysaires contiennent une matrice cartilagineuse calcifiée par modification des chondrocytes. Vers l'âge de 18 ans, la plaque de croissance est remplacée par de l'os spongieux, ce qui provoque la fusion de l'épiphyse et de la métaphyse. La disparition du cartilage de croissance suite à la fusion de deux masses est appelée fermeture du cartilage.



Figure 1 : Organisation structurale d'un os long.

A. Os compact

Il s'agit d'os mature, dense, contenant moins de 10% de tissu mou, présent dans la couche externe de tout os (figure 2). Son architecture rectiligne, est faite d'un grand nombre d'ostéons contigus. L'ostéon est l'élément structural unitaire de l'os compact. Il s'agit d'un cylindre de 200 à 250 micromètres de largeur, parallèle à l'axe longitudinal de la corticale de l'os. Il consiste en une apposition de lamelles concentriques (de 5 à 15) de fibres de collagène autour d'un canal. Ce canal, appelé canal de Havers, large de 40 à 50 micromètres permet le passage de vaisseaux, de fibres nerveuses amyéliniques mais aussi la connexion intercellulaire. Largement ouvert dans les ostéons primaires, le canal de Havers est délimité par les cellules ostéoprogénitrices et les ostéoblastes. Ces cellules prendront le nom d'ostéocytes lors de la maturation des ostéons, conduisant au comblement du canal. Enfin, les ostéons sont reliés entre eux par des canaux transverses dits de Volkmann assurant l'homéostasie phosphocalcique mais aussi la communication entre le périoste et la moelle osseuse.

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



<u>Figure 2</u> : Représentation schématique d'un os de type haversien. (d'après Marieb, 1998). A : coloration d'ostéocytes figés dans les lamelles concentriques (ostéoplastes) de l'unité structurale de l'os compact : l'ostéon. B : réseau trabéculaire limité à l'endoste par les

deux corticales (composées d'os compact) recouvertes de périoste. Coloration au trichrome de Goldner. C : canal de Havers et canal de Volkmann vue en coupe longitudinale (Laboratoire de Physiopathologie de la résorption osseuse).

B. Os spongieux (ou trabéculaire)

Il est constitué de trabécules plates ou rondes qui s'entremêlent dans la moelle osseuse, qui peut être jaune (tissu adipeux) ou rouge (hématopoïétique), et qui représente 75 % du volume total de l'os spongieux. De par sa microstructure (grande surface de contact), l'os spongieux a des échanges particuliers avec la moelle osseuse (figure 3). La moelle osseuse, contenue dans l'os spongieux, est à l'origine des progéniteurs des différentes lignées sanguines (hématies, plaquettes, lymphocytes, macrophages, ostéoclastes, ...).



Figure 3 : Jonction entre os spongieux et os cortical (grossissement ×4) (Gotzos et al., 2007).

2. Organisation microscopique

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

A. La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire peut être subdivisée en deux phases, organique et minérale. Sa teneur en eau, environ 9%, est très variable en fonction de l'âge et du degré de minéralisation.

La phase organique représente 30% de la masse osseuse sèche. Elle est principalement composée de fibres de collagène de type I, qui présentent une structure hélicoïdale issue de l'assemblage de deux chaînes α 1 et d'une chaîne α 2. L'élastine et la fibronectine forment avec le collagène de type I (90% de la phase organique) la substance fibrillaire. Cette dernière est entourée par la substance interfibrillaire (10 % de la phase organique), également appelée substance non-collagénique. Elle comprend des glycosaminoglycanes (GAGs), des protéoglycanes, des glycoprotéines et des lipides en petite quantité. L'ostéocalcine, la plus abondante des protéines non-collagéniques (10 à 20%), est spécifique de la matrice extracellulaire du tissu osseux. Cette protéine contenant des résidus d'acide glutamique carboxylé, jouerait un rôle dans l'attraction des ostéoclastes dans les foyers de résorption et dans le processus de minéralisation (Swaminathan, 2001 ; Glowacki et *al.*, 1991).

Plusieurs protéines non-collagéniques telles que l'ostéopontine et la sialoprotéine renferment une séquence arginine-glycine-acide aspartique (RGD). Cette séquence RGD caractérise les protéines d'adhérence cellulaire et est reconnue par certaines protéines membranaires appelées intégrines (Ruoslahti, 1991). Les intégrines présentes à la surface des ostéoclastes ($\alpha_V\beta_3$) et des ostéoblastes permettent leur attachement à la matrice extracellulaire.

Des cytokines et des facteurs de croissance [le TGF β (transforming growth factor- β), les interleukines, le TNF α (Tumor Necrosis Factor), les BMPs (Bone Morphognic Protein)] sont également présents au sein de la fraction organique. Ces substances, bien qu'en faible quantité, participent à l'activation et à la différenciation des cellules de la matrice osseuse assurant l'équilibre entre formation et dégradation osseuses.

Si la phase organique confère une certaine élasticité au tissu osseux, la rigidité et la résistance mécanique sont assurées par la phase minérale. Les sels minéraux les plus abondants sont le calcium (27 %) et le phosphore (12 %) présents sous forme de cristaux d'hydroxyapatite ($Ca_4(PO_4)_6(OH)_2$). Ces cristaux ont une forme hexagonale, aplatie et sont disposés dans les espaces interfibrillaires. Leur nombre et leur taille s'accroîssent lentement au cours du processus de minéralisation secondaire. La phase minérale de la matrice extracellulaire constitue environ 99 % du calcium de l'organisme, 85 % du phosphore et entre 40 et 60 % du sodium et du magnésium de l'organisme.

B. Les ostéoblastes

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

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



Figure 4 : Ostéoblaste observé par microcopie électronique à transmission (Bosshardt, 2005).

Les cellules souches mésenchymateuses sont à l'origine des ostéoblastes. Elles sont présentes principalement dans le stroma médullaire, mais on peut les retrouver au niveau du périoste et de l'endoste. Ces cellules souches mésenchymateuses pluripotentes, en plus de pouvoir se différencier en ostéoblastes, ont la capacité de générer des cellules adipeuses, des chondroblastes et des myoblastes (Owen, 1988). La différenciation vers l'une ou l'autre des voies est sous le contrôle de l'expression de facteurs de transcription spécifiques. Les facteurs Runx2 (Cbfa1) et Osterix sont indispensables à la différenciation en ostéoblastes (Nakashima et *al.*, 2002). La délétion génique du facteur Runx2 chez la souris entraîne l'absence de tissu

osseux : les maquettes des os sont présentes et de forme normale mais elles ne sont constituées que de cartilage (Komori et *al.*, 1997). La différenciation dans la voie chondrocytaire requiert l'expression des facteurs de la famille Sox dans un premier temps, puis du facteur Runx2 dans la phase tardive de la différenciation. L'expression de PPAR γ 2 (Peroxysome Proliferator Activated Receptor gamma 2) induit la différenciation des cellules souches mésenchymateuses dans la voie adipocytaire (Nishimura et *al.*, 2008), alors que l'expression de MyoD provoque leur différenciation en myoblastes (Davis et *al.*, 1987) (figure 5).



<u>Figure 5</u> : Les ostéoblastes sont issus de la différenciation de cellules souches mésenchymateuses sous l'action de facteurs de transcription (d'après Marie, 2008).

L'expression des facteurs de transcription (Osterix, Runx2, AP-1) de la voie ostéoblastique est sous le contrôle de cytokines et d'hormones telles que les BMPs, le TGF- β , Wnt, hedgehog, les FGFs (fibroblast growth factors), les estrogènes et les androgènes (Marie, 2008). La BMP2 active Smad1/5 et Smad4 qui stimulent l'expression et la fonction de Runx2. Les protéines anaboliques Wnt (Wnt3a et Wnt10), en activant la voie Wnt/ β -Catenin, augmentent également l'expression de Runx2 (Gaur et *al.*, 2005 et Bennett et *al.*, 2005) (figure 6).



<u>Figure 6</u> : Régulation des facteurs de transcription de la voie ostéoblastique (d'après Marie, 2008).

Le cytoplasme des ostéoblastes est riche en réticulum endoplasmique granuleux, en mitochondries et présente un appareil de Golgi très développé, ce qui démontre une activité de synthèse très importante. La fonction essentielle de l'ostéoblaste mature est la formation, le dépôt et la minéralisation de la matrice osseuse organique. L'ostéoblaste synthétise du collagène de type I, qui forme la majorité de la substance organique osseuse. Les molécules de collagène s'assemblent dans le milieu extracellulaire en fibrilles après coupure enzymatique des propeptides C- et N-terminaux. Les protéines non-collagéniques (ostéocalcine, ostéopontine, ostéonectine) les glycosaminoglycanes et les protéoglycanes (décorine, biglycan) constituent avec le collagène le tissu ostéoïde. Le processus de minéralisation de ce tissu ostéoïde intervient 10 jours après le dépôt de la matrice organique. Il dépend d'une part de la présence d'une structure matricielle extracellulaire, et d'autre part d'une concentration adéquate en minéraux. La calcification de la matrice se fait par l'intermédiaire des vésicules matricielles émises par l'ostéoblaste qui contiennent de fortes concentrations de phosphatase alcaline et de minéraux. Les cristaux d'hydroxyapatite se déposent entre les fibres de collagène, ce qui donne à l'os sa résistance à la rupture, en plus de sa résistance à l'étirement.

A l'issue de la période de formation osseuse, la majorité des ostéoblastes va mourir par apoptose ; dans le cas contraire les ostéoblastes sont englobés dans une matrice extracellulaire organique qui se minéralise peu à peu, et deviennent des ostéocytes reliés entre eux et aux ostéoblastes par des jonctions cellulaires de type jonction communicante ou jonction gap assurées par les connexines de type 43 (Civitelli, 2008). D'autres cellules prennent un aspect aplati le long de la nouvelle matrice et sont dites bordantes.

Les cellules bordantes recouvrent la majorité des surfaces osseuses trabéculaires (65%). Ces cellules ont pour origine des ostéoblastes mis au repos, capables de se réactiver si elles sont sollicitées. Les cellules bordantes présentent un cytoplasme réduit pauvre en organites, témoin d'une faible activité synthétique. Leur principale fonction serait d'assurer la communication entre la surface osseuse, l'environnement cellulaire et les ostéocytes.

C. Les ostéocytes

Incapables de proliférer, les ostéocytes proviennent de la différenciation terminale de la lignée ostéoblastique, sous l'action notamment de la Matrix Metalloproteinase de type 2 (MMP-2) et de la Dentin Matrix Protein-1 (Noble, 2008). Très récemment, Brounais et coll. ont montré que l'oncostatine M (OSM), une cytokine de la famille de l'IL-6, était capable d'induire la différenciation terminale de cellules de calvaria en ostéocytes (Brounais et al., 2009). Cellule la plus abondante dans l'os mature (90% des cellules de l'os), l'ostéocyte est entièrement entouré de matrice extracellulaire osseuse calcifiée. Il y réside dans une lacune périostéocytaire (ostéoplaste) (figures 1 et 7). Les ostéocytes possèdent de nombreux et fins prolongements cytoplasmiques reliés entre eux par des jonctions communicantes (Datta et al., 2008). De cette manière, les ostéocytes communiquent entre eux et avec les cellules bordantes qui recouvrent la surface osseuse. Les ostéocytes assurent la transmission des signaux mécano-sensoriels et permettent le maintien de l'équilibre osseux. Les candidats potentiels pour la transduction des signaux mécaniques sont les intégrines βl, certains canaux ioniques et les connexines (Rubin et al., 2006). Les ostéocytes régulent également la formation osseuse par la sécrétion de sclérostine qui est un de leurs marqueurs spécifiques (Poole et al., 2005). La sclérostine est un antagoniste des voies Wnt et contrôle négativement l'activité des ostéoblastes (Noble, 2008). Il semblerait que l'apoptose de ces cellules soit le facteur déclenchant l'ancrage des ostéoclastes à la surface osseuse et par conséquent la mise en place du processus de résorption (Noble et al., 2003).



<u>Figure 7</u>: Les ostéoblastes (Ob) synthétisent l'ostéoïde (Os) durant la phase de formation osseuse. Les ostéoblastes, une fois emmurés dans la matrice osseuse, se différencient en ostéocytes (Ot). Ils possèdent de fins prolongements cytoplasmiques assurant une communication entre eux mais également avec les ostéoblastes (Knothe Tate et *al.*, 2004).

D. Les ostéoclastes

Les ostéoclastes sont les seules cellules de l'organisme capables de résorber l'os. Ils sont capables de dégrader, au niveau de la chambre de résorption, la phase organique par la sécrétion d'enzymes et la phase minérale en diminuant le pH. Ils jouent un rôle critique dans le développement et le maintien du squelette et sont également impliqués dans de nombreuses pathologies osseuses telles que l'ostéoporose ou les ostéolyses tumorales.

Les ostéoclastes, issus de la fusion de plusieurs précurseurs, sont des cellules géantes (10 à 100 μ m de diamètre) multinucléées, contenant le plus souvent de 10 à 20 noyaux (figure 8). Ces cellules sont visibles au fond des lacunes de résorption appelées lacunes de Howship, au contact de la matrice osseuse calcifiée. Une des caractéristiques propres à l'ostéoclaste actif est sa bordure en brosse constituée d'une succession d'expansions et d'invaginations de la membrane cytoplasmique apicale adjacente à la surface osseuse (Suda et *al.*, 1992).

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



<u>Figure 8</u>: A. Ostéoclastes obtenus par différenciation de RAW 264.7 en présence de RANKL (100ng/mL) pendant 5 jours ; marquage immuno-cytologique du récepteur à la calcitonine (grossissement original : ×40). B. Ostéoclastes obtenus par différenciation de monocytes CD14⁺ en présence de RANKL (100ng/mL) et de M-CSF (25ng/mL) pendant 12 jours ; marquage cytologique révélant l'activité TRAP des ostéoclastes (grossissement original : ×40). C. Ostéoclaste résorbant issu d'une tumeur à cellules géantes et cultivé sur une pastille de dentine observé au microscope électronique à transmission (×5000) (Heymann et Rousselle, 2000).

Les principales caractéristiques cytologiques ultrastructurales de l'ostéoclaste sont un grand nombre de lysosomes, de mitochondries, de granules denses et un ou plusieurs appareils de Golgi périnucléaires. Ils expriment également de nombreux récepteurs à la calcitonine (CTR) (inhibiteur de la résorption) ainsi qu'à la vitronectine (rôle dans l'adhérence de l'ostéoclaste à son support) et présentent une importante activité TRAP. (Phosphatase Acide Résistante au Tartrate). Cette enzyme est impliquée dans la dégradation des composants de la matrice osseuse (notamment les phosphoprotéines) lors de leur trancytose de la partie basale à la partie apicale de l'ostéoclaste (Hayman, 2008 ; Vaaraniemi et al., 2004).

Les cellules souches hématopoïétiques sont à l'origine des ostéoclastes (Hattersley et Chambers, 1989 ; Suda et *al.*, 1992). Leur différenciation comporte plusieurs étapes illustrées dans les figures 9 et 10. Les cellules souches hématopoïétiques donnent naissance aux cellules mononucléées circulantes appelées CFU-GM (Colony Forming Unit Granulocyte-Macrophage). Le M-CSF (Macrophage-Colony Stimulating Factor) stimule la prolifération de ces CFU-GM afin de maintenir un pool de cellules mononucléées appartenant à la lignée monocyte / macrophage. Une faible proportion de ces cellules est considérée comme les

précurseurs des ostéoclastes et est caractérisée par l'absence de deux marqueurs ostéoclastiques : TRAP et CTR. Les ostéoclastes peuvent également dériver de cellules engagées dans un autre processus de différenciation. Les cellules dendritiques immatures sont capables de se dédifférencier en ostéoclastes fonctionnels sous l'action de M-CSF et de RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand) (Rivollier et *al.*, 2004 ; Wakkach et *al.*, 2008). Certaines fractions monocytaires (environ 3%) dérivées des PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) sont capables de se différencier en ostéoclastes matures en présence de M-CSF et de RANKL. Parmi ces populations monocytaires, celle exprimant le CD14, un co-récepteur au LPS, se révèle être un bon modèle d'étude de la différenciation ostéoclastique (Massey et Flanagan, 1999 ; Nicholson et *al.*, 2000 ; Sorensen et *al.*, 2007).



<u>Figure 9</u> : Voie de différenciation des ostéoclastes (d'après Yavropoulou et Yovos, 2008). CFU-GM : Colony Forming Unit Granulocyte-Macrophage

Les précurseurs mononucléés sont ensuite attirés vers un site de résorption par chimiotactisme, puis se différencient sous l'action de M-CSF et RANKL en pré-ostéoclastes exprimant le CTR et TRAP. Ces cellules, toujours sous l'effet de M-CSF et RANKL, fusionnent pour former des cellules multinucléées qui ne sont pas encore actives et ne développent pas de bordure en brosse. L'activation des ostéoclastes est due à RANKL qui va stimuler la formation de la bordure en brosse (Lacey et *al.*, 1998 ; Suda et *al.*, 1999).

Cependant la co-stimulation M-CSF / RANKL n'est pas la seule voie nécessaire à la différenciation ostéoclastique. Des signaux supplémentaires de co-stimulation issus des récepteurs OSCAR (osteoclasts associated receptor) et TREM2 (triggering receptor expressed on myeloid cells 2), relayés par les protéines adaptatrices, à motif ITAM (immunoreceptor tyrosine based activation motif), DAP12 (DNAX-activating protein) et FcR γ , sont également requis pour la formation d'ostéoclastes matures (Koga et al., 2004). Récemment, les protéines Tec et Btk, à activité tyrosine kinase, viennent d'être identifiées comme les molécules capables d'intégrer les signaux d'activation du complexe RANK / RANKL ainsi que ceux transmis par les protéines à domaine ITAM (Shinohara et al., 2008). Cette plate-forme moléculaire, couplée à la phospholipase C γ induit le flux calcique nécessaire à l'activation de NFATc1, un des facteursde transcription de la différenciation ostéoclastique.

D'autres facteurs de transcription, PU.1, AP-1 (fos/jun) et NF-kB ont aussi des rôles primordiaux (Yavropoulou et Yovos, 2008) pour la différentiation terminale des précurseurs en ostéoclastes. En effet, les animaux chez lesquels des délétions géniques de ces facteurs ont été réalisées présentent un phénotype ostéopétrotique dû à un défaut de formation ou d'activité des ostéoclastes (Crotti et *al.*, 2008). Ces facteurs de transcription interviennent à des stades différents de l'ostéoclastogenèse (figure 10) et régulent l'expression de protéines spécifiques de l'ostéoclaste, telles que la cathepsine K, le CTR et la TRAP (Kim et *al.*, 2005 ; Matsumoto et *al.*, 2004).



<u>Figure 10</u> : Facteurs de transcription impliqués dans la différenciation ostéoclastique (hors échelle).

La fonction essentielle des ostéoclastes est la résorption osseuse, qui correspond à un mécanisme de dégradation extracellulaire, contrairement à la phagocytose qui est un processus intracellulaire. Le premier événement intervenant dans la dégradation de l'os est l'adhérence des ostéoclastes à la zone de la matrice à résorber. Cette adhérence est assurée par l'interaction entre la matrice organique (notamment la vitronectine, la fibronectine et l'ostéocalcine) et les intégrines de la membrane ostéoclastique ($\alpha_V\beta_3$ ou récepteur à la vitronectine). Ces intégrines sont elles-mêmes associées au cytosquelette de l'ostéoclaste (Lakkakorpi et *al.*, 1993). Les filaments d'actine forment un anneau (figure 11) et délimitent la zone claire, dépourvue d'organites (Lakkakorpi et Vaananen, 1996).



<u>Figure 11</u> : Anneau d'actine observée par microscopie confocale (marquage de l'actine par la phalloidine TRITC et des noyaux par le DAPI) (d'après Bonnelye et al., 2008) La résorption se fait dans cette zone délimitée et s'effectue en deux étapes : la dissolution de la matrice minérale (1) puis la dégradation de la phase organique (2). L'acidification de la chambre de résorption (pH = 4,5) permet la déminéralisation de la matrice. Ce processus fait intervenir des pompes à protons dépendantes de l'ATP. Le pH à l'intérieur de l'ostéoclaste est maintenu par un transport passif de Cl⁻/HCO₃⁻. L'électroneutralité est assurée par un canal chlore (figure 12). La digestion de la trame organique s'effectue sous l'action des enzymes protéolytiques (cathepsine K, collagénases, métalloprotéases comme la MMP-12, ...) contenues dans les lysosomes (Blair et *al.*, 1986 ; Georges et *al.*, 2009 ; Rousselle et Heymann, 2002).



Figure 12 : Schéma d'un ostéoclaste actif (d'après Rousselle et Heymann, 2002).

3. La croissance osseuse

L'ostéogenèse ou formation du tissu osseux utilise un processus de métaplasie au cours duquel un tissu conjonctif est transformé en tissu osseux. La vascularisation des sites remaniés est une condition nécessaire au bon déroulement des différents processus d'ossification qui comprend deux phases.

A. Ossification primaire

L'ossification primaire correspond à la formation d'un tissu osseux sur un support non osseux. Elle débute durant la vie embryonnaire ou fœtale, à des moments variables suivant les pièces osseuses. La formation de l'os débute à partir d'un tissu conjonctif ou d'un support cartilagineux hyalin :

- la formation endoconjonctive correspond soit à l'ossification périostique pour la diaphyse des os longs, soit à l'ossification membranaire pour les os plats,

- la formation sur un support cartilagineux est nommée ossification endochondrale ou enchondrale, comme au niveau de la diaphyse des os longs, des épiphyses des os longs ou des os courts.

1. Ossification membranaire

L'ossification membranaire a lieu lors du développement des os plats. Le tissu osseux se développe directement par différenciation du tissu mésenchymateux embryonnaire. Le processus d'ossification débute avec l'arrivée de la vascularisation. Des cellules mésenchymateuses au niveau d'une zone vascularisée du tissu conjonctif embryonnaire prolifèrent et se différencient directement en pré-ostéoblastes puis en ostéoblastes. Ces cellules élaborent la matrice ostéoïde sur un support de fibres de collagène de type I, qui se minéralise dans un second temps. L'ossification progresse de proche en proche en formant un réseau de travées osseuses dans l'os spongieux. L'os formé au niveau de ces sites d'ossification est de l'os fibreux qui sera ensuite résorbé et remplacé par du tissu osseux lamellaire (Toppets, 2004).

2. Ossification périostique

L'ossification périostique participe à la croissance des os courts et est responsable de l'augmentation du diamètre des os longs. Des bordures d'ostéoblastes sécrètent de l'os réticulaire sur un support de fibres de collagène provenant du périoste. Ces fibres orientées dans tous les sens permettent une continuité physique entre le tissu osseux en formation et les tissus péri-osseux. Au fur et à mesure, les travées osseuses s'épaississent par sécrétion successive de matrice osseuse par les ostéoblastes. La densification progressive de la matrice osseuse réalise des lames concentriques d'os périostique autour de la diaphyse. Cette apposition des lames de l'intérieur vers l'extérieur permet la croissance en épaisseur des diaphyses des os longs (Toppets, 2004).

3. Ossification endochondrale

L'ossification endochondrale est le processus survenant au cours du développement des os longs. Elle comporte deux phases : la destruction du cartilage préexistant puis son remplacement par de l'os.

Dans la partie centrale du cartilage, les chondrocytes s'hypertrophient et la matrice cartilagineuse se réduit à de fines travées. Des sels phosphocalciques précipitent sur cette matrice et donnent naissance à du cartilage calcifié dans lequel les chondrocytes hypertrophiés se retrouvent prisonniers puis meurent par apoptose. Une néovascularisation permet alors l'acheminement de cellules ostéoprogénitrices et d'ostéoclastes, qui résorbent le cartilage calcifié en formant des travées. Les cellules ostéoprogénitrices, une fois fixées sur les travées, se multiplient et se transforment en ostéoblastes qui sécrètent une matrice ostéoïde, qu'ils minéraliseront ensuite, et qui constitue l'os primaire endochondral. Cette structure sera rapidement détruite par les ostéoclastes et remplacée par de l'os secondaire (Toppets, 2004).

B. Ossification secondaire

L'ossification secondaire correspond à la formation d'un tissu osseux sur un support osseux, après une phase préalable de destruction de la matrice osseuse préexistante par les ostéoclastes. Elle élabore un os plus résistant et mieux vascularisé : c'est la formation des ostéons. Elle survient principalement au niveau de la diaphyse des os longs. Au cours de ce type d'ossification, des bourgeons conjonctivo-vasculaires amenant des ostéoclastes abordent la diaphyse du côté de la cavité médullaire et du périoste. Les ostéoclastes creusent de larges canaux dans l'os lamellaire. Ces canaux sont ensuite colonisés par des cellules ostéoprogénitrices attachées à la paroi du canal et se transformant en ostéoblastes. Les ostéoblastes sécrètent de la matrice ostéoïde qui va rapidement se minéraliser. De nouvelles cellules ostéoprogénitrices se déposent sur la matrice osseuse formée et se transforment en ostéoblastes qui sécrètent à leur tour une matrice dans laquelle ils se retrouvent emmurés et ainsi de suite jusqu'à former un ostéon. C'est ainsi que l'os haversien va entièrement se substituer à l'os lamellaire périostique (Toppets, 2004).

4. Le remodelage osseux

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

Le signal qui déclenche le remodelage osseux peut être de nature mécanique (altération de l'architecture locale de l'os : fracture, prise de poids...) (Turner et Pavalko, 1998) ou hormonale comme c'est le cas dans l'ostéoporose où une diminution du taux d'estrogènes entraîne une augmentation du nombre et de l'activité des ostéoclastes (Pacifici, 1998). Le remodelage en lui-même présente une succession de quatre phases parfaitement définies : activation, résorption, inversion et formation (Hill, 1998) (figure 13).

A l'état quiescent, la surface de la matrice extracellulaire de l'os est recouverte par une bordure d'ostéoblastes (cellules bordantes), qui empêche l'accès de la matrice aux ostéoclastes. Ces cellules bordantes ont une activité métabolique très réduite, mais peuvent se multiplier ou se différencier à nouveau en ostéoblastes fonctionnels sous l'influence de stimuli mécaniques ou moléculaires. Lors de la phase d'activation, sous l'action des facteurs tels que la PTH, la vitamine D3 et prostaglandine E2 (PGE2), les ostéoblastes se rétractent et laissent la place aux précurseurs mononucléés des ostéoclastes, ou pré-ostéoclastes, qui peuvent adhérer à la matrice. Les ostéoblastes situés à proximité des pré-ostéoclastes vont alors favoriser leur différenciation en ostéoclastes matures via la production de différentes cytokines dont RANKL qui va interagir avec son récepteur RANK présent à la surface des pré-ostéoclastes.



Figure 13 : Les différentes étapes du remodelage osseux (d'après Lerner, 2006)

Une fois les ostéoclastes formés et matures, la phase de résorption débute et se déroule comme indiqué précédemment. Les ostéoclastes quittent ensuite le site de résorption et la phase d'inversion peut alors commencer. Les facteurs responsables de l'arrêt d'activité des ostéoclastes ne sont pas totalement élucidés. Il semblerait toutefois que des récepteurs membranaires sensibles à la concentration de calcium dans la chambre de résorption provoqueraient le détachement des ostéoclastes de la surface osseuse (Marie, 2009). Les ostéoclastes détachés peuvent se déplacer à la surface de l'os et résorber de nouveau la matrice osseuse ou mourir par apoptose vraisemblablement médiée par le système Fas/Fas ligand (Wu et *al.*, 2003). Ces ostéoclastes sont alors remplacés par des cellules mononucléées de type macrophagique qui vont éliminer les derniers résidus de matrice présents dans le fond de la lacune.

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

II. Les principaux régulateurs de la résorption osseuse

Le remodelage osseux est un processus complexe faisant intervenir deux types cellulaires. La maturation et l'activité de ces cellules sont sous la dépendance de facteurs locaux et systémiques (hormones, facteurs de croissance, cytokines,...). Parmi ces facteurs, la triade OPG / RANK / RANKL découverte il y a une dizaine d'années apparaît être la voie principale de régulation.

1. La triade OPG / RANK / RANKL

La découverte en 1997 de l'ostéoprotégérine (OPG, TNFRSF11B) et l'identification consécutive de son ligand RANKL (TNFRSF11) et de RANK (TNFRSF11A) ont révolutionné les connaissances des mécanismes moléculaires à la base de la régulation du remodelage osseux (Simonet et *al.*, 1997). Ce système a été depuis caractérisé grâce à l'utilisation de modèles animaux transgéniques qui ont permis de mieux comprendre le rôle de chaque protagoniste dans le contrôle de la biologie osseuse. L'interaction de RANKL à son récepteur RANK induit la différenciation et l'activation des précurseurs ostéoclastiques en ostéoclastes matures tout en assurant également leur survie. L'OPG est un récepteur soluble capable de se lier à RANKL et d'empêcher son interaction avec RANK. L'OPG est donc, à ce titre, une molécule anti-résorption osseuse (figure 14).



<u>Figure 14</u> : Rôle de la triade OPG / RANK / RANKL dans la différenciation ostéoclastique (d'après Amgen adapté de Boyle et *al.*, 2003)

<u>A. RANKL</u>

Si RANKL, membre de la superfamille du TNF, est aussi connu sous le nom d'OPGL (Osteoprotegerin Ligand), TRANCE (TNF-Related Activation-Induced CytokinE) ou ODF (Osteoclast Differentiation Factor), la nomenclature officielle est le TNFSF11 (11^{ème} membre de la superfamille du TNF). Les différentes appellations s'expliquent du fait que RANKL a été identifié et cloné au même moment par deux groupes de recherche différents, l'un à partir d'une lignée de cellules stromales de la moelle osseuse murine ST2 (Yasuda et *al.*, 1998), et l'autre à partir de cellules myélomonocytaires murines 32D (Lacey et *al.*, 1998). RANKL est une protéine transmembranaire de type II (partie N-terminale intracellulaire) sans peptide signal (Hofbauer et *al.*, 2000) montrant une homologie d'environ 30% avec TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand) et CD40, et d'environ 20% avec Fas-Ligand (Wong et *al.*, 1997).

RANKL existe sous trois isoformes (chez la souris et l'homme) résultant de l'épissage alternatif d'un même gène (Ikeda et *al.*, 2001 ; Suzuki et *al.*, 2004). L'isoforme RANKL1 correspond à une protéine transmembranaire de 317 acides aminés chez la souris et 316 chez l'homme, possédant un domaine intra-cytoplasmique complet lui permettant d'interagir avec des molécules intracellulaires. RANKL3 est une protéine soluble monomérique de 199 acides aminés chez la souris et 244 chez l'homme, intracytoplasmique et non sécrétée, délétée dans sa partie N-terminale pour les acides aminés correspondant aux domaines intracytoplasmique et transmembranaire de RANKL. Quant à l'isoforme RANKL2, elle est de structure différente suivant l'espèce : RANKL2 de souris (287 acides aminés) possède un court domaine intracytoplasmique alors que RANKL2 humain (244 acides aminés) en est dépourvu (figure 15).



<u>Figure 15</u> : Structure des trois isoformes de RANKL et de son récepteur RANK (D'après Theoleyre et *al.*, 2004). Dans le milieu extracellulaire, la forme soluble de RANKL peut également être libérée de la membrane plasmique après clivage par des protéases comme ADAM-10 (A Desintegrin And Metalloprotease), ADAM-17, la MMP-7 ou la MMP-14 (Georges et *al.*, 2009 ; Hikita et *al.*, 2006)

RANKL est exprimé par un grand nombre de cellules et de tissus, mais plus fortement par le squelette (os, moelle osseuse, cartilage) (Lacey et *al.*, 1998 ; Yasuda et *al.*, 1998), les organes lymphoïdes (ganglions, thymus, rate, foie fœtal) et par le système vasculaire (Collin-Osdoby et *al.*, 2001). RANKL est exprimé dans différentes lignées de cellules stromales (ST2, MC3T3-E1) et d'ostéosarcomes (UMR-106, SaOS2), dans des ostéoblastes murins en culture primaire et dans les chondrocytes hypertrophiques murins (Kartsogiannis et *al.*, 1999). Les ostéoblastes matures expriment peu RANKL ; à l'inverse les cellules stromales l'expriment en quantité importante. Il est également exprimé en grande quantité par les lymphocytes T, les cellules endothéliales et les glandes mammaires (Anderson et *al.*, 1997 ; Srivastava et *al.*, 2003). Enfin une expression faible de RANKL a été mise en évidence dans le cerveau, le cœur, les poumons, les reins et le placenta (Kartsogiannis et *al.*, 1999).

Le principal rôle de RANKL est de stimuler la différenciation des ostéoclastes ainsi que leur maturation et leur survie en inhibant leur apoptose. (Fuller et *al.*, 1998 ; Wong et *al.*, 1999). En effet, des souris invalidées pour ce gène présentent une ostéopétrose (condensation osseuse) sévère associée à une absence totale d'ostéoclastes fonctionnels due à l'incapacité des ostéoblastes à supporter l'ostéoclastogenèse, induisant une augmentation de la densité minérale osseuse et une hématopoïèse compensatoire extramédullaire (Kong et *al.*, 1999). A l'inverse, après injection de RANKL, des souris naïves ont développé une ostéoporose importante (Hofbauer et *al.*, 2000). Ces résultats mettent en évidence le rôle clé de RANKL dans la résorption osseuse. En effet, in vitro RANKL, en se fixant à son récepteur RANK présent à la surface des pré-ostéoclastes (Yasuda et *al.*, 1998), induit en présence de M-CSF (Suda et *al.*, 1999) leur différenciation en ostéoclastes matures (Lacey et *al.*, 1998). De plus, les souris transgéniques invalidées pour RANKL présentent également un défaut de développement des glandes mammaires engendrant la mort des nouveaux-nés, ce processus pouvant être contrebalancé par l'injection de RANKL exogène (Fata et *al.*, 2000).

RANKL joue également un rôle majeur dans les fonctions immunitaires puisqu'il semble être très fortement impliqué dans la régulation de l'organogenèse des ganglions lymphoïdes et dans la maturation des cellules du thymus (Kong et *al.*, 1999). Le rôle de RANKL dans le système immunitaire peut être étendu aux cellules dendritiques (il est capable

de stimuler leur activation et leur survie) et aux monocytes (il agirait comme un facteur chimiotactique) (Baud'huin et *al.*, 2007b, revue acceptée en annexe) (figure 16).

Enfin, certaines cellules cancéreuses expriment une forme fonctionnelle du récepteur RANK donnant à RANKL une implication pro-tumorale (Kim et *al.*, 2006 ; Ando et *al.*, 2008 ; Mori et *al.*, 2009). RANKL intervient également dans les processus métastatiques des cancers du sein, de la prostate et du rein (Armstrong et *al.*, 2008 ; Jones et *al.*, 2006 ; Mikami et *al.*, 2009 ; Mori et *al.*, 2007). Il facilite la migration de cellules cancéreuses à l'origine de leur dissémination dans l'organisme (Mori et *al.*, 2009)



<u>Figure 16</u> : Les rôles du système RANK / RANKL sur les ostéoclastes et sur d'autres types cellulaires (d'après Boyce et Xing, 2007).

B. RANK

RANK est une protéine transmembranaire de type I (partie N-terminale extracellulaire) appartenant à la superfamille des récepteurs au TNF et qui possède environ 40% d'homologie avec CD40. Cette protéine transmembranaire de 616 acides aminés qui posséde un peptide signal (Anderson et *al.*, 1997) se présente à la membrane sous forme d'un récepteur trimérique. Le domaine extracellulaire de RANK contient 4 motifs riches en cystéine et deux

sites de N-glycosylation (Hofbauer et *al.*, 2000). RANK, récepteur de RANKL, est présent à la surface des précurseurs ostéoclastiques et des ostéoclastes matures au niveau osseux, et il est également exprimé par les lymphocytes, les cellules dendritiques et les cellules endothéliales. L'expression de RANK a été détectée dans différents tissus comme le muscle squelettique, la peau, le cerveau, les poumons, le foie (Anderson et *al.*, 1997 ; Min et *al.*, 2000 ; Nakagawa et *al.*, 1998).

RANK est essentiel à la différenciation et à la survie des ostéoclastes. En effet, des souris transgéniques invalidées pour ce gène (souris RANK-/-) présentent une ostéopétrose sévère associée à un manque d'ostéoclastes matures, phénotype similaire à celui des souris délétées pour le gène RANKL (Li et *al.*, 2000). Différentes études ont montré que RANKL se lie spécifiquement à RANK à la surface des pré-ostéoclastes avec une haute affinité (3 nM) et que cette liaison entraîne l'activation de RANK indispensable à l'ostéoclastogenèse (Hsu et *al.*, 1999 ; Nakagawa et *al.*, 1998). La fixation de RANKL à RANK entraîne, par l'intermédiaire de TRAF6, l'activation de voies de signalisation (telles que PI3K, p38, ERK, JNK, Akt ou NFkB) qui mènent à la différenciation des précurseurs ostéoclastiques et à l'activation des ostéoclastes (figure 17).



<u>Figure 17</u> : Signalisation induite par la liaison de RANKL à son récepteur RANK dans les ostéoclastes (Baud'huin et *al.*, 2007a).

Les souris RANK^{-/-}, en plus de développer une ostéopétrose, présentent une absence de ganglions lymphoïdes et un défaut de maturation des lymphocytes B et T alors qu'elles ont un développement thymique normal (Li et *al.*, 2000) confirmant les données obtenues pour RANKL.

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

C. Ostéoprotégérine (OPG)

L'OPG est une glycoprotéine sécrétée appartenant à la superfamille des récepteurs au TNF. Elle a été identifiée de façon concomitante par deux groupes indépendants (Simonet et *al.*, 1997 ; Yasuda et *al.*, 1998). L'OPG, contrairement aux autres membres de cette famille, ne possède ni domaine intracytoplasmique ni domaine transmembranaire et n'est donc produite que sous forme soluble.

Le gène humain codant l'OPG est localisé sur le chromosome 8q23-24 et contient 5 exons sur un domaine de 29 kb (Yamaguchi et *al.*, 1998). Structurellement, l'OPG est une protéine de 401 acides aminés (55-62 kDa), dont les 21 premiers acides aminés correspondent à un peptide signal clivé dans la forme mature de la protéine (figure 18). Dans sa partie N-terminale, les 4 domaines (D1 \rightarrow D4) riches en cystéine participent à l'activité anti-ostéoclastique de l'OPG. En effet, ce sont par ces domaines que l'OPG se fixe à son principal ligand : RANKL. Son extrémité C-terminale contient deux domaines de mort fonctionnels D5 et D6 ("death domain homologous region") (Yamaguchi et *al.*, 1998). Le dernier domaine (D7) possède un site de liaison à l'héparine essentiel pour l'interaction de l'OPG avec les protéoglycanes et les glycosaminoglycanes (Borset et *al.*, 2000 ; Theoleyre et *al.*, 2006). Au sein du domaine D7, une cystéine en position 400 permet l'homodimérisation de l'OPG (110-120 kDa). C'est sous cette forme que l'OPG est sécrétée. Elle présente dans ce cas une plus grande affinité pour RANKL (2 à 3 log) et une capacité à se lier à l'héparine renforcée (Schneeweis et *al.*, 2005).



Dimère d'OPG sécrété

Figure 18 : Structure de l'OPG (Holen et Shipman, 2006).

L'OPG est une molécule ubiquitaire présente dans le tissu osseux, la peau, le foie, les poumons, le cœur, les artères, les veines, les reins, le placenta, les glandes mammaires et le cerveau (Collin-Osdoby, 2004 ; Simonet et *al.*, 1997 ; Yasuda et *al.*, 1998). Elle est exprimée de façon prédominante par les cellules stromales de la moelle osseuse, mais son expression par les lymphocytes B et les cellules dendritiques peut également être induite par le TNF α , RANKL, l'IL-1 β et l'activation de CD40 (Schoppet et *al.*, 2007 ; Yun et *al.*, 1998). Enfin, les cellules endothéliales (Collin-Osdoby et *al.*, 2001), les fibroblastes, les monocytes et les ostéoblastes humains en culture primaire expriment fortement l'OPG (Hofbauer et *al.*, 2000), ainsi que des cellules tumorales de cancers du sein ou de prostate (Holen et Shipman, 2006).

Les fonctions principales de l'OPG ont été clairement mises en évidence par l'établissement de souris transgéniques surexprimant l'OPG. En effet, ces souris présentent une sévère ostéopétrose accompagnée d'une splénomégalie due à une hématopoïèse compensatoire extramédullaire et à un défaut de développement thymique (Simonet et *al.*, 1997). Une augmentation de l'os trabéculaire minéralisé associée à une diminution du nombre d'ostéoclastes est également observée. Au contraire, les souris invalidées pour l'OPG développent une ostéoporose et présentent une diminution de la densité minérale osseuse accompagnée de multiples fractures et d'une stimulation de renouvellement osseux (Bucay et *al.*, 1998). Ces phénomènes sont réversibles par l'injection intraveineuse d'OPG recombinante (Min et *al.*, 2000). L'OPG joue donc un rôle primordial dans le remodelage osseux et dans le maintien de la masse osseuse.

L'OPG fonctionne en réalité comme un récepteur leurre pour RANKL empêchant celuici de se lier à RANK (figure 17). Elle inhibe par conséquent la différenciation et l'activation ostéoclastiques (figure 19). Cependant, l'OPG possède une activité directe sur l'ostéoclaste mature. Elle régule la production de protéases impliquées dans la dégradation de la matrice organique. Wittrant et coll. ont montré que l'OPG diminue l'expression de la cathepsine K et de TRAP alors qu'elle augmente celle de la MMP-9 (Wittrant et al., 2002). De plus, l'OPG possède une action sur les tissus et cellules dans lesquels RANKL intervient. L'OPG agit par conséquent sur le système immunitaire en diminuant la survie des cellules dendritiques (Reid et Holen, 2009). Un autre ligand de l'OPG a été mis en évidence, il s'agit de TRAIL. La fixation d'OPG à TRAIL inhibe l'effet pro-apoptotique de cette cytokine qui en retour bloque l'activité anti-ostéoclastique de l'OPG (Emery et al., 1998). Des études in vitro ont montré que des cellules de cancers du sein et de prostate produisent des quantités suffisantes d'OPG pour se protéger de l'effet pro-apoptotique de TRAIL (Holen et al., 2002 ; Holen et al., 2005). Des résultats similaires ont été obtenus pour des lignées de carcinome du côlon (Pettersen et al., 2005). Ces travaux suggèrent donc un effet pro-tumoral de l'OPG dans certains cancers. Pourtant, dans des pathologies cancéreuses particulières (ostéosarcomes), l'OPG a démontré, in vivo, une activité anti-tumorale puissante (Lamoureux et al., 2007b).

L'OPG peut enfin interagir avec des molécules de la famille de l'héparine par un domaine de liaison spécifique (Yamaguchi et *al.*, 1998). Cette capacité à se lier à des structures glucidiques comme les glycosaminoglycanes (GAGs) est à l'origine de nombreuses activités complémentaires de l'OPG. C'est en effet en se liant aux protéoglycanes (structure protéique reliée à des chaînes de glycosaminoglycanes) que l'héparine induit le chimiotactisme des monocytes (Mosheimer et al., 2005). De plus, il a été montré qu'une fois liée à l'héparine ou à d'autres GAGs, l'OPG n'était plus capable d'interagir avec RANKL (Theoleyre et al., 2006). Des études menées chez l'animal ont permis de mettre en évidence que les activités anti-tumorales de l'OPG dans les ostéosarcomes étaient modifiées par l'environnement tumoral et osseux riches en GAGs et protéoglycanes (Lamoureux et al., 2009). Ces données suggèrent donc que l'héparine ainsi que les GAGs contrôlent l'activité de l'OPG.


Figure 19 : Les rôles de l'OPG dans différents types cellulaires.

2. Les autres protagonistes impliqués dans le remodelage osseux

Comme nous venons de le voir, le tissu osseux est sous le contrôle de la triade OPG / RANK / RANKL. Cette triade moléculaire est régulée par d'autres effecteurs, notamment par des hormones et des cytokines. Cependant le rôle de ces cytokines dans la biologie osseuse est parfois controversé comme c'est le cas de l'IL-6 que nous aborderons en détail.

A. Les facteurs hormonaux (Tableau I)

1. La parathormone ou PTH

Cette hormone peptidique de 84 acides aminés est la principale hormone responsable de l'homéostasie calcique. En effet, elle agit à plusieurs niveaux pour augmenter la concentration plasmatique du calcium. Sur l'os, la PTH stimule donc la résorption osseuse avec la production de RANKL par les ostéoblastes qui active les ostéoclastes (Qin et *al.*, 2004). Sur le rein, la PTH provoque l'excrétion urinaire de phosphore inorganique et la réabsorption des ions calcium. Enfin, elle augmente l'absorption intestinale de calcium et de phosphore (Poole et Reeve, 2005).

2. Le 1,25-dihydroxycholécalciférol ou 1,25 DHCC

Cette hormone active le remaniement osseux à savoir l'activité ostéolytique (synergie avec la PTH) sur l'os vieux et l'ostéogenèse par minéralisation de l'ostéoïde. Elle augmente l'absorption intestinale de calcium et de phosphore. Elle favorise la réabsorption rénale de calcium et de phosphore et diminue la sécrétion tubulaire (St-Arnaud, 2008)

3. La calcitonine

Cette protéine de 32 acides aminés est antagoniste de la PTH et est synthétisée par les cellules C contenues dans la thyroïde. La calcitonine inhibe la résorption osseuse en modifiant le cytosqulette des ostéoclastes et stimule l'activité ostéoblastique. Elle diminue la quantité de calcium et de phosphore inorganique circulant (Naot et Cornish, 2008 ; Suzuki et *al.*, 1996).

	Origine	Rôles
Parathormone	Glandes parathyroïdes	• Augmentation de la calcémie
		• Diminution de la phosphatémie
		 Augmentation du rapport phosphocalcique
		HYPERCALCEMIANTE
		HYPOPHOSPHATEMIANTE
Calcitonine	Cellules C de la thyroïde	• Diminution de la calcémie
		• Diminution du rapport phosphocalcique
		HYPOCALCEMIANTE
1,25 dihydroxycholécalciférol	Alimentation	Augmentation de la calcémie et de la phosphatémie
		afin que le rapport phosphocalcique soit constant

Tableau I : Effets des différentes hormones calciques sur l'os.

4. Autres hormones (Hadjidakis et Androulakis, 2006)

La thyroïde produit deux hormones principales : la triiodothyronine (T3) et la thyroxine (T4) indispensables au développement des os longs. Lors d'une hyperthyroïdie, on observe

une hypercalcémie et une accélération du remaniement osseux associée à une diminution de la vitesse de formation osseuse.

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

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

B. Les principales cytokines contrôlant le remodelage osseux

Certaines molécules, sécrétées par les cellules du microenvironnement osseux (cellules stromales, lymphocytes, ...) peuvent réguler la différenciation ostéoclastique.

1. M-CSF et IL-34

Le M-CSF est bien plus qu'un simple facteur de croissance hématopoïétique. Il s'agit d'une cytokine active sur beaucoup d'autres cellules et tissus, notamment le tissu osseux. Le rôle majeur du M-CSF dans l'ostéoclastogenèse a été mis en évidence chez les souris op/op (Kodama et *al.*, 1991) dans lesquelles une mutation non-sens du M-CSF entraîne l'absence de M-CSF biologiquement actif. Ces souris présentent une ostéopétrose sévère due à un défaut d'ostéoclastes. L'administration de M-CSF recombinant corrige le phénotype osseux et provoque l'apparition d'ostéoclastes capables de résorber (Felix et *al.*, 1990). Le M-CSF est impliqué dans plusieurs étapes de la différenciation ostéoclastique. Il est nécessaire dans la prolifération, la survie et l'adhérence des précurseurs ostéoclastiques (Knowles et Athanasou, 2009). Il a été reporté que le M-CSF est également actif sur les ostéoclastes matures en stimulant leur migration et leur adhérence (Pilkington et *al.*, 1998). Très récemment, une nouvelle cytokine, l'IL-34, a été découverte. Elle assure la survie des monocytes au même titre que le M-CSF (Lin et *al.*, 2008) et partage un même récepteur : le c-fms.

Nous avons par ailleurs montré récemment que cette cytokine pouvait se substituer au M-CSF dans l'ostéoclastogenèse induite par RANKL *in vitro* (Baud'huin et *al.*, article soumis en annexe). Dans plusieurs modèles de différenciation ostéoclastique (RAW 264.7, monocytes humains CD14⁺ et murins CD11b⁺), l'IL-34 peut remplacer le M-CSF et permettre la formation d'ostéoclastes. Comme le M-CSF, l'IL-34 assure les étapes de prolifération et

d'adhérence des précurseurs ostéoclastiques. Nous avons démontré également que l'IL-34 induisait, *via* le récepteur c-fms, l'activation des voies Erk1,2 et Akt. D'autre part, nous avons mis en évidence l'expression d'IL-34 au niveau de lésions de tumeurs à cellules géantes (TCGs). Les TCGs sont des lésions ostéolytiques pourvues d'une abondante vascularisation et constituées d'un triple contingent cellulaire, des cellules géantes multinucléées capables de résorber l'os, des cellules fibroblastiques et des cellules macrophagiques. La présence d'IL-34 dans ce type de tumeur très ostéolytique pourrait soutenir la formation de ces cellules géantes en complément du M-CSF.

<u>2. TNFα</u>

Le TNF α a un rôle important et central dans la physiopathologie de la résorption osseuse. La balance résorption / formation nécessaire au maintien de l'homéostasie de l'os est modifiée par de fortes concentrations de TNF α rencontrées dans les processus inflammatoires aigus et chroniques (Maladie de Crohn, polyarthrite rhumatoïde pour revue Nanes, 2003) L'augmentation de production de TNF α , particulièrement chez les femmes ménopausées, cause des dommages osseux en augmentant la résorption osseuse tout en inhibant la formation de l'os par les ostéoblastes (Pacifici, 1996).

Le TNF α peut, en présence de M-CSF, stimuler la formation d'ostéoclastes par un mécanisme impliquant les deux récepteurs spécifiques du TNF, TNFR1 et TNFR2, mais ne faisant pas intervenir RANKL (Azuma et *al.*, 2000 ; Kobayashi et *al.*, 2000). Les ostéoclastes formés sont capables de résorber l'os en présence d'interleukine-1 (IL-1).

<u>3. TRAIL</u>

L'activité de TRAIL sur l'ostéoclaste est actuellement très controversée. L'équipe italienne de Zauli et coll., a montré que TRAIL inhibait de façon directe la différenciation ostéoclastique induite par RANKL (Zauli et *al.*, 2004 ; Zauli et *al.*, 2008). Cependant, la même année, Yen et coll. ont démontré le contraire. Dans deux modèles d'ostéoclastogenèse, TRAIL est suffisant pour induire une différenciation ostéoclastique (Yen et *al.*, 2008). Mais l'effet réel de TRAIL sur l'ostéoclaste est désormais remis en question. Dans une lettre à l'éditeur, Labrinidis soutient le fait que TRAIL n'a aucune activité directe sur l'ostéoclaste que ce soit en présence ou en absence de RANKL (Labrinidis et *al.*, 2008).

<u>4. IL-1</u>

L'IL-1, protéine majeure de l'inflammation, stimule la résorption osseuse de manière indirecte. En effet, l'IL-1 augmente la production de M-CSF par l'ostéoblaste tout en diminuant celle de l'OPG. Ces deux effets stimulent l'ostéoclastogenèse (Tanabe et *al.*, 2005). Mais, l'IL-1 peut aussi avoir un rôle direct dans l'ostéoclastogenèse. Très récemment, Kim et coll. ont montré que l'IL-1 pouvait induire directement la différenciation ostéoclastique de précurseurs surexprimant le récepteur IL-1R1. En l'absence de RANKL, l'IL-1 induit l'expression de gènes spécifiques de l'ostéoclaste tels que l'enzyme TRAP, en activant le facteur de transcription MITF (Kim et *al.*, 2009).

5. Autres interleukines influençant l'ostéoclastogenèse

D'autres interleukines présentent une activité sur l'ostéoclastogenèse. Parmi celles-ci, l'IL-23 stimule la différenciation des PBMC en ostéoclastes en l'absence de RANKL exogène (Yago et *al.*, 2007) et augmente l'expression de RANK dans les précurseurs monocytaires (Chen et *al.*, 2008). Plus récemment, Mabilleau et coll. ont montré que l'IL-32 favorisait la formation de cellules multinucléées TRAP⁺. Toutefois ces cellules sont incapables de résorber une matrice osseuse (Mabilleau et Sabokbar, 2009). L'IL-22, produite par les lymphocytes Th17, stimule la formation d'ostéoclastes dans des cultures de splénocytes (Geboes et *al.*, 2009). Ces mêmes lymphocytes sécrètent l'IL-17 qui augmente la différenciation et l'activité des cellules ostéoclastiques dans la polyarthite rhumatoïde (Brown et *al.*, 2008).

6. Effets de l'interleukine-6 sur l'ostéoclastogenèse

a. L'interleukine-6, cytokine de l'inflammation

L'IL-6 est une glycoprotéine de 184 acides aminés, comprenant 4 hélices α (figure 20). Elle est produite par de nombreuses cellules après activation : monocytes / macrophages, lymphocytes T, cellules NK, fibroblastes, progéniteurs hématopoïétiques,... L'IL-6 est souvent produite sous l'effet d'autres cytokines. Ainsi, l'IL-1 et le TNF α induisent la production d'IL-6 par les monocytes / macrophages, les cellules endothéliales et les fibroblastes. L'IL-6 appartient à la famille des cytokines du type IL-6 qui comprend également l'IL-11, l'IL-27, l'IL-31, le LIF (Leukaemia Inhibitory Factor), l'OSM, le CNTF (Ciliary Neutrophic Factor), la cardiotrophine 1 (CT-1) et la cytokine cardiotrophine-like (CLC).



Figure 20 : Structure de l'IL-6.

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

Ces cytokines activent des gènes impliqués dans la différenciation, la survie, l'apoptose et la prolifération notamment dans le tissu osseux (Blanchard et *al.*, 2009). Ces cytokines utilisent la même sous-unité réceptrice, la glycoprotéine gp130, pour initier le signal dans la cellule, ce qui explique en partie la redondance fonctionnelle de ces molécules. Les signaux de transduction aboutissent à l'activation des facteurs de transcription de la famille STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription) et à l'activation de la cascade MAPKinase (Mitogen-Activated Protein Kinase) (figure 21).



<u>Figure 21</u> : Schéma de la signalisation de l'IL-6. L'IL-6 active la voie JAK/STAT et la cascade des MAPKinases (d'après Blanchard et *al.*, 2009). FT : Facteur de transcription.

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

b. L'interleukine-6 : molécule pro- ou anti-résorptive

Les ostéoblastes expriment faiblement le récepteur à l'IL-6 et la présence du récepteur soluble sIL-6R est nécessaire pour une efficacité maximale de l'IL-6 sur ces cellules (Erices et *al.*, 2002). L'IL-6 favorise l'expression de marqueurs ostéoblastiques comme la phosphatase alcaline, l'ostéocalcine ou la sialoprotéine osseuse et augmente la formation de nodule osseux et la minéralisation de la matrice extracellulaire (Blanchard et *al.*, 2009). Ces effets passent par l'activation du facteur de transcription STAT3 dans les cellules ostéoblastiques (Bellido et *al.*, 1997). Mais ce ne sont pas les seuls effets sur l'ostéoblaste. L'IL-6, toujours en présence du récepteur soluble sIL-6R, induit la production ou l'activation de divers effecteurs de la différenciation ostéoclastique comme RANKL, l'IL-1 ou la PGE2 (Liu et *al.*, 2005 ; Palmqvist et *al.*, 2002). Ces effets pro-ostéoclastiques indirects de l'IL-6 impliquent l'activation de STAT3 dans les ostéoblastes (Kim et *al.*, 2007).

L'effet de l'IL-6 sur l'ostéoclastogenèse est controversé selon les auteurs et selon le modèle d'étude employé. La différenciation en ostéoclastes de cellules de la moelle osseuse de souris est possible avec l'IL-6, à condition d'être couplée à son récepteur soluble sIL-6R (Tamura et *al.*, 1993). La même conclusion a été obtenue par l'équipe de Palmqvist (Palmqvist et *al.*, 2002) dans des cultures de cellules issues de la calvaria de souriceaux nouveau-nés. La présence du récepteur soluble de l'IL-6 est également indispensable pour induire la différenciation des cellules de moelle osseuse en culture avec des ostéoblastes et l'IL-6 (Udagawa et *al.*, 1995). Pourtant, chez des souris transgéniques pour l'IL-6 humaine, des analyses histomorphométriques ont montré une diminution du nombre d'ostéoclastes et de la résorption osseuse (Kitamura et *al.*, 1995).

Nos récents travaux montrent que l'IL-6 est capable d'agir sur l'ostéoclaste de façon directe (Duplomb et *al.*, 2008, article en annexe). Dans trois modèles d'ostéoclastogenèse, l'IL-6, en l'absence de récepteur soluble sIL-6R, inhibe la différenciation ostéoclastique

induite par RANKL et favorise la voie macrophagique. Cet effet direct s'accompagne d'une réduction d'expression de différents marqueurs ostéoclastiques (TRAP, cathepsine K et CTR) et d'une acquisition de marqueurs macrophagiques (CD11b, F4/80 et Emr1) à la fois par PCR quantitative et par cytométrie en flux. C'est à la suite de ces observations que nous avons cherché les mécanismes impliqués dans l'inhibition de l'ostéoclastogenèse. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à une possible modification de la voie de signalisation RANK / RANKL par des études western-blot. Nos travaux n'ont révélé aucune modification par l'IL-6 des voies classiquement activées par RANKL (MAPkinases, NF-kB et PI3kinase). Dans un second temps, nous avons étudié l'une des voies de signalisation propres de l'IL-6 : la voie STAT3. Tout d'abord par une approche de biologie moléculaire, nous avons cherché à bloquer la voie STAT3 en transduisant le modèle RAW 264.7 par un lentivirus codant pour une forme tronquée de STAT3 (STAT3 Δ). Il s'est avéré que la surexpression de la forme STAT3^Δ provoquait une mort cellulaire importante nous indiquant que ce facteur de transcription était important dans la survie et la différenciation des précurseurs ostéoclastiques. C'est dans cette optique que nous avons poursuivi nos investigations sur le facteur STAT3 en nous concentrant sur les phosphorylations activatrices de ce facteur de transcription. L'étude par western-blot des différentes formes de STAT3 et de leur localisation (cytoplasmique ou nucléaire) a révélé que la phosphorylation sur le résidu Tyrosine 705 est impliquée dans l'acivité inhibitrice de l'IL-6 tandis qu'un taux basal de phosphorylation du résidu Sérine 727 est nécessaire pour l'ostéoclastogenèse.

Ces résultats ont été confirmés la même année par une équipe japonaise. Yoshitake et coll. ont montré également que l'IL-6 inhibe la différenciation ostéoclastique de façon directe (Yoshitake et *al.*, 2008). Leurs expériences menées sur des cellules de moelle osseuse de souris conduisent aux mêmes observations biologiques que les nôtres (diminution du nombre d'ostéoclastes et diminution d'expression des marqueurs ostéoclastiques TRAP, CTR et cathepsine K). Cependant, le mécanisme avancé est différent. Dans leur modèle d'étude, l'IL-6 modifie certaines voies de signalisation activées par RANKL. L'IL-6 diminue fortement la phosphorylation de la voie JNK et la dégradation d'IkB. Les auteurs en revanche ne mentionnent pas la diminution de phosphorylation des sous-unités p50 et p52 de la voie NF-kB que l'on devrait normalement observer si IkB n'est plus dégradé. Dans l'ensemble de nos travaux, nous n'avons effectivement jamais observé de modification de la voie NF-kB, un autre mécanisme de régulation des facteurs p50 et p52 pourrait être responsable de cette ambiguïté. Néanmoins, ces deux études décrivent l'activité directe de l'IL-6 sur les précurseurs ostéoclastiques en empêchant leur différenciation en ostéoclastes matures. Une

très récente étude *in vivo* vient confirmer ces données *in vitro* (Darowish et *al.*, 2009). Des analyses d'histomorphométrie et de micro-scanner ont révélé que les lésions ostéolytiques induites par des particules de titane étaient bien plus importantes chez des souris déficientes pour le gène de l'IL-6. L'IL-6 n'est donc pas la cytokine responsable de l'augmentation du nombre et de l'activité des ostéoclastes. D'autre part, les auteurs ont montré que l'IL-6 inhibait la différenciation ostéoclastique *in vitro* de précurseurs issus de la rate (Darowish et *al.*, 2009).

En prenant en considération l'ensemble des travaux menés sur l'IL-6 et son implication dans le remodelage osseux, nous pouvons conclure à un rôle double de cette cytokine proinflammatoire. Lorsque l'IL-6 agit sur l'ostéoblaste c'est une cytokine pro-résorptive (Palmqvist et *al.*, 2002) et elle se comporte comme un facteur anti-ostéoclastique en agissant directement sur les précurseurs ostéoclastiques (Duplomb et *al.*, 2008, Yoshitake et *al.*, 2008). Dans un contexte de pathologies inflammatoires ostéolytiques d'origine cancéreuse ou non, les fortes concentrations d'IL-6 sont le reflet d'un mécanisme protecteur du squelette pour compenser la résorption osseuse induite par RANKL.

III. Système vasculaire et tissu osseux

Les vaisseaux sanguins sont organisés de manière hiérarchique afin de délivrer dans l'ensemble du corps l'oxygène, des facteurs solubles et différents types de cellules. L'endothélium est l'un des composants principaux de la vascularisation. Il n'agit pas seulement comme une barrière qui limite le mouvement des cellules et des molécules entre les tissus et la circulation, mais il est également un tissu actif capable d'échanger des informations avec les tissus adjacents et les cellules du sang. Ces échanges d'informations ne sont pas uni-directionnels : les tissus et l'endothélium communiquent entre eux par des facteurs de croissance, des cytokines, des chemokines... Le tissu osseux bien que d'apparence inerte, est richement vascularisé. Les vaisseaux sanguins parcourent l'os des épiphyses jusqu'à l'intérieur de la moelle osseuse. Les canaux de Volkmann et de Havers permettent aux vaisseaux de traverser l'os lamellaire et d'assurer les échanges entre ces deux tissus. Les facteurs de croissance et cytokines de l'endothélium agissent sur le tissu osseux.

<u>1 Rôle de la vascularisation dans le développement osseux</u>

Le système vasculaire joue un rôle important dans le développement et la croissance du squelette en intervenant non seulement dans l'ossification mais également dans le remodelage osseux. La formation du squelette met en jeu deux processus distincts : l'ossification membranaire et l'ossification endochondrale. Dans les deux cas, la formation de l'os est étroitement liée à la présence de vaisseaux sanguins.

L'ossification membranaire est caractérisée par l'invasion de capillaires dans le mésenchyme assurant une bonne oxygénation et par la différenciation de cellules souches mésenchymateuses en ostéoblastes matures. Ceux-ci vont déposer une matrice osseuse aboutissant à la formation de spicules, pouvant s'agglomérer pour donner des trabécules osseux. Le tissu osseux ainsi formé est relativement désorganisé et peut être remplacé par de l'os lamellaire, plus résistant. Ce type d'ossification a lieu durant le développement embryonnaire et s'observe dans les os plats du crâne, la clavicule et la mandibule (Gotzos et *al.*, 2007).

En revanche, les os longs sont formés par ossification endochondrale. Il s'agit du remplacement du cartilage par un os primaire. Ce processus est dû à une invasion du cartilage par des vaisseaux sanguins qui apportent des cellules ostéoprogénitrices et des précurseurs ostéoclastiques. Les ostéoclastes matures vont résorber progressivement le cartilage alors que

les ostéoblastes vont combler les lacunes par une matrice calcifiée. Le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) joue un rôle primordial dans l'ossification endochondrale. Il coordonne à la fois la vascularisation, la formation du cartilage et l'ossification (Dai et Rabie, 2007).

La vascularisation n'est pas seulement importante dans le développement osseux embryonnaire. La présence de vaisseaux est requise lors de la croissance, les capillaires envahissant le cartilage de conjugaison pour une croissance en longueur des os. A l'âge adulte, la vascularisation permet le remodelage osseux dans des conditions physiologiques et en réponse à des traumatismes ou à des conditions pathologiques comme la polyarthrite rhumatoïde et l'arthrose (Gerber et Ferrara, 2000).

2 Interactions de l'endothélium et de l'os

L'endothélium est une part essentielle du tissu squelettique, où la communication intercellulaire entre les cellules endothéliales et les cellules osseuses est importante dans le maintien de l'intégrité osseuse. Il a été démontré que des milieux conditionnés de cellules HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cell) augmentaient la prolifération de cellules stromales de moelle osseuse. De plus, lorsque des cellules HUVEC et ces cellules du stroma médullaire sont co-cultivées, l'expression et l'activité phosphatase alcaline (un marqueur ostéoblastique précoce) sont élevées suggérant une différenciation dans la lignée ostéoblastique (Villars et al., 2000). Ces deux types cellulaires, exprimant la connexine 43, seraient capables de communiquer entre eux par l'établissement de jonction gap. Inversement, il a été montré que des cellules HUVEC empêchaient la différenciation des cellules stromales de la moelle osseuse en ostéoblastes par inhibition de l'expression du facteur de transcription Osterix (Meury et al., 2006). Il semblerait que la différenciation ostéoblastique soit sous le contrôle des cellules endothéliales, en initiant le recrutement de cellules ostéoprogénitrices sur les sites de remodelage et en les maintenant dans un état pré-ostéoblastique afin d'éviter le dépôt de matrice osseuse dans les vaisseaux sanguins. Après la migration à travers l'endothélium de ces précurseurs ostéoblastiques, la différenciation continue jusqu'à l'obtention d'ostéoblastes matures capables de former une matrice osseuse. De plus dans l'environnement vasculaire un type de cellules, les péricytes, sont capable de se différencier en ostéoblastes (figure 22). Ce sont des cellules qui présentent de longs prolongements cytoplasmiques dont les principaux rôles sont la régulation du tonus vasculaire, de la perméabilité capillaire et la formation de la matrice extracellulaire (Diaz-Flores et *al.*, 2009). Ces péricytes sous l'influence de facteurs ostéogéniques se différencient en ostéoblastes (Doherty et *al.*, 1998). Les ostéoblastes jouent un rôle actif dans la vascularisation du tissu osseux. Ils sont une source importante d'angiopoïétine-1 dont les principales fonctions sont de stabiliser les vaisseaux formés et de promouvoir la différenciation de cellules mésenchymateuses en cellules musculaires lisses (Kasama et *al.*, 2007).

Des études *in vitro* ont montré l'implication des cellules endothéliales dans la différenciation et l'activité de la lignée ostéoclastique. Afin d'atteindre le site de remodelage osseux, les précurseurs ostéoclastiques ont besoin d'adhérer et de migrer à travers l'endothélium par diapédèse (Collin-Osdoby et *al.*, 2001 ; Kindle et *al.*, 2006). L'endothélium permettrait également l'adressage des précurseurs ostéoclastiques sur des sites spécifiques afin de contrôler la résorption osseuse (Parfitt, 2000).

Les cellules endothéliales de l'os ont des caractéristiques moléculaires propres. Certains facteurs moléculaires osseux sont capables d'agir sur les cellules endothéliales tels que la PTH, les estrogènes et des cytokines pro-inflammatoires. Les cellules endothéliales sécrètent des molécules impliquées dans le remodelage osseux, en agissant directement sur les ostéoblastes et les ostéoclastes. Les cytokines M-CSF et RANKL, facteurs requis pour la différenciation ostéoclastique, sont exprimées par les cellules endothéliales de même que l'OPG (Collin-Osdoby et al., 2001 ; Yoshida et al., 1990). L'OPG a également été retrouvée associée au facteur de von Willebrand (FvW) dans les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales (Zannettino et al., 2005). Ces auteurs ont démontré que sous conditions inflammatoires, l'OPG et le FvW pouvaient être libérés dans la circulation sanguine. Cette capacité du FvW à se lier à l'OPG suggère un événtuel rôle de ce facteur dans les activités biologiques de l'OPG. Comme évoqué précédemment, les cellules endothéliales peuvent réguler la différenciation ostéoblastique. Parmi les molécules candidates, l'endothéline 1 permettrait la communication entre ces cellules (von Schroeder et al., 2003) (figure 22). De plus, l'angiotensine II produite par les cellules endothéliales, exerce une activité anabolique vis-à-vis des cellules ostéoblastiques et favorise l'angiogenèse à travers l'expression du VEGF. Une étude récente a montré que le VEGF intervenait dans la différenciation ostéoblastique en augmentant l'expression des gènes codant pour la phosphatase alcaline et le collagène de type I (Grellier et al., 2009). Le VEGF agit aussi sur les ostéoclastes. Il peut non seulement remplacer le M-CSF dans l'osteoclastogenèse des monocytes induite par RANKL (Niida et al., 1999) mais il peut également augmenter l'activité des ostéoclastes matures (Nakagawa et al., 2000).



CSH : cellule souche hématopoiétique

<u>Figure 22</u> : Interactions moléculaires et cellulaires entre l'endothélium et les cellules osseuses (d'après Brandi et Collin-Osdoby, 2006).

3. La triade OPG / RANK / RANKL dans la biologie vasculaire

La première preuve démontrant l'implication de la triade moléculaire OPG / RANK / RANKL dans la biologie vasculaire a été apportée par le phénotype des souris déficientes en OPG. Ces souris, atteintes d'une ostéoporose sévère, présentent des calcifications au niveau de l'aorte et des artères rénales mais pas au niveau des petits vaisseaux. (Bucay et *al.*, 1998). Les lésions observées ressemblent aux lésions athérosclérotiques de l'homme, dans lesquelles on retrouve une expression du récepteur RANK et du ligand RANKL. Ces premières observations ont depuis été étayées par des travaux *in vitro* et *in vivo*. Désormais, il est bien établi que le système OPG / RANK / RANKL est impliqué dans la biologie des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses des vaisseaux. Cette triade est également associée à la survenue des calcifications artérielles.

Les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses expriment toutes les deux l'OPG, à des taux relativement élevés, mais plus particulièrement dans les artères rénales et aortiques. En revanche, RANK et RANKL ne sont pas détectés dans les vaisseaux sains non calcifiés (Collin-Osdoby et *al.*, 2001), bien qu'une faible expression de RANKL ait été observée dans des lésions aortiques humaines (Dhore et *al.*, 2001) ou dans des vaisseaux de métaphyse de souris (Lacey et *al.*, 1998). Sous l'action de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 α ou le TNF α , les cellules endothéliales expriment fortement l'OPG et RANKL (Ben-Tal Cohen et *al.*, 2007 ; Collin-Osdoby et *al.*, 2001). Le RANKL surexprimé à la surface de ces cellules est fonctionnel, puisqu'il induit la différenciation ostéoclastique de précurseurs monocytiques (Collin-Osdoby et *al.*, 2001).

Les cytokines OPG et RANKL, en plus d'être produites par les cellules endothéliales, ont des effets directs sur celles-ci. L'OPG est en effet capable d'induire la survie des cellules endothéliales par une voie dépendante des intégrines (Malyankar et al., 2000 ; Scatena et Giachelli, 2002). Une autre voie de survie est désormais envisagée, car l'OPG en se liant à TRAIL empêcherait l'effet pro-apoptotique de cette cytokine de la famille du TNF (Emery et al., 1998; Pritzker et al., 2004). L'OPG assure également la migration et la prolifération des cellules endothéliales par une voie dépendante des intégrines $\alpha_V \beta_3$ et $\alpha_V \beta_5$ (Kobayashi-Sakamoto et al., 2008). Contrairement à ce que l'on pourrait attendre, RANKL est également capable d'induire la survie des cellules endothéliales. Dans des cellules HUVEC soumises à une privation de sérum ou à un traitement par TNFa, RANKL prévient partiellement la mort des cellules endothéliales via la stimulation de la voie PI3K/Akt (Kim et al., 2003). RANKL est également impliqué dans la prolifération et le chimiotactisme des cellules endothéliales, il permet la néoangiogenèse (comparable au bFGF) in vivo dans deux modèles différents (Kim et al., 2002). C'est la liaison de RANKL au récepteur RANK présent à la surface des cellules endothéliales qui initie des signaux SRC/phospholipase C/Ca²⁺ induisant la formation de nouveaux vaisseaux que ce soit dans des conditions physiologiques ou pathologiques (tableau II).

<u>Tableau II</u>: Effets du système OPG / RANKL sur la biologie des cellules endothéliales

Cytokines	Effets sur les cellules endothéliales	Références
OPG	Survie par la voie des intégrines via NF-kB	Malyankar et <i>al.</i> , 2000 ; Scatena et Giachelli, 2002
	Survie par inhibition de TRAIL	Pritzker et al., 2004
	Migration et prolifération par la voie des intégrines $\alpha_V \beta_3$ et $\alpha_V \beta_5$.	Kobayashi-Sakamoto et <i>al.</i> , 2008
RANKL	Survie par la voie PI3 kinase	Kim et <i>al.</i> , 2003
	Prolifération et chimiotactisme permettant une néoangiogenèse	Kim et <i>al.</i> , 2002

De nombreux travaux ont montré l'implication des cytokines OPG et RANKL dans la survenue des lésions athérosclérotiques. Le phénotype des souris déficientes en OPG a été la première preuve apportée en 1998 (Bucay et al., 1998). Depuis, le rôle protecteur de l'OPG dans la survenue de calcifications artérielles a été confirmé. En effet, l'administration d'OPG chez le rat prévient la formation de calcifications induites par la Warfarine ou de fortes doses de vitamine D. Toutefois l'OPG ne peut pas inverser le phénomène si le processus de minéralisation a déjà débuté (Price et al., 2001). La capacité de l'OPG à promouvoir la survie des cellules endothéliales suggère que l'OPG protège potentiellement du processus de calcification. D'autre part, RANKL et OPG sont différemment exprimés dans les sténoses aortiques calcifiées (Kaden et al., 2004). En effet, alors que RANKL est fortement exprimé dans les lésions calcifiées, l'OPG n'est détectée que dans le tissu sain et non dans le tissu pathologique. De plus, dans des cultures de myofibroblastes de valve aortique humaine, RANKL favorise la calcification de la matrice et l'expression de gènes associés à l'ostéoblaste. Enfin, les cellules endothéliales de la microvascularisation produisent un environnement favorable à la formation d'un tissu calcifié et stimulent aussi l'adhérence et la migration transendothéliale de monocytes, pouvant se différencier en ostéoclastes sous l'action de RANKL (Kindle et al., 2006). Plus récemment, l'anticorps humanisé Denosumab dirigé contre RANKL a prouvé son efficacité dans les atteintes vasculaires. Il prévient le dépôt de cacium dans les artères de souris surexprimant la forme humaine de RANKL (Helas et *al.*, 2009). L'ensemble de ces résultats montre l'implication des cytokines RANKL et OPG dans la survenue des calcifications aortiques.

IV. Objectifs de la thèse

Le tissu osseux est un tissu conjonctif complexe en perpétuel remaniement, reposant sur l'équilibre de deux mécanismes: la formation et la résorption osseuse. La régulation du remodelage osseux est basée sur l'intervention de nombreuses hormones, cytokines et facteurs de croissance.

La vascularisation très importante du tissu osseux est le témoignage d'une activité métabolique importante. L'implication du système vasculaire dans la biologie osseuse apparaît à plusieurs niveaux. Dès la vie fœtale, l'envahissement du cartilage par les vaisseaux sanguins assure la formation d'un tissu calcifié en apportant notamment les précurseurs cellulaires et les cytokines nécessaires. Les vaisseaux sanguins permettent aussi la cicatrisation rapide des fractures osseuses. Enfin, grâce à l'étroite communication qu'elle entretient avec l'os, la circulation sanguine contrôle l'équilibre phosphocalcique et assure le drainage des précurseurs hématopoïétiques contenus dans la moelle osseuse.

L'interdépendance des systèmes vasculaire et osseux apparaît également sur le plan moléculaire. La circulation prend en charge les hormones, les facteurs de croissance et les cytokines qui permettent la différenciation, l'activation et la survie des cellules osseuses. La système OPG / RANK / RANKL constitue la charnière moléculaire entre le tissu osseux et le système vasculaire. Cette triade qui a fait l'objet de nombreuses publications quant à sa capacité à contrôler le remodelage osseux joue également un rôle important dans la biologie vasculaire. Elle agit principalement sur les cellules endothéliales dont elle stimule la survie et la prolifération.

L'OPG possède, en plus de RANKL, d'autres ligands parmi lesquelles deux possèdent des activités dans la biologie vasculaire. L'OPG produit dans les cellules endothéliales est en effet capable de se lier au facteur de von Willebrand (FvW) (Zannettino et al., 2005). Le FvW a un rôle essentiel dans l'hémostase sanguine en permettant le recrutement les plaquettes sur les sites de lésion vasculaire. Le FvW est, par ailleurs, lié au FVIII de la coagulation sanguine dans la circulation pour former le complexe FVIII/FvW. Ces données suggèrent l'implication du FVIII/FvW dans des processus biologiques contrôlés par l'OPG. L'OPG est également capable de se lier à l'héparine Ce glycosaminoglycane est un puissant anti-coagulant, libéré dans la circulation sanguine lors d'une lésion de l'endothélium.

Nos travaux de recherche ont pour but de comprendre les effets de ces ligands de l'OPG d'origine vasculaire dans des activités biologiques contrôlées par l'OPG.

Les différents objectifs des travaux de cette thèse seront :

- d'étudier les effets du complexe Facteur VIII/Facteur de von Willebrand dans la différenciation ostéoclastique, processus contrôlé par l'OPG,

- d'évaluer l'effet de ce complexe de la coagulation dans l'activité anti-apoptotique de l'OPG,

- d'etudier le rôle de l'héparine et d'autres glycosaminoglycanes dans l'ostéoclastogenèse.

PARTIE I :

COMPLEXE

FVIII/FACTEUR DE VON WILLEBRAND

ET BIOLOGIE OSSEUSE

I. Introduction

L'utilisation de cryoprécipités (fraction coagulante des protéines plasmatiques) comme traitement des troubles de la coagulation a conduit à l'identification d'un nouveau complexe protéique possédant une activité anti-hémophilique A et des propriétés de liaison aux plaquettes. Il y a une trentaine d'années, Zimmerman et coll. ont montré que deux protéines circulantes liées entre elles, assuraient ces deux effets : le facteur anti-hémophilique VIII (FVIII) et l'antigène lié au facteur VIII (FVIII-RAG ou facteur de von Willebrand ; FvW) (Zimmerman et Edgington, 1973). Le FVIII corrigeait l'hémophilie de type A tandis que le FvW permettait de traiter les patients atteints de la maladie de von Willebrand. Ces deux glycoprotéines aux propriétés bien distinctes dans l'hémostase sont intimement liées dans la circulation et forment un complexe protéique.

1. Rôles dans l'hémostase

L'hémostase est l'ensemble des phénomènes physiologiques qui concourent à la prévention et à l'arrêt des saignements. Elle participe à la réparation de la brèche vasculaire et d'une façon générale, elle assure le maintien de l'intégrité des vaisseaux. L'hémostase se déroule en deux étapes : l'hémostase primaire et l'hémostase secondaire.

A. L'hémostase primaire (figure 23)

Un traumatisme vasculaire conduit en premier lieu à la vasoconstriction du vaisseau lésé afin de diminuer le débit sanguin dans le vaisseau et ainsi limiter les pertes liquidiennes. Ce processus est appelé "temps vasculaire" de l'hémostase primaire. Ensuite, la formation d'un clou plaquettaire permet de combler la brèche, c'est le "temps plaquettaire". Au niveau de la zone lésée, le FvW adhère rapidement à la matrice sous-endothéliale mise à nue par le traumatisme. Les plaquettes, par l'intermédiaire de glycoprotéines (GP) membranaires, vont adhérer au FvW (GP Ib/IX) et au collagène (GP Ia/IIa) du sous-endothélium (Sakariassen et *al.*, 1979). Suite à cette phase d'adhérence plaquettaire, de nombreuses plaquettes circulantes vont s'agréger sur la monocouche plaquettaire formée. Les GP IIb et IIIa, majoritairement présentes sur la membrane plaquettaire, interagissent entre elles en présence de Ca²⁺ pour former un complexe IIb/IIIa actif qui se lie au fibrinogène plasmatique (des ponts se créent entre les nombreuses plaquettes présentes) constituant un caillot "réversible". Ensuite, les

plaquettes deviennent sphériques et forment des pseudopodes. Les granules se regroupent et leur contenu est déversé dans la lumière du vaisseau. Parmi les molécules libérées, le facteur tissulaire initie l'hémostase secondaire.



cellules endothéliales libèrent du FvW qui se fixe au sous-endothélium.

l'intermédiaire des GP la-lia et Ib-IX qui se lient respectivement au collagène et au FvW.

couplent au fibrinogène.



B. L'hémostase secondaire (figure 24)

L'hémostase secondaire (ou coagulation) conduit à la stabilisation du caillot en transformant le fibrinogène en fibrine grâce à l'activité enzymatique de la thrombine. Deux voies distinctes existent pour aboutir à la formation de la fibrine : la voie exogène et la voie endogène.

La voie exogène est initiée par le facteur tissulaire libéré par l'agrégat plaquettaire. Le facteur tissulaire fixe le facteur VII (FVII), en présence d'ions calcium, et permet l'activation du FVII (FVIIa). Le complexe FVIIa/facteur tissulaire est capable ensuite d'activer les facteurs IX et X. La voie exogène est la principale voie de la coagulation.

La voie endogène débute par le contact du facteur XII (FXII) avec le sous-endothélium. Cette fixation entraîne une activation progressive du FXII (FXIIa). Le FXIIa active à son tour le facteur XI par protéolyse. Puis le facteur XI activé transforme le facteur IX en facteur IX activé (FIXa).

Ces deux voies convergent vers une voie unique aboutissant à la formation de fibrine. Le recrutement du FvW lors de la phase primaire de l'hémostase permet l'activation du FVIII qui se détache du complexe FVIII/FvW. Le FVIII ainsi libéré forme un complexe équimolaire avec le FIXa issu des voies exogène et endogène. Ce complexe active le facteur X, qui en se liant au facteur V, clive la prothrombine en thrombine. Lorsque la concentration de thrombine formée atteint un certain seuil, la thrombine convertit le fibrinogène soluble en fibrine insoluble. La fibrine forme un réseau autour de l'agrégat de plaquettes pour réaliser le caillot "irréversible".



Figure 24 : Cascade de coagulation

Le complexe FVIII/FvW a des rôles majeurs dans le processus d'hémostase, que ce soit lors de l'hémostase primaire ou de la coagulation.

2. Biosynthèse des FVIII et FvW

L'ARN messager et la protéine (2332 acides aminés) du FVIII ont été retrouvés dans de nombreux tissus humains comme le foie, les poumons et les reins. Le foie constitue pourtant la source principale de FVIII *in vivo*, comme c'est le cas pour l'ensemble des facteurs de coagulation (Jacquemin et *al.*, 2006 ; Wion et *al.*, 1985). Parmi les cellules de l'environnement hépatique, il a été montré que les hépatocytes et les cellules endothéliales du sinus hépatique synthétisaient le FVIII (Hollestelle et *al.*, 2001).

Le FvW (2791 acides aminés) n'est sécrété que par deux types cellulaires : les cellules endothéliales et les mégacaryocytes (Sporn et *al.*, 1985 ; Wagner, 1990). La quantité de FvW sécrétée varie selon le type de vaisseaux. Des études histologiques menées chez l'animal, ont montré que le FvW était plus largement exprimé dans le réseau veineux que dans le réseau artériel (Wu et *al.*, 1987 ; Yamamoto et *al.*, 1998). Les tissus qui renferment une quantité importante de FvW sont les poumons et le cerveau, alors que le taux d'expression du FvW est très faible dans le foie. Bien que l'on retrouve le FVIII et le FvW liés dans la circulation périphérique, il n'y aucune preuve directe qui démontre que le FVIII et le FvW sont synthétisés ensemble dans un type cellulaire particulier. Toutefois, des études ont montré que le FVIII et le FvW peuvent être co-synthétisés, transportés jusqu'à des granules de stockage et libérés par les cellules endothéliales et les mégacaryocytes (Rosenberg et *al.*, 1998 ; Shi et *al.*, 2003 ; van den Biggelaar et *al.*, 2007 ; Wilcox et *al.*, 2003).

3. Importance de la formation du complexe FVIII/FvW

Nous avons vu précédemment que le FVIII et le FvW participaient à l'hémostase sanguine. Or, ces deux facteurs ne sont actifs que s'ils sont séparés l'un de l'autre. Pourtant dans la circulation générale, ces deux facteurs sont intimement liés. En effet, le FVIII est lié au FvW avec une grande affinité : le Kd est de l'ordre de 0,2 à 0,5 nM (Ganz et *al.*, 1991 ; Vlot et *al.*, 1995). La liaison du FVIII avec le FvW s'effectue entre la chaîne légère du FVIII (résidus 1672-1689) et les domaines D' et D3 du FvW (résidus 763 à 1035) (Terraube et *al.*, 2009) (figure 25). Cette intéraction est primordiale dans la biologie du FVIII. Il est maintenant bien établi que l'interaction du FvW avec le FVIII augmente la demi-vie du FVIII

en le protégeant de l'activité d'enzymes protéolytiques ainsi que de sa capture par certains types cellulaires tels que les macrophages ou les cellules dendritiques (Kaveri et *al.*, 2007 ; Koppelman et *al.*, 1996 ; van Schooten et *al.*, 2008). Ainsi, chez des patients atteints de maladie de Von Willebrand (Abshire, 2006) (absence de FvW fonctionnel) la demi-vie du FVIII administré par perfusion est réduite à 2h30 alors qu'elle est de 12h chez des patients sains (Tuddenham et *al.*, 1982). La concentration plasmatique du FVIII chez des patients sains est comprise entre 100 et 250 ng/ml (environ 1 nM) alors que la concentration plasmatique de FvW est de l'ordre de 50 nM (Borchiellini et *al.*, 1996). Ceci montre d'une part que le FVIII est toujours lié au FvW (sauf lorsqu'il devient actif dans la coagulation) et d'autre part qu'une proportion importante de FvW reste libre ou liée à d'autres ligands. De récentes études ont montré que le FvW peut se lier à l'OPG de façon physiologique que ce soit dans la circulation sanguine ou dans les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales (Shahbazi et *al.*, 2007 ; Zannettino et *al.*, 2005). Ces données suggèrent un rôle potentiel du complexe FVIII/FvW dans la biologie de l'OPG et de ce fait dans la biologie osseuse.

А



<u>Figure 25</u> : Représentation shématique des différents domaines et des sites d'interaction du FVIII (A) et du FvW (B) (d'après Terraube et *al.*, 2009).

4. Pathologies hémorragiques et phénotype osseux

Le complexe FVIII/FvW pourrait donc avoir un rôle dans la biologie osseuse, par son éventuelle interaction avec l'OPG. L'implication directe ou indirecte de ces facteurs de l'hémostase dans la biologie osseuse est soutenue par des données cliniques de patients atteints de troubles de l'hémostase (Kovacs, 2008). L'hémophilie A et la maladie de von Willebrand, dues respectivement à une déficience génétique du FVIII et du FvW, représentent 85% des pathologies hémorragiques.

L'hémophilie A est la plus fréquente des maladies hémophiliques. Elle est causée par des mutations dans le gène codant pour le FVIII, situé sur le chromosome X. L'incidence de l'hémophilie A est d'environ 1 pour 5000 naissances de garçons (Castaldo et al., 2007). La plus fréquente des anomalies, responsable de près de 50% des cas d'hémophilie A, est une inversion entre l'intron 22 et une région télomérique du chromosome X (Pothet et Jean, 2007). La protéine tronquée n'est plus fonctionnelle et est à l'origine de graves troubles de l'hémostase. Les principaux symptômes de l'hémophilie A sont des saignements spontanés et des douleurs articulaires (dues aux saignements dans les articulations, principalementt le genou). De plus, les patients atteints d'hémophilies sévères présentent une réduction de la densité osseuse que ce soit chez de jeunes hémophiles (Barnes et al., 2004) ou chez des patients plus âgés (Nair et al., 2007 ; Wallny et al., 2007). Le manque d'activité physique serait à l'origine de cette perte osseuse. Les hémarthroses et l'arthropathie chronique que développent les hémophiles les empêchent d'avoir une activité physique nécessaire au maintien d'une pression mécanique suffisante sur le squelette (Kovacs, 2008). Gurevitch et coll. ont avancé une autre hypothèse pouvant expliquer l'ostéoporose des hémophiles. Les auteurs suggèrent que les pertes sanguines s'accompagnent d'une augmentation de production de facteurs de croissance hématopoïétiques qui favorisent la prolifération des précurseurs hématopoïétiques comprenant entre autres les précurseurs ostéoclastiques. Leur différenciation est favorisée ce qui conduit à une résorption intense du tissu osseux (Gurevitch et Slavin, 2006).

La maladie de von Willebrand constitue un autre type de pathologie hémorragique. Elle est due à un défaut de la quantité, de la structure ou de la fonction du FvW. Elle touche environ 1% de la population générale, mais le traitement de la maladie n'est nécessaire que dans 1 cas sur 8000 (Abshire, 2006). L'étiologie réside dans des mutations du gène codant pour le FvW présent sur le chromosome 12. Il existe plusieurs formes de maladie de von

Willebrand. Dans les formes mineures à modérées (types I et II), les principaux symptômes sont des saignements mineurs (épistaxis, ecchymose, gingivorragie). Deux autres formes plus rares (type 2N et III), mais plus sévères, conduisent à des symptômes proches de ceux de l'hémophilie A (Veyradier et *al.*, 2006). En effet, ces deux formes se caractérisent par une absence de liaison au facteur VIII (type 2N) ou par un taux très faible de FvW circulant. Dans ces formes graves, le FVIII n'est plus protégé par le FvW, ce qui aboutit à des manifestations cliniques à l'hémophilie A (hématome, hémarthrose, ostéoporose) (Abshire, 2006).

II. Article 1

Le complexe facteur VIII/facteur de von Willebrand inhibe la différenciation ostéoclastique induite par RANKL et contrôle la survie cellulaire.

Le facteur VIII (FVIII) et le facteur de von Willebrand (FvW) sont deux glycoprtoéines de l'hémostase sanguine. Le FvW permet le recrutement des plaquettes et le FVIII agit comme un catalyseur de la voie exogène de la coagulation sanguine. Ces deux effecteurs de la coagulation sanguine forment un complexe dans la circulation sanguine. Il se dissocie lors d'une brèche vasculaire et permet son comblement par la formation d'un caillot. Récemment, l'interaction moléculaire entre le FvW et la protéine anti-résorptive OPG a été caractérisée, révélant un possible rôle du FvW dans la biologie osseuse. Le complexe FVIII/FvW circulant pourrait également participer à la biodisponibilité et à l'activité de l'OPG.

Avec le M-CSF, RANKL est la molécule nécessairee à la différenciation ostéoclastique. L'OPG, en se liant à RANKL, contôle l'osteoclastogenèse et maintient l'équilibre osseux. Le but de cette étude est de déterminer le rôle du complexe FVIII/FvW dans l'interaction OPG / RANKL.et son incidence dans le processus d'ostéoclastogenèse.

L'OPG possède un autre partenaire moléculaire qui est la cytokine pro-apoptotique TRAIL. Ce membre de la famille du TNF α induit une mort cellulaire par apoptose que l'OPG inhibe en se fixant à TRAIL. Le second temps de ce travail consiste à étudier l'effet du complexe FVIII/FvW sur l'interaction OPG / TRAIL et son rôle dans l'apoptose de cellules tumorales sensibles à TRAIL.

Ces travaux nous ont permis de montrer que :

- le complexe FVIII/FvW inhibe la différenciation ostéoclastique induite par RANKL,

- le complexe FVIII/FvW accroît l'activité inhibitrice de l'OPG envers l'ostéoclastogenèse,

- le complexe FVIII/FvW se lie directement à l'OPG, à RANKL et à TRAIL,

le complexe FVIII/FvW contrôle la prolifération tumorale en empêchant la laison OPG
 / TRAIL.

FACTOR VIII/VON WILLEBRAND FACTOR COMPLEX INHIBITS OSTEOCLASTOGENESIS AND CONTROLS CELL SURVIVAL Marc Baud'huin^{1,2}, Laurence Duplomb^{1,2,3}, Stéphane Teletchea^{1,2}, Céline Charrier^{1,2}, Mike Maillasson⁴, Marc Fouassier⁵ and Dominique Heymann^{1,2,3}

INSERM U957¹, Nantes, F-44035 France; Université de Nantes, Nantes atlantique universités, Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives², EA3822, Nantes, F-44035, France; CHU³, Hôtel Dieu, Nantes, France; INSERM U892⁴ and IFR26- Ouest genopole, F-44035 France; Centre Régional de Traitement de l'Hémophilie⁵, Laboratoire d'Hématologie, CHU, Hôtel-Dieu, Nantes, France

Running Head: Osteoclast, cell survival and FVIII/vWF complex.

Address correspondence to: Dr. D. HEYMANN, 1 rue Gaston Veil 44035 Nantes Cedex 1, France, (+33)240412845. Fax (+33)240412860; E-mail: <u>dominique.heymann@univ-nantes.fr</u>

Factor VIII/von Willebrand Factor (FVIII/vWF) complex, a molecule involved in coagulation, can be physically associated with osteoprotegerin (OPG). OPG is an antiosteoclastic protein and a soluble receptor for the pro-apoptotic protein TRAIL, suggesting a potential role of FVIII/vWF complex in bone and cancer biology. We thus assessed the FVIII/vWF effects of complex on osteoclastogenesis and cell survival. We first evidenced that FVIII/vWF complex inhibited **RANKL-induced** osteoclastogenesis, and enhanced the inhibitory effect of OPG. Interestingly, we revealed by surface plasmon resonance that FVIII/vWF complex bound to RANKL, whereas recombinant FVIII and vWF did not. By modeling, we showed that the OPG-binding domain to the A1-domain of vWF was closely located and partially overlapped to its binding site to RANKL. Then, we demonstrated that FVIII/vWF complex cancelled the inhibitory activity of OPG on TRAIL-induced apoptosis, and characterized interactions between these molecules. The present work evidenced a direct activity of FVIII/vWF complex on osteoclasts and on induced cell apoptosis, pointing out its potential involvement in physiological bone remodeling or in bone damages associated with severe hemophilia and cancer development.

The molecular triad OPG/RANK/RANKL is a crucial parameter of bone biology. Receptor Activator of Nuclear factor kB Ligand, (RANKL), a member of the Tumor Necrosis Factor (TNF) family, is mainly expressed by osteoblasts in the bone microenvironment and acts as a proresorption factor (1,2); RANKL binds to its receptor RANK expressed at the cell surface of osteoclast precursors and induces osteoclastic differentiation and maturation, leading to bone resorption (3,4). Osteoprotegerin (OPG), also mainly produced by osteoblasts, is a soluble decoy receptor for RANKL preventing the binding of RANK, and RANKL to thus inhibiting osteoclastogenesis (5-7). Bone turnover is tightly controlled by the OPG/RANK/RANKL triad, and any change in the balance OPG/RANKL leads to pathological conditions (7). OPG is also a receptor for Tumor Necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand, TRAIL (8,9), a cytokine which is able to induce a rapid cancer cell death by apoptosis (9-11). Interestingly, the binding of OPG to TRAIL completely inhibits TRAIL-induced cytotoxicity (8). OPG possess anti-apoptotic properties and therefore could be considered as a pro-tumoral agent.

Factor VIII is a plasma glycoprotein, mainly synthesized by hepatocytes, but also by kidney, sinusoidal endothelial cells, and in small amounts by lymphatic tissues (12). Factor VIII is one of the

main coagulation factors and allows the completion of the coagulation process. Factor VIII circulates in plasma in a non-covalent complex with the von Willebrand factor (FVIII/vWF complex). The most well knowngenetic disease associated with Factor VIII is hemophilia A, which shows an X-linked inheritance (13). A second important disease associated with low Factor VIII levels is von Willebrand disease (vWD), a bleeding disorder (14,15). Patients suffering from vWD have primary hemostasis defects leading to mucocutaneous bleeding or spontaneous deep tissue bleeding, such as in hemophilia A, or both (14). Bleeding diseases could be associated with different bone phenotypes. For instance, in a murine model of platelet-type vWD, a significant increase of bone mass and cortical tickness due to a reduction of the number of osteoclasts is observed (16). In contrast, various case reports suggest that children suffering from severe hemophilia have more risks to have low bone density and osteopenia/osteoporosis, preferentially caused by physical inactivity and leading to loss of joint function, shorter height, lower weight and muscle atrophy (17,18)

Von Willebrand factor is a multimeric protein containing many binding domains for various proteins such as the D'-D3 domain which binds FVIII (19) and the A1 domain which can bind different proteins such as the platelet glycoprotein Ib (20), heparin (21) and snake venom toxins (bitiscetin (22) and botrocetin (23)). Recently, it has been shown that the vWF is physically complexed to OPG (through the A1-domain) within the Weibel-Palade bodies and also in plasma, revealing a possible modulatory role of OPG in hemostasis (24,25). The aim of the present study was to characterize the effects of FVIII/vWF complex on osteoclastogenesis and cancer cell survival, interactions and then between complex FVIII/vWF complex and three members of TNF cytokine / cytokine receptor family: OPG, RANKL and TRAIL. The data obtained demonstrated that FVIII/vWF complex binds to OPG and RANKL, and thus indirectly participates to bone biology. Indeed, we first demonstrated that FVIII/vWF complex inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis. Secondly, we demonstrated that the FVIII/vWF complex abolished the inhibitory effect of OPG on TRAILinduced apoptosis, revealing a key role of FVIII/vWF complex in cancer development.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Osteoclast differentiation assay- Generation of osteoclasts from murine RAW 264.7 cells was performed as previously described (26) in the presence of recombinant human RANKL (100 ng/ml) (kindly provided by Amgen Inc, USA), human OPG (100 ng/ml) (R&D systems, UK), FVIII/vWF complex purified from plasma (ProSpec, Israel) or recombinant FVIII (Octocog alpha kindly provided by CSL Behring, USA) (1 or 2 U/ml). Generation of osteoclasts from human CD14⁺ monocytes was described previously (26). Briefly, purified CD14⁺ cells were cultured in α -MEM with 10% FCS and 25 ng/ml human M-CSF (R&D systems). After 3 days of culture, 100 ng/ml RANKL, 100 ng/ml OPG, and 1 U/ml FVIII or FVIII/vWF were added. Multinucleated cells formed with 3 nuclei and more were counted after TRAP staining (Sigma, France).

Cell proliferation- Human osteosarcoma cell lines MG63 and SaOS2 as well as the Ewing's sarcoma cell line TC71 were cultured in DMEM containing 10 % FCS. MG63 and SaOS2 cells were seeded at 500 cells/well in 96-well plates, and TC71 at 1500 cells/well. Cells were treated with 50-100 ng/ml TRAIL (R&D systems), 50-100 ng/ml OPG and 1 U/ml of FVIII/vWF complex for 72 hours. After the culture period, cell viability was determined by XTT assay (Roche Molecular Biomedicals, Germany).

Hoechst staining and caspase-3 activity- Cell death was monitored microscopically after Hoechst 33258 (Sigma) staining. MG63, SaOS2 and TC71 cells were seeded in a 96-multiwell plate and treated or not with TRAIL (50 ng/ml), OPG (50 ng/ml) and FVIII/vWF complex (1 U/ml) for 16 h, stained with 10 μ g/ml Hoechst reagent for 20 min at 37°C, and then observed under UV microscopy (DMRXA; Leica, Germany). Caspase-3 activity was assessed on 10 μ l of total treated cell lysates using the kit CaspACE assay system, fluorometric (Promega, USA) following the manufacturer's recommendations. Results are

expressed in arbitrary units and corrected for protein content.

Surface plasmon resonance-binding assays-Experiments were carried out on a BIAcore 3000 instrument (Biacore, Sweden). OPG (1 µg/mL in 5 mM maleate, pH 6.0), RANKL (2 µg/mL in 5 mM maleate, pH 5.75) and TRAIL (10 µg/mL in 10 mM acetate, pH 5.5) were covalently immobilized to the dextran matrix of a CM5 sensor chip (BIAcore) at a flow rate of 5 µl/min. Immobilization levels ranging of 300 RU for OPG, 400 RU for RANKL and 700 RU for TRAIL were obtained. vWF (Haematologic Technologies, USA) was immobilized on a C1 sensorchip at 2000 RU. Binding assays were performed at 25°C in 10 mM Hepes buffer, pH 7.4, containing 0.15 M NaCl and 0.005% P20 surfactant (HBS-P buffer, BIAcore) or in a pH 6.5 buffer containing 20 mM Bis-Tris and 10 mM CaCl2, at a flow rate of 30 µl/min for immobilized-OPG, and 20 ul/min for immobilized-RANKL and immobilized-TRAIL. Kds of OPG for vWF and FVIII/vWF were determined using single cycle kinetics, starting with 25 nM of OPG or with 300 nM of FVIII/vWF, then ¹/₂ dilutions. For binding analysis over the immobilized-RANKL or immobilized-TRAIL chip, binding of OPG alone or preincubated for 120 min with different concentrations of FVIII/vWF complex was performed for 4 min at a flow rate of 20 µl/min, followed by dissociation for 2.5 min. The resulting sensorgrams were fitted using BiaEval 4.1 software (Biacore). For Kd calculations, the following molecular weights were used: recombinant FVIII: 330 kDa and FVIII/vWF complex: 540 kDa.

ELISA assay- FVIII/vWF complex was coated at 1 U/ml on a 96-well plate overnight at room temperature (RT). OPG or RANKL (both were tested at 500, 100 and 10 ng/ml) were incubated for 2 hours at RT. After 2 washes with PBS/Tween 0.05%, the revelation of the binding of OPG or RANKL to FVIII/vWF complex was performed using a specific biotinylated antibody against each molecule (anti-OPG was from R&D systems and anti-RANKL from Peprotech, USA). Streptavidin conjugated to horseradish peroxydase (R&D systems) was incubated for 20 min then the revelation solution (Promega, USA) was added for 20 min and the reaction was stopped with sulfuric acid solution. The absorbance at 450 nm was measured using a microplate reader (Victor II, Perkin Elmer, USA).

Modeling analysis- To design OPG and RANKL, sequences were retrieved from the Universal Protein resource. Each protein was subjected to BLAST searches on the organism species (Homo Sapiens) and on the organism classification (Mammalia, Vertebrata)(27). These sequences were further analyzed using multiple sequence alignments to extract the most conserved residues (28). The multiple alignments were manually adjusted using Jalview (29). Human OPG and human RANKL models were built using Modeller 9v5 (30) from these refined alignments, respectively using substructure of DR5 (1D4V) (31) and mouse RANKL (1IQA) (32). All resulting models were assessed using the Protein Health module of Discovery Studio 2.1 (Accelrys Inc, USA). Alignment of the A1-domain of vWF on OPG has been realized as described below. Structural figures were produced with VMD (33) rendered using Pov-Ray and (http://www.povray.org/).

OPG, RANKL and TRAIL effect on coagulation cascade- Plasma of a healthy donor was drawn on 0.109 M buffered citrate. OPG, TRAIL and RANKL were added to the plasma at 100 ng/ml. Primary hemostasis was tested using PFA 100 automate (Siemens, USA). The Quick time was determined using the reagent RecombiPlasTin (Instrumentation Laboratory, Spain) on the ACL TOP automate (Instrumentation Laboratory). The activated partial thromboplastin time (aPTT) was tested using TriniCLOT Thrombin Time reagent (Trinity Biotech, Ireland) on ACL TOP. The thrombin time was tested using Thrombin (Siemens) on ACL TOP. The FVIII/C method was based on the aPTT. This assay was performed using FVIII deficient plasma (Biopep, France), an aPTT reagent with kaolin as contact phase activator (CK Prest, Diagnostica Stago, France) and an ACL TOP coagulometer.

Statistical analysis- The mean \pm SD was calculated for all conditions and compared by ANOVA, with Bonferroni multiple comparisons test as post-hoc test. Differences relative to a probability of twotailed p < 0.05 were considered significant.

RESULTS

FVIII/vWF inhibits murine and human osteoclast differentiation induced by RANKL. The impact of the FVIII/vWF complex on osteoclastogenesis was first examined using the cellular model RAW 264.7. After 5 days of culture with 100 ng/ml RANKL, RAW 264.7 cells differentiated into multinucleated cells. As expected, 50 ng/ml OPG **RANKL**-induced inhibited the osteoclastogenesis, by 47 % (p<0.01) (Figure 1A). Surprisingly, 2 U/ml of FVIII/vWF complex inhibited **RANKL**-induced osteoclastogenesis by 42 % (p<0.01), whereas 1 U/ml of FVIII/vWF complex had no effect on RANKL-induced osteoclastogenesis (Figure 1A). Furthermore, when 2 U/ml of FVIII/vWF complex was added to the culture medium in the presence of OPG. the inhibition of osteoclastogenesis was significantly stronger than that observed with OPG alone. Indeed, the inhibition of **RANKL-induced** osteoclastogenesis reached 65 % in the presence of a mixture OPG, FVIII/vWF complex compared to 47 % with OPG alone (p < 0.05). The recombinant FVIII alone had no effect on RANKL-induced osteoclastogenesis of RAW 264.7 cells (data not shown).

To ascertain the effect of FVIII/vWF complex on osteoclastogenesis, we next generated osteoclasts from human CD14⁺ purified from total peripheral blood mononuclear cells upon M-CSF and RANKL activation (26). As shown in Figures 1B and 1C, and similarly to RAW 264.7 cells, 1 U/ml of FVIII/vWF complex significantly inhibited by 30% the RANKL-induced osteoclastogenesis of CD14⁺ cells (p<0.05) (Figure 1C). Furthermore, 1 U/ml of FVIII/vWF complex reinforced the OPG inhibitory activity on **RANKL**-induced osteoclastogenesis (P>0.05) (Figure 1C). In accordance with the RAW 264.7 cells, the recombinant FVIII alone had no effect on RANKL mediated osteoclastogenesis (data not shown).

RANKL binds to FVIII/vWF complex similarly to OPG. To explore the molecular mechanism

underlying the effect of the FVIII/vWF complex on RANKL-induced osteoclastogenesis and the possible synergistic effect of OPG and FVIII/vWF complex, we investigated the molecular interactions between RANKL, OPG, FVIII/vWF complex, recombinant FVIII and vWF by surface plasmon resonance technique. It is well admitted that OPG and vWF are physically associated in Weibel-Palade bodies of endothelial cells and also in the plasma (24,25). Thus, we first immobilized vWF, and confirmed that the interaction between OPG and vWF depends on the biochemical environment (25). In fact, the binding of OPG to immobilized-vWF occurred only with 20 mM Bis-Tris pH 6.5 and not with 10 mM Hepes pH 7.4 (Figure 2A) and the dissociation constant obtained was Kd = $3.51 \ 10^{-9}$ M (Figure 2B). Then, we revealed that, in the pH 7.4 buffer, FVIII/vWF complex was also able to bind to immobilized-OPG whereas recombinant FVIII was not (Figure 2C). Furthermore, using a single cycle kinetic assay, the Kd of OPG for FVIII/vWF complex was 7.19 10^{-8} M (Figure 2D). The binding of OPG to the FVIII/vWF complex was also confirmed by ELISA assay. As shown in Figure 2E, OPG can bind, in a dose dependant manner, to the FVIII/vWF complex previously coated. Taken together, these results revealed that the interaction between OPG and the FVIII/vWF complex occurred through the vWF.

To explore the putative mode of ligandreceptor binding, we modelled the OPG-RANKL interaction using constructs obtained from crystallographic coordinates of homologous proteins TRAIL-DR5 complex as described by Cheng et al. (34). We confirmed that OPG-RANKL binding model is closely related to TRAIL-DR5 binding mode (data not shown). The data obtained clearly showed that the OPG-binding domain to A1-domain of vWF is closely located and partly overlaps to its binding site to RANKL (Figure 2F). Indeed, the interface shape consists of two anchoring points on OPG for RANKL by amino acids 68, 69, 82 and amino acids 88-91, 111 and 116-120 while the contact surface is a continuum for A1-domain of vWF to OPG (amino acids 62-69, 82-89) (Figure 2G).

The binding of FVIII/vWF complex to immobilized-RANKL was then investigated in the pH 7.4 buffer. Surprisingly, FVIII/vWF complex was able to bind to immobilized-RANKL

(response of 150 RU) whereas recombinant FVIII was not (Figure 3A). However, when using an immobilized-vWF sensorchip, no binding was observed whatever the biochemical parameters used (20 mM Bis-Tris pH 6.5 or 10 mM Hepes pH 7.4) (data not shown). As for the binding of OPG to the FVIII/vWF complex, we performed an ELISA assay using a coating of FVIII/vWF complex. As shown in Figure 3B, RANKL was able to bind to FVIII/vWF complex, in a dose dependant manner, confirming the results obtained by surface plasmon resonance experiments. Thus, the present data demonstrated for the first time the capacity of FVIII/vWF complex to bind RANKL. However, in contrast to OPG for which the interaction with this complex is done via the vWF, our results suggested that the tridimensional structure of the FVIII/vWF complex is mandatory for its interaction with RANKL. To further explore the involvement of the FVIII/vWF complex in the RANKL/OPG interactions, the effect of a pre-incubation of OPG (100 ng/ml) and increasing concentrations of FVIII/vWF complex for 2 hours was assessed. The pre-formed FVIII/vWF complex-OPG complex injected over the was then immobilized-RANKL (Figure 3C). This experiment revealed that the pre-formed complex FVIII/vWF/OPG did not prevent the binding of OPG to RANKL or the binding of FVIII/vWF to RANKL. Furthermore, the binding of OPG was higher in the presence of FVIII/vWF complex than without this complex. These results suggest that FVIII/vWF complex by binding to RANKL or OPG induced some modifications in the three-dimensional structure of OPG, RANKL or FVIII/vWF, resulting in a higher affinity between OPG and RANKL, and then potentially increasing its biological activity. Such hypothesis was supported by the synergistic effect of OPG-FVIII/vWF complex observed on RAW 264.7 cells (Figure 1A). Similarly, Figure 3D showed that FVIII/vWF complex was still able to bind RANKL or OPG even if RANKL had already been bound to immobilized-OPG, demonstrating that these three molecules can interact together without interfering the binding of one to another (see Figures 3c and 3d for schematic explanations). The same results were observed using immobilized-vWF; indeed a pre-formed complex OPG/RANKL was able to bind to immobilizedvWF in the same way as OPG alone (Supplementary data).

TRAIL bound to FVIII without affecting TRAIL/OPG interactions. OPG is not only a decoy receptor for RANKL, but also acts as soluble receptor for TRAIL and thus inhibits its proapoptotic activity (8,10,11). To determine whether or not the FVIII/vWF complex could affect the complex OPG/TRAIL, TRAIL has been immobilized on a sensorchip and the capacity of FVIII/vWF complex to bind to TRAIL was analyzed. In contrast to the previous experiments with OPG and RANKL, both FVIII/vWF complex and recombinant FVIII were able to bind to immobilized-TRAIL (Figure 4A and summarized in Figure 4D). Furthermore, as for OPG binding to immobilized-vWF, only specific biochemical conditions of 20 mM Bis-Tris pH 6.5 allowed the binding of TRAIL to immobilized-vWF (no binding with 10 mM Hepes pH 7.4) (data not shown). We confirmed that TRAIL bound to immobilized-OPG and showed that the complex formed by TRAIL and recombinant FVIII was still able to bind similarly to OPG (Figure 4B). To further explore the involvement of the FVIII/vWF complex in the OPG/TRAIL interactions, the effect of a pre-incubation of OPG and increasing FVIII/vWF concentrations of has been investigated. Whatever the concentration of FVIII/vWF complex used to form a complex with OPG, all these combinations completely inhibited the binding of OPG to TRAIL (Figure 4C and summarized in Figure 4D). These results suggested that the binding domains of OPG to vWF and TRAIL is very closed and one molecule bound to OPG can then block the binding sites of the second.

To investigate the relevance of this inhibition in a biological experiment, we performed viability assay on the human osteosarcoma cell line MG63 sensitive to TRAILinduced apoptosis. As shown in Figure 5A, the ability of TRAIL to induce MG63 cell death $(\sim 75\%, p < 0.01)$ was prevented by addition of OPG. In contrast, when 1 U/ml of FVIII/vWF complex was added to the culture medium OPG was not able to prevent the capacity of TRAIL to induce MG63 cell death (~60%, p<0.05).

Furthermore, the apoptotic effect of TRAIL was confirmed even in the presence of FVIII/vWF complex and OPG. Nucleus fragmentation was observed in MG63 (Figure 5B). In the same manner of 50 ng/ml of TRAIL, the combination TRAIL + FVIII/vWF complex + OPG induced nucleus fragmentation, as the cells exhibited a characteristic kidney-like form with condensed chromatin clumps compared with control cells. Moreover, TRAIL induced a significant increase of caspase-3 activity in MG63 cells (p<0.01) (Figure 5C) which was significantly reduced in the presence of OPG. But the caspase-3 activity was not decreased by OPG when FVIII/vWF complex was added (p<0.05). The same results of viability, Hoechst staining and caspase-3 activation, were obtained using other cell lines sensitive to TRAIL-induced apoptosis such as the human osteosarcoma cell line SaOS2 and the human Ewing's sarcoma cell line TC71 (data not shown)

Thus, these data revealed that the inhibitory effect of OPG on TRAIL-induced apoptosis can be reversed by FVIII/vWF complex and then evidenced the role of FVIII/vWF complex in the control of cell death.

Recombinant human OPG, RANKL and TRAIL do not affect the coagulation cascade. Due to the different interactions evidenced in our study between OPG, RANKL, TRAIL and FVIII/vWF complex, we evaluated the potential implications of these 3 molecules on the coagulation cascade. We demonstrated that 100 ng/ml of OPG, RANKL and TRAIL have no effect on the following assays: primary hemostasis, Quick time, activated partial thromboplastin time (aPTT), thrombin time, FVIII/C method based on the aPTT (data not shown).

DISCUSSION

Factor VIII (FVIII) associated with the von Willebrand factor (vWF) is a key protagonist of the coagulation process as evidenced in patients suffering from hemophilia A. Recent papers revealed the physical interaction between vWF and osteoprotegerin (OPG) (24,25), a powerful inhibitor of osteoclastogenesis and therefore of bone

resorption (7). Although severe hemophilia patients have also joint diseases, to our knowledge there is no evidence of the effect of FVIII/vWF complex on bone cells and especially on osteoclasts. The present work demonstrates that FVIII/vWF complex binds to OPG and RANKL, and thus indirectly participates to bone biology. This paper is thus the first evidence that FVIII/vWF complex inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis. Furthermore, in a second part of the manuscript, we also demonstrated for the first time that the FVIII/vWF complex abolishes the inhibitory effect of OPG on TRAIL-induced apoptosis, suggesting a potential function of FVIII/vWF complex in cancer development (Figure 6).

In two different models, FVIII/vWF complex regulates osteoclastogenesis by inhibiting the pro-osteoclastic activity of RANKL. Two different effects can be involved in this inhibition: the first way of inhibition occurs through a physical interaction between FVIII/vWF complex and RANKL, leading to an inactivation of RANKL; the second potential effect is a synergic effect of the FVIII/vWF complex with OPG. In fact, both molecules inhibit RANKL-induced osteoclastogenesis by themselves, but their association in the culture medium increased this inhibitory effect. However, different mechanisms could be proposed. OPG could bind to the FVIII/vWF complex through the vWF, and this complex could increase the affinity of OPG to RANKL; or the complex FVIII/vWF could bind to both RANKL and OPG, leading to a stronger inhibition of RANKL activity.

These interactions between FVIII/vWF complex, OPG and RANKL point out their potential involvement in bone and vascular system (7). Indeed, the hallmark of severe hemophilia is repeated bleedings into joints and muscles resulting in a severe and painful inflammation of synovitis named hemophilic synovitis (35,36). However, the exact mechanism related to bloodinduced joint disease is not precisely known even if some mechanisms are now settled. The processes that occur at early stages of bloodinduced joint disease associated infiltration of inflammatory cells releasing high amounts of inflammatory cytokines, enzymes (36), proteins such as hemoglobin, an increase of intra-articular pressure and synovial proliferation. The later

stages are characterized by a promotion of angiogenesis, cartilage cell apoptosis and subchondral bone destruction. Thus, hemophilic arthropathy shares several biological features with rheumatoid arthritis (37). Numerous studies in rheumatoid arthritis models have produced evidences for a causal role of excessive RANKL activity in associated-bone loss (38). Indeed, RANKL levels were concomitantly increased in inflamed joint leading to an increase in the RANKL/OPG ratio which appears positively correlated with bone destruction and osteoclast activity (39). The present data evidenced for the first time that FVIII/vWF complex inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis. Moreover FVIII/vWF complex did not abolish OPG activity on osteoclastogenesis but reinforced its activity in murine and human models. In this context, hemophilic arthritis may be associated intra-articular inflammatory with process with increased concomitantly an osteoclastogenesis due to a deficiency of FVIII/vWF complex.

OPG/RANK/RANKL triad constitutes a molecular bridge spanning bone metabolism, vascular biology and immunity (7). The first evidence linking the OPG/RANK/RANKL system to the vessel biology has been provided by the vascular phenotype of OPG deficient mice (40). Indeed, OPG-deficient mice exhibited medial calcification of the aorta and renal arteries and not of smaller vessels, suggesting that OPG and its molecular partners may play a role in the long term observed association between osteoporosis and vascular calcification (40). OPG physically associated with the vWF is localized in the Weibel-Palade bodies of endothelial cells and is rapidly secreted in response to inflammatory stimuli (24). More recently, in a case-control study, Bilora et al. assessed the presence of atherosclerosis in 50 patients suffering from hemophilia and in 50 age-matched control individuals (41). Their results suggest that hemophilia could protect against asymptomatic atherosclerosis. Overall, these observations strongly support that the OPG/RANK/RANKL and FVIII/vWF systems constitute a molecular cascade essential in the development of atherosclerotic lesions. Furthermore, our present work gives biological direct relationship between FVIII/vWF system and osteoclastic cells strengthening the interests of prophylaxis in young patients suffering from severe hemophilia. Even if prophylaxis seems to be the best therapeutic option for severe hemophilia A in order to prevent joint damages (42,43) in evidence based medicine, these results are giving a basic explanation for the effect of prophylaxis in joint damage and subchondral bone erosion prevention.

The second important result reported in our study is the control of cell apoptosis by the FVIII/vWF complex. We observed in vitro that OPG did not inhibit TRAIL-induced cell apoptosis when FVIII/vWF complex was present in the culture medium. Physical interactions between FVIII/vWF complex, OPG and TRAIL were confirmed by surface plasmon resonance experiments. We showed that FVIII/vWF complex was able to bind to TRAIL, and then we demonstrated that, when associated to OPG, FVIII/vWF complex prevented the binding TRAIL/OPG, correlating the in vitro apoptosis experiment. To our knowledge, the functional relationship between Factor VIII and/or vWF and apoptosis has never been investigated. TRAIL is a ligand which binds cytotoxic to type I and transmembrane receptors (DR4 DR5) possessing death domains and which ultimately activates caspase cascade inducing cell death (44). TRAIL has also two decoy receptors (DcR1, DcR2) which lack functional death domain and explain in part the absence of massive apoptosis in cells that express functional membrane receptor (45). However, normal and cancer cells lacking these decoy receptors can escape to cell death through the expression of OPG which is able to block TRAIL transduction signaling (8). It is well the coagulation established that cascade contributes to cancer development (46) and a clear correlation between thrombosis and cancer progression has been established. Indeed, tissue factor is upregulated on both tumor and host cells in cancer patients and initiates protease-activated receptor (PAR)-mediated cell signaling that leads to the production of soluble cytokines and angiogenic growth factors (47). More recently, Noé et al. demonstrated that platelets support tumor vascular homeostasis by regulating the stability of tumor vessels (48). Thus, tumor development appears as equilibrium between cell proliferation and cell death actively controlled by blood vessels and coagulation cascade. By reversing the inhibitory effect of OPG on TRAIL-induced apoptosis, FVIII/vWF may control tumor growth. Hemophilia A has been recently reported after tumor resection in patient suffering from glioblastoma (49) and it has been suggested that cancer cells could produce factor VIII-like tumor antigens. Such hypothesis has been also strengthened by Franchini et al., who reviewed recently the acquired factor VIII inhibitors in oncohematology (50). If the origin of such nonclassical antibodies against FVIII is not yet defined, these autoantibodies may complicate the clinical course of the malignancy (51). All these data associated with the present work are in favor of a contribution of FVIII/vWF complex during cancer disorders. Then the interaction between OPG-TRAIL-FVIII/vWF complex may be involved in induced cell apoptosis (endothelial, cartilage, bone and tumor cells) which is essential during angiogenesis associated with inflammation and cancer disorders.

REFERENCES

1. Kong, Y. Y., Yoshida, H., Sarosi, I., Tan, H. L., Timms, E., Capparelli, C., Morony, S., Oliveira-dos-Santos, A. J., Van, G., Itie, A., Khoo, W., Wakeham, A., Dunstan, C. R., Lacey, D. L., Mak, T. W., Boyle, W. J., and Penninger, J. M. (1999) *Nature* **397**(6717), 315-323

2. Theoleyre, S., Wittrant, Y., Tat, S. K., Fortun, Y., Redini, F., and Heymann, D. (2004) *Cytokine Growth Factor Rev* **15**(6), 457-475

3. Burgess, T. L., Qian, Y., Kaufman, S., Ring, B. D., Van, G., Capparelli, C., Kelley, M., Hsu, H., Boyle, W. J., Dunstan, C. R., Hu, S., and Lacey, D. L. (1999) *J Cell Biol* **145**(3), 527-538

4. Hsu, H., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., Solovyev, I., Colombero, A., Timms, E., Tan, H. L., Elliott, G., Kelley, M. J., Sarosi, I., Wang, L., Xia, X. Z., Elliott, R., Chiu, L., Black, T., Scully, S., Capparelli, C., Morony, S., Shimamoto, G., Bass, M. B., and Boyle,

W. J. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(7), 3540-3545

5. Tsuda, E., Goto, M., Mochizuki, S., Yano, K., Kobayashi, F., Morinaga, T., and Higashio, K. (1997) *Biochem Biophys Res Commun* **234**(1), 137-142

6. Simonet, W. S., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., Kelley, M., Chang, M. S., Luthy, R., Nguyen, H. Q., Wooden, S., Bennett, L., Boone, T., Shimamoto, G., DeRose, M., Elliott, R., Colombero, A., Tan, H. L., Trail, G., Sullivan, J., Davy, E., Bucay, N., Renshaw-Gegg, L., Hughes, T. M., Hill, D., Pattison, W., Campbell, P., Sander, S., Van, G., Tarpley, J., Derby, P., Lee, R., and Boyle, W. J. (1997) *Cell* **89**(2), 309-319

7. Baud'huin, M., Lamoureux, F., Duplomb, L., Redini, F., and Heymann, D. (2007) *Cell Mol Life Sci* **29**, 29

8. Emery, J. G., McDonnell, P., Burke, M. B., Deen, K. C., Lyn, S., Silverman, C., Dul, E., Appelbaum, E. R., Eichman, C., DiPrinzio, R., Dodds, R. A., James, I. E., Rosenberg, M., Lee, J. C., and Young, P. R. (1998) *J Biol Chem* **273**(23), 14363-14367

9. Degli-Esposti, M. (1999) *J Leukoc Biol* **65**(5), 535-542

10. Wiley, S. R., Schooley, K., Smolak, P. J., Din, W. S., Huang, C. P., Nicholl, J. K., Sutherland, G. R., Smith, T. D., Rauch, C., Smith, C. A., and et al. (1995) *Immunity* **3**(6), 673-682

11. Pitti, R. M., Marsters, S. A., Ruppert, S., Donahue, C. J., Moore, A., and Ashkenazi, A. (1996) *J Biol Chem* **271**(22), 12687-12690

12. Hollestelle, M. J., Thinnes, T., Crain, K., Stiko, A., Kruijt, J. K., van Berkel, T. J., Loskutoff, D. J., and van Mourik, J. A. (2001) *Thromb Haemost* **86**(3), 855-861

13. Bolton-Maggs, P. H., and Pasi, K. J. (2003) *Lancet* **361**(9371), 1801-1809

14. Sadler, J. E. (2005) Annu Rev Med 56, 173-191

15. Nichols, W. L., Hultin, M. B., James, A. H., Manco-Johnson, M. J., Montgomery, R. R., Ortel, T. L., Rick, M. E., Sadler, J. E., Weinstein, M., and Yawn, B. P. (2008) *Haemophilia* **14**(2), 171-232

16. Suva, L. J., Hartman, E., Dilley, J. D., Russell, S., Akel, N. S., Skinner, R. A., Hogue, W. R., Budde, U., Varughese, K. I., Kanaji, T., and Ware, J. (2008) *Am J Pathol* **172**(2), 430-439

17. Kovacs, C. S. (2008) *Transfus Apher Sci* **38**(1), 33-40

18. Wallny, T. A., Scholz, D. T., Oldenburg, J., Nicolay, C., Ezziddin, S., Pennekamp, P. H., Stoffel-Wagner, B., and Kraft, C. N. (2007) *Haemophilia* **13**(1), 79-84

19. Lollar, P., Hill-Eubanks, D. C., and Parker, C. G. (1988) *J Biol Chem* **263**(21), 10451-10455

20. Dumas, J. J., Kumar, R., McDonagh, T., Sullivan, F., Stahl, M. L., Somers, W. S., and Mosyak, L. (2004) *J Biol Chem* **279**(22), 23327-23334

21. Adachi, T., Matsushita, T., Dong, Z., Katsumi, A., Nakayama, T., Kojima, T., Saito, H., Sadler, J. E., and Naoe, T. (2006) *Biochem Biophys Res Commun* **339**(4), 1178-1183

22. Maita, N., Nishio, K., Nishimoto, E., Matsui, T., Shikamoto, Y., Morita, T., Sadler, J. E., and Mizuno, H. (2003) *J Biol Chem* **278**(39), 37777-37781

23. Fukuda, K., Doggett, T. A., Bankston, L. A., Cruz, M. A., Diacovo, T. G., and Liddington, R. C. (2002) *Structure* **10**(7), 943-950

24. Zannettino, A. C., Holding, C. A., Diamond, P., Atkins, G. J., Kostakis, P., Farrugia, A., Gamble, J., To, L. B., Findlay, D. M., and Haynes, D. R. (2005) *J Cell Physiol* **204**(2), 714-723

25. Shahbazi, S., Lenting, P. J., Fribourg, C., Terraube, V., Denis, C. V., and

Christophe, O. D. (2007) *J Thromb Haemost* **5**(9), 1956-1962

26. Duplomb, L., Baud'huin, M., Charrier, C., Berreur, M., Trichet, V., Blanchard, F., and Heymann, D. (2008) *Endocrinology* **149**(7), 3688-3697

27. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990) *J Mol Biol* **215**(3), 403-410

28. Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., and Higgins, D. G. (2007) *Bioinformatics* **23**(21), 2947-2948

29. Clamp, M., Cuff, J., Searle, S. M., and Barton, G. J. (2004) *Bioinformatics* **20**(3), 426-427

30. Sali, A., and Blundell, T. L. (1993) *J Mol Biol* **234**(3), 779-815

31. Mongkolsapaya, J., Grimes, J. M., Chen, N., Xu, X. N., Stuart, D. I., Jones, E. Y., and Screaton, G. R. (1999) *Nat Struct Biol* **6**(11), 1048-1053

32. Ito, S., Wakabayashi, K., Ubukata, O., Hayashi, S., Okada, F., and Hata, T. (2002) *J Biol Chem* **277**(8), 6631-6636

33. Humphrey, W., Dalke, A., and Schulten, K. (1996) *J Mol Graph* **14**(1), 33-38, 27-38

34. Cheng, X., Kinosaki, M., Takami, M., Choi, Y., Zhang, H., and Murali, R. (2004) *J Biol Chem* **279**(9), 8269-8277

35. De Palma, A. F., and Cotler, J. M. (1956) *AMA Arch Surg* **72**(2), 247-250

36. Valentino, L. A., Hakobyan, N., Rodriguez, N., and Hoots, W. K. (2007) *Haemophilia* **13 Suppl 3**, 10-13

37. Lafeber, F. P., Miossec, P., and Valentino, L. A. (2008) *Haemophilia* **14 Suppl 4**, 3-9
38. Kearns, A. E., Khosla, S., and Kostenuik, P. J. (2008) *Endocr Rev* **29**(2), 155-192

39. Bolon, B., Campagnuolo, G., and Feige, U. (2002) *Cell Mol Life Sci* **59**(9), 1569-1576

40. Bucay, N., Sarosi, I., Dunstan, C. R., Morony, S., Tarpley, J., Capparelli, C., Scully, S., Tan, H. L., Xu, W., Lacey, D. L., Boyle, W. J., and Simonet, W. S. (1998) *Genes Dev* **12**(9), 1260-1268

41. Bilora, F., Zanon, E., Petrobelli, F., Cavraro, M., Prandoni, P., Pagnan, A., and Girolami, A. (2006) *Clin Appl Thromb Hemost* **12**(2), 193-198

42. Astermark, J., Petrini, P., Tengborn, L., Schulman, S., Ljung, R., and Berntorp, E. (1999) *Br J Haematol* **105**(4), 1109-1113

43. Manco-Johnson, M. J., Abshire, T. C., Shapiro, A. D., Riske, B., Hacker, M. R., Kilcoyne, R., Ingram, J. D., Manco-Johnson, M. L., Funk, S., Jacobson, L., Valentino, L. A., Hoots, W. K., Buchanan, G. R., DiMichele, D., Recht, M., Brown, D., Leissinger, C., Bleak, S., Cohen, A., Mathew, P., Matsunaga, A., Medeiros, D., Nugent, D., Thomas, G. A., Thompson, A. A., McRedmond, K., Soucie, J. M., Austin, H., and Evatt, B. L. (2007) *N Engl J Med* **357**(6), 535-544

44. Johnstone, R. W., Frew, A. J., and Smyth, M. J. (2008) *Nat Rev Cancer* **8**(10), 782-798 45. Pan, G., Ni, J., Wei, Y. F., Yu, G., Gentz, R., and Dixit, V. M. (1997) *Science* **277**(5327), 815-818

46. Dogan, M., and Demirkazik, A. (2005) *Support Cancer Ther* **3**(1), 28-34

47. Pawlinski, R., and Mackman, N. (2008) *Semin Thromb Hemost* **34**(2), 182-186

48. Ho-Tin-Noe, B., Goerge, T., Cifuni, S. M., Duerschmied, D., and Wagner, D. D. (2008) *Cancer Res* **68**(16), 6851-6858

49. van Durme, C. M., Idema, R. N., and van Guldener, C. (2008) *Neth J Med* **66**(7), 286-288

50. Franchini, M., Targher, G., Manzato, F., and Lippi, G. (2008) *Crit Rev Oncol Hematol* **66**(3), 194-199

51. Meeks, S. L., Healey, J. F., Parker, E. T., Barrow, R. T., and Lollar, P. (2008) *Blood* **112**(4), 1151-1153

FOOTNOTES

This work was supported by the Région des Pays de la Loire [Program entitled "Ciblage Moléculaire et Applications Thérapeutique" (CIMATH)] and by the ANR 2007 INSERM Pathophysiology of Human Diseases project N° R07196NS. Marc BAUD'HUIN received a fellowship from the Région des Pays de la Loire.

The abbreviations used are: OPG, Osteoprotegerin ; RANKL, receptor activator of nuclear factor kB ligand ; FVIII/vWF complex, factor VIII/von Willebrand complex ; TRAIL, Tumor Necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand



Figure 1: FVIII/vWF complex inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis

Figure 1: FVIII/vWF complex inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis. *A.* RAW 264.7 cells were cultured for 5 days in the presence or not of 100 ng/ml hRANKL, 100 ng/ml of OPG, and 1 or 2 U/ml of FVIII/VWF complex. After May Grünwald / Giemsa (MGG) staining. *B.* Purified human CD14⁺ monocytes were cultured for 15 days in the presence of 25 ng/ml hM-CSF and 100 ng/ml hRANKL and 1 U/ml FVIII/vWF. TRAP coloration was performed at the end of the culture period, and (C) Purified human CD14⁺ monocytes were cultured for 15 days in the presence of 25 ng/ml hM-CSF and 100 ng/ml hRANKL and 1 U/ml FVIII/vWF. TRAP coloration was performed at the end of the culture period, and (C) Purified human CD14⁺ monocytes were cultured for 15 days in the presence of 25 ng/ml hM-CSF and 100 ng/ml hRANKL, with or without 50 ng/ml OPG and 1 U/ml FVIII/vWF. Multinucleated TRAP positive cells were counted under a light microscope. (A, C) Results are expressed as number of multinucleated cells (more than 3 nuclei) per well: each value represents the mean \pm SD. All experiments were performed independently 3 times in triplicate. * p<0.05, ** p<0.01.

Figure 2: The interaction between OPG and the FVIII/vWF complex occurred through the vWF



Figure 2: The interaction between OPG and the FVIII/vWF complex occurred through the **vWF.** A. OPG binds to immobilized-vWF chip in specific biochemical conditions. Binding assays were performed using 2 different buffers (pH 7.4 or pH 6.5) as described in experimental procedures section. **B**. Determination of the Kd of OPG for vWF using a Single Cycle Kinetic assay. OPG was injected over immobilized-vWF, in the pH 6.5 buffer, at 25 nM and then 1/2 dilutions. C. In the pH 7.4 buffer, FVIII/vWF complex, but not recombinant Factor VIII, binds to OPG. FVIII/vWF complex (50 U/ml) or recombinant Factor VIII (50 U/ml) were injected at a flow rate of 30 ul/min over the immobilized-OPG sensorchip for 5 min and the dissociation was monitored for 10 min. D. Determination of the Kd of OPG for FVIII/vWF complex, in the pH 7.4 buffer, using a Single Cycle Kinetic assay. FVIII/vWF complex was injected over immobilized-OPG starting at 300 nM and then ¹/₂ dilutions. E. OPG (500, 100 and 10 ng/ml) bound to the coated FVIII/vWF complex (1 U/ml) using an ELISA assay. Results are expressed using arbitrary units. F. Modeling of the interactions between OPG (green), RANKL (grey) and A1domain of vWF (yellow). OPG has the same orientation in the three illustrations. Right illustration is an overlay of left and middle illustrations. G. Representation of the binding domains involved in the interaction OPG-RANKL and OPG-vWF. OPG-amino acids involved for the binding with RANKL are schematized in black, and those involved for the binding with vWF are schematized in yellow.



Figure 3: Complex FVIII/vWF can bind to RANKL and OPG prevents its binding

Figure 3: Complex FVIII/vWF can bind to RANKL and OPG prevents its binding. *A*. In the pH 7.4 buffer, FVIII/vWF complex, but not recombinant Factor VIII, binds to RANKL. FVIII/vWF complex (50 U/ml) or recombinant Factor VIII (50 U/ml) were injected at a flow rate of 10 μ l/min over the immobilized-RANKL sensorchip for 5 min and the dissociation was monitored for 10 min. *B*. RANKL (500, 100 and 10 ng/ml) bound to the coated FVIII/vWF complex (1 U/ml) using an ELISA assay. Results are expressed in arbitrary units. *C*. FVIII/vWF complex increases the binding of OPG to RANKL. OPG was incubated with increasing concentrations of FVIII/vWF complex for 2 hours prior to the injection to immobilized-RANKL. *D*. FVIII/vWF complex, OPG and RANKL can form a tripartite complex. hRANKL (5 μ g/ml) was injected to immobilized-OPG with a flow rate of 20 μ l/min, then the FVIII/vWF complex was injected. Schematic explanations are represented in Figures 3c and 3d.



Figure 4: TRAIL binds to FVIII without affecting TRAIL/OPG interactions

Figure 4: TRAIL binds to FVIII without affecting TRAIL/OPG interactions. *A.* Recombinant Factor VIII and FVIII/vWF complex bind to immobilized-TRAIL. Recombinant Factor VIII (50 U/ml) or FVIII/vWF complex (50 U/ml) were injected at a flow rate of 30 µl/min over the immobilized-TRAIL for 2 min association. *B.* Recombinant Factor VIII bound to TRAIL does not interfere the binding of TRAIL to immobilized-OPG. 50 U/ml of recombinant Factor VIII was preincubated with TRAIL for 2 hours at room temperature. The complex formed was then injected to immobilized-OPG. *C.* FVIII/vWF complex inhibits the binding of OPG to TRAIL. FVIII/vWF complex was incubated with OPG for 2 hours at room temperature; the new complex formed was then injected at a flow rate of 30 µl/min for 2 min over immobilized-TRAIL. *D.* Schematic representation of plasmon resonance experiments a, b, and c summarized respectively Figure 4A, 4B and 4C.



Figure 5: FVIII/vWF complex blocks the inhibitory effect of OPG on TRAIL-induced apoptosis on MG63 cells

Figure 5: FVIII/vWF complex blocks the inhibitory effect of OPG on TRAIL-induced apoptosis on MG63 cells. A. Osteosarcoma cell line MG63 was cultured with 100 ng/ml TRAIL +/- 100 ng/ml OPG +/- 1 U/ml of FVIII/vWF complex. After 72 hours of culture, cell viability was determined by XTT assay. Results were expressed as percentage of control. Experiments were performed at least three times (* p<0.05). *B.* Nuclear morphological changes induced by TRAIL, OPG and FVIII/vWF complex were analyzed by Hoechst staining on MG63 cells. *C.* Caspase-3 activity was assessed on MG63 cells after 16 hours of treatment with TRAIL, OPG and FVIII/vWF complex (* p<0.05, ** p<0.01).

Figure 6: Schematic representation describing the involvement of FVIII/vWF complex in coagulation cascade, bone and cancer biology



Figure 6: Schematic representation describing the involvement of FVIII/vWF complex in coagulation cascade, bone and cancer biology. FVIII/vWF complex is one of the main complex involved in coagulation: FVIII is released from vWF by the action of thrombin and becomes a co-factor for Factor IX to stimulate coagulation cascade, while vWF is essential in platelet activation. FVIII/vWF complex plays also a major role in other biological processes. Indeed, this complex inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis, by binding to RANKL and also by increasing the anti-osteoclastic activity of OPG. Furthermore, FVIII/vWF complex may be involved in cell apoptosis (endothelial, bone and cancer cells): through its binding to OPG, the FVIII/vWF complex inhibits the OPG protective effect on TRAIL-induced apoptosis which occurs in inflammation and cancer disorders.

Supplementary data



OPG binds to immobilized-vWF chip in contrast to RANKL Experimental conditions: OPG (4nM), RANKL (10nM), pH 6.5. OPG was incubated with RANKL for 2 hours prior to the injection.

III. Discussion

Le système vasculaire joue un rôle primordial dans la biologie osseuse. Il apporte les nutriments, l'oxygène, des facteurs de croissance essentiels au maintien de l'équilibre osseux assuré par les activités de l'ostéoclaste et de l'ostéoblaste, et il permet également le bon déroulement des processus d'ossification et de cicatrisation. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la fonction que le complexe FVIII/FvW, composé de deux facteurs de coagulation, pouvait potentiellement remplir au sein du tissu osseux. Nous nous sommes basés sur deux précédents travaux qui ont montré et caractérisé la liaison entre le FvW et l'OPG (Shahbazi et *al.*, 2007 ; Zannettino et *al.*, 2005) dans les cellules endothéliales. Or, dans la circulation sanguine, le FvW se lie au FVIII afin de le protéger des protéases. Ainsi, ce complexe FVIII/FvW pourrait réguler l'activité de l'OPG dans la circulation sanguine et participer au contrôle du remodelage osseux.

Dans un premier temps, nous avons observé dans deux modèles (RAW 264.7 et monocytes humains CD14⁺) une inhibiton significative du complexe FVIII/FvW sur l'ostéoclastogenèse induite par RANKL. C'est le premier rapport qui fait état de l'implication directe du complexe FVIII/FvW dans un processus osseux. De plus, nous avons constaté que le complexe FVIII/FvW renforçait l'activité inhibitrice de l'OPG sur l'ostéoclastogenèse. Pour comprendre les mécanismes impliqués, nous avons étudié, par résonance plasmonique de surface, les interactions moléculaires entre les trois protagonistes. Le complexe FVIII/FvW est capable de se lier à RANKL et à l'OPG, alors que le FVIII recombinant seul ne se lie à aucune de ces protéines. Nous supposons donc que l'interaction se réalise par la partie FvW du complexe comme le suggèrent les travaux de Shahbazi (Shahbazi et al., 2007). Nous avons confirmé que la liaison entre l'OPG et le FvW peut se faire dans des conditions de pH acide (pH = 6,5) et de salinité particulière. En revanche, même dans ces conditions, RANKL ne peut se lier au FvW. Il semble donc que la structure tridimensionnelle du complexe FVIII/FvW soit requise pour se fixer à RANKL et ainsi inhiber l'ostéoclastogenèse. De plus, le renforcement de l'inhibition par l'OPG, en présence de complexe FVIII/FvW, s'explique par une augmentation de fixation du couple [complexe FVIII/FvW - OPG] à RANKL. La modélisation moléculaire des interactions entre le complexe FVIII/FvW, l'OPG et RANKL a permis de localiser les différents sites de fixation (proches mais distincts) et de confirmer la formation potentielle du complexe ternaire [complexe FVIII/FvW – RANKL - OPG].

Si le complexe FVIII/FvW est capable de moduler les activités de RANKL et d'OPG, il apparaît, en revanche, que ceux-ci n'ont pas d'effet sur les activités biologiques du complexe

65

FVIII/FvW. Les différents paramètres de la coagulation (hémostase primaire, temps de Quick, temps de céphaline activée) ne sont pas modifiés lorsque l'OPG ou RANKL sont ajoutés aux prélèvements sanguins. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que ni RANKL ni l'OPG ne se lient au FVIII et au FvW dans des conditions de pH sanguin. Ces hypothèses sont appuyées par certaines données de résonance plasmonique de surface. D'une part, le FVIII ne se lie ni à l'OPG, ni à RANKL dans des conditions de pH physiologique (pH = 7,4). D'autre part, l'OPG ne se lie au FvW que dans des conditions de pH acide (pH = 6,5) alors que RANKL ne se fixe pas au FvW quelque soit les conditions de pH (pH = 6,5 ou 7,4, données non montrées).

En complément de ce travail, nous avons recherché l'incidence de la formation du couple RANKL / complexe FVIII/FvW sur la liaison RANK / RANKL. L'étude des interactions montre que le complexe FVIII/FvW seul est capable de se lier à RANK. De plus, le couple [RANKL / complexe FVIII/FvW], une fois formé, est toujours capable de se fixer au récepteur RANK (figure 26).



<u>Figure 26</u>: RANKL (2 ng/ml) et le complexe FVIII/FvW (30 UI/ml) se fixent au récepteur RANK dans un tampon de pH = 7,4. Le complexe FVIII/FvW pré-incubé pendant 2 heures avec RANKL renforce la liaison au récepteur RANK.

Cependant, ces données ne nous informent pas sur le maintien de la signalisation RANK/RANKL lorsque le couple [RANKL/complexe FVIII/FvW] est lié à RANK. Nous pouvons supposer que la liaison de ce couple sur le récepteur membranaire RANK masque le domaine de transmission du signal ou empêche la trimérisation du récepteur RANK requise pour son activité (Kanazawa et Kudo, 2005). Une diminution de signalisation, même partielle, des voies classiquement activées par RANKL (MAPkinases, PI3kinase et NF-kB) pourrait expliquer l'inhibition de l'ostéoclastogenèse. Nous pouvons également envisager d'identifier les sites de liaison du complexe FVIII/FvW au récepteur RANK, soit par modélisation moléculaire, soit par l'étude de mutants.

L'ensemble de ces résultats *in vitro* doit être confirmé par des études *in vivo*. Les expériences de différenciation ostéoclastique et de résonance plasmonique de surface ont toutes été effectuées dans des conditions de pH physiologique (pH = 7,4). Cependant nous n'avons pour l'instant aucune donnée qui nous permette d'affirmer que le complexe FVIII/FvW circulant se lie à RANKL et à l'OPG dans le sang. Nous supposons que ces interactions sont tout à fait envisageables dans le plasma (pH équivalent). Le complexe FVIII/FvW pourrait agir alors comme un régulateur des concentrations d'OPG et de RANKL circulants. Il pourrait contrôler l'activité de l'OPG et de RANKL dans d'autres processus que l'ostéoclastogenèse, tels que l'angiogenèse, l'immunité ou l'adhérence cellulaire.

L'activité que nous décrivons sur l'ostéoclastogenèse implique que le complexe FVIII/FvW doive se trouver en relation étroite avec le site de résorption. La riche vascularisation du tissu osseux laisse supposer qu'une telle colocalisation est concevable. De plus, des travaux menés sur la circualtion osseuse décrivent que le remodelage osseux se fait dans des compartiments où des vaisseaux sanguins sont présents. Ce compartiment est appelé BRC (Bone Remodeling Compartment) (Eriksen et al., 2007). Les vaisseaux se trouvent en relation directe avec les cellules osseuses. Nous pouvons supposer que les molécules circulants dans les vaisseaux sont donc capables d'agir sur la biologie des ostéoblastes et des ostéoclastes. Des études immunohistochimiques permettraient de mettre en évidence la colocalisation du complexe FVIII/FvW avec les molécules de l'environnement osseux (OPG et RANKL).

Ces premières preuves *in vitro* de l'implication du complexe FVIII/FvW dans le contrôle de l'ostéoclastogenèse viennent compléter le réseau d'intéractions moléculaires entre le tissu osseux et le système vasculaire. En efffet, d'autres molécules du système vasculaire ont montré des effets sur la différenciation ostéoclastique. Parmi celles-ci, le facteur de croissance VEGF peut remplacer le M-CSF (Niida et *al.*, 1999) dans des souris déficientes pour le M-CSF. Les précurseurs ostéoclastiques expriment à leur surface les récepteurs du VEGF (Tombran-Tink et Barnstable, 2004) qui stimulent (en présence de VEGF) l'expression de RANK dans les ostéoclastes de rat (Yao et *al.*, 2006). L'endothéline, neuropeptide

vasoconstricteur produit par l'endothélium, inhibe la résorption osseuse par un effet direct sur la mobilité cellulaire des précurseurs (Alam et *al.*, 1992). De nombreuses études ont mis en évidence les relations structurales et fonctionnelles entre les précurseurs ostéoclastiques et les cellules de l'environnement vasculaire. Sous l'action du TGF β , les cellules endothéliales issues de l'os expriment RANKL pour induire la différenciation ostéoclastique (Ishida et *al.*, 2002). Ces mêmes cellules endothéliales dans des conditions inflammatoires (stimulation TNF α ou IL-1) permettent le recrutement de précurseurs du sang capables de se différencier en ostéoclastes (Kindle et *al.*, 2006). Nos travaux décrivent une nouvelle relation entres les cellules endothéliales et les ostéoclastes. Le complexe FVIII/FvW, dont l'un des éléments constitutifs est synthétisé par les cellules endothéliales, contrôle la différenciation ostéoclastique de manières directe (*via* la liaison à RANKL) ou indirecte (renforcement de l'activité de l'OPG).

Le rôle du complexe FVIII/FvW dans l'ostéoclastogenèse pourrait expliquer l'effet bénéfique sur le tissu osseux de la prophylaxie chez les patients hémophiles. Ces patients présentent généralement une diminution de la densité osseuse liée principalement à des hémarthroses et à un manque d'activité physique. Cependant, une très récente étude clinique souligne qu'un traitement précoce et à long terme de jeunes patients hémophiles protège de la perte osseuse (Khawaji et *al.*, 2009). Les auteurs n'ont pourtant pas observé de différence significative dans la perte de masse osseuse chez des patients présentant des hémophilies modérées ou sévères. Il n'existe pas non plus de corrélation entre la perte osseuse et l'activité physique pratiquée par les patients. Il semble donc qu'un traitement précoce de l'hémophilie améliore le statut osseux des patients hémophiles. L'effet direct du complexe FVIII/FvW sur l'ostéoclastogenèse pourrait constituer un des mécanismes de prévention de ces pertes osseuses.

Dans la seconde partie de cette étude, nous avons recherché les effets du complexe FVIII/FvW sur l'interaction entre l'OPG et TRAIL. Des études de résonance plasmonique de surface ont permis de mettre en évidence que TRAIL est capable de se lier au complexe FVIII/FvW et au FVIII recombinant (contrairement à RANKL et à l'OPG). De plus, comme l'OPG, TRAIL peut se fixer au FvW mais dans des conditions de pH particulières. Cependant, l'association de TRAIL à ces facteurs de coagulation n'a aucune incidence sur les paramètres de l'hémostase. Le résultat le plus intéressant des études d'interactions, est l'inhibition de liaison entre l'OPG et TRAIL lorsque le couple [OPG - complexe FVIII/FvW]

est préalablement formé. Ces résultats laissaient supposer que l'OPG n'était plus capable de contrer les effets biologiques de TRAIL.

Nous avons par conséquent évalué l'impact de ce résultat avec un test de viabilité de cellules tumorales sensibles à TRAIL (2 lignées d'ostéosarcome et une lignée de sarcome d'Ewing). Dans ce test biologique, le complexe FVIII/FvW, qui est sans effet sur la mort cellulaire, empêche l'OPG de contrer la mort induite par TRAIL. La détection de l'activité caspase 3 confirme que la diminution de viabilité cellulaire est due au phénomène d'apoptose. Ces résultats suggèrent que le complexe FVIII/FvW possède des propriétés anti-tumorales. Ces propriétés ne sont possibles que si le complexe FVIII/FvW est en contact étroit avec les cellules cancéreuses et l'environnement moléculaire de la tumeur (OPG, TRAIL). Cette localisation proche est tout à fait envisageable dans les tumeurs. La vascularisation est très développée dans les lésions cancéreuses. Elle est entretenue par une angiogenèse intense qui permet l'apport de nutriments nécessaires à la survie et à la prolifération des cellules tumorales. L'inhibition de l'angiogenèse est à ce titre une des thérapies envisagées dans la lutte contre les cancers. Le VEGF est une des cibles retenues : l'anticorps humanisé Bevacizumab (Avastin®) a prouvé depuis près de 10 ans son activité dans plusieurs types de tumeurs solides notamment celles de la prostate, du sein, du rein et du côlon dans leurs formes métastatiques (Aragon-Ching et Dahut, 2008 ; Rini, 2009 ; Traina, 2009). Les vaisseaux tumoraux sont très différents des vaisseaux normaux. Ils sont désorganisés sans réelle délimitation, et beaucoup plus perméables que les vaisseaux sains (Cao, 2009). Ils sont sujets à des ruptures de la paroi endothéliale ce qui provoque des hémorragies au sein même de la tumeur avec formation de lacunes vasculaires (cas des sarcomes). Dans ces conditions, le complexe FVIII/FvW pourrait se trouver en relation directe avec les cellules tumorales et contrôler leur survie par son interaction avec l'OPG.

L'implication de la cascade de coagulation dans la progression tumorale est maintenant bien connue. Le facteur tissulaire est fortement exprimé dans des pathologies malignes (cancers colorectaux, mammaires, hépatiques, ovariens) (Dogan et Demirkazik, 2005). Dans des métastases de patients atteints d'ostéosarcomes, l'expression du gène codant pour le FvW est augmentée (Eppert et *al.*, 2005). Une élévation du taux sérique de FVIII est un marqueur précoce d'hypercoagulabilité chez les les patients atteints de cancers (Dogan et Demirkazik, 2005). Nos observations pourraient donner un sens biologique à l'augmentation du FVIII et du FvW dans les pathologies tumorales. L'organisme pourrait produire ces facteurs pour former le complexe FVIII/FvW et faciliter l'activité anti-tumorale (en bloquant l'association OPG / TRAIL).

PARTIE II:

GLYCOSAMINOGLYCANES ET

OSTEOCLASTOGENESE

I. Introduction

Nous avons vu précédemment le contrôle de la différenciation ostéoclastique par un complexe impliqué dans la biologie vasculaire. Nous aborderons dans cette partie la régulation de l'ostéoclastogenèse par l'héparine qui intervient dans la régulation finale de la coagulation. Cette étude se généralisera aux glycosaminoglycanes dont l'héparine est le représentant le plus sulfaté.

1. L'héparine : découverte, structure, fonction et effets sur l'os

La découverte de l'héparine remonte au début du siècle dernier par Jay McLean et William Henry Howell. Le terme héparine provient du grec "hepar" qui signifie foie, puisque c'est dans cet organe que l'héparine a été pour la première fois isolée. C'est l'une des plus anciennes thérapeutiques dont l'utilisation est toujours largement répandue.

L'héparine est un polymère saccharidique de poids moléculaire compris entre 3 kDa et 50 kDa avec une moyenne de 14 kDa. La structure de l'héparine, comme celle des glycosaminoglycanes en général, réside dans la répétition d'une sous-unité disaccharidique. Pour l'héparine, la sous-unité la plus commune est composée d'un acide iduronique 20-sulfaté et d'une glucosamine N- et 60-sulfatée (figure 27).



L'héparine est stockée dans les granules des mastocytes qui bordent les vaisseaux sanguins. Elle est sécrétée lors de lésion du tissu vasculaire. Son principal rôle est l'inhibition de la coagulation. L'activité antithrombotique de l'héparine réside dans son interaction avec l'antithrombine (AT III). L'héparine se lie à l'AT III par un motif pentasaccharidique qui induit un changement conformationnel de l'AT III ce qui renforce son activité antithrombotique. Le complexe AT III - Héparine se lie au facteur X pour l'inactiver (figure 28). L'héparine contrôle également la coagulation en inactivant la thrombine. Il se forme un

complexe entre l'héparine, l'AT III et la thrombine. Une séquence de 18 saccharides est requise pour la formation de ce complexe (figure 28).



<u>Figure 28</u> : Interactions entre l'héparine, l'antithrombine, la thrombine et le facteur X de coagulation.

L'héparine est couramment employée en médecine humaine pour ses propriétés anticoagulantes. Elle est administrée par voie parentérale en injection intraveineuse ou souscutanée. Les injections intramusculaires sont évitées en raison de la formation d'hématomes au point d'administration. La demi-vie de l'héparine est relativement faible, de l'ordre de 1 à 2 heures, c'est pourquoi elle doit être administrée fréquemment ou sous forme de perfusion. Toutefois, l'utilisation des héparines de bas poids moléculaire permet de pallier ce problème. Ces héparines se fixent moins aux protéines plasmatiques et ont par conséquent une demi-vie plus importante, qui ne nécessite qu'une seule administration quotidienne. L'héparine est indiquée dans la phase aigüe des thromboses veineuses profondes, des embolies pulmonaires et des infarctus du myocarde. Elle est également indiquée en prévention de la coagulation dans les circuits de circulation extra-corporelle (Theriaque, 2009).

Le principal risque lié à un traitement à l'héparine est le risque hémorragique, surtout en cas de surdosage. De plus, l'héparine et les héparines de bas poids moléculaire sont susceptibles d'engendrer une thrombocytopénie. Elle intervient généralement au 10^{ème} jour de traitement. L'administration d'héparine engendre une réaction immunologique avec

production d'anticorps dirigés contre les plaquettes (Theriaque, 2009). Deux autres effets indésirables majeurs sont également décrits : des atteintes hépatiques s'accompagnant d'une augmentation des transaminases et des troubles de la kaliémie. Enfin, plusieurs rapports font état de la survenue d'une ostéoporose à la suite d'une administration prolongée d'héparine non fractionnée ou d'héparines de bas poids moléculaire (Barbour et *al.*, 1994 ; Dahlman et *al.*, 1994 ; Douketis et *al.*, 1996). Ces traitements au long cours sont indiqués chez des patients présentant un risque thrombotique élevé (porteurs de valve cardiaque, femmes enceintes). Environ 1/3 des patients recevant un traitement prolongé d'héparine présente une diminution de densité osseuse (Rajgopal et *al.*, 2008). Ces données cliniques ont été confirmées par des études chez l'animal. Muir et coll. ont montré que l'administration prolongée d'héparine non fractionnée ou d'héparines de bas poids moléculaire chez des rats provoque une perte osseuse (diminution du nombre d'ostéoblastes et augmentation du nombre d'ostéoclastes) (Muir et *al.*, 1996). Il a été également rapporté que l'héparine s'accumulait dans l'os, ce qui donne une explication à son effet persistant même après l'arrêt du traitement (Shaughnessy et *al.*, 1999).

De nombreuses équipes ont étudié les effets de l'héparine dans l'ostéoclastogenèse. Les résultats de leurs travaux sont relativement contradictoires. Ainsi, dès 1991, Fuller et coll. montrent que l'héparine augmente l'activité pro-résorptive des ostéoclastes (Fuller et al., 1991). Les auteurs suggèrent que l'héparine accroît l'activité d'un facteur impliqué dans la régulation de l'ostéoclastogenèse. En 2002, Walton et coll. ont rapporté l'effet synergique de l'héparine dans la différenciation ostéoclastique induite par l'IL-11 dans un modèle de moelle osseuse murine (Walton et al., 2002). De plus récents travaux ont montré que l'héparine et les héparines fractionnées présentaient des activités différentes selon le modèle d'étude (Folwarczna et al., 2005). Des doses faibles d'héparine stimulent l'ostéoclastogenèse dans des cellules de moelle osseuse de rat alors qu'elles l'inhibent à plus forte dose. Dans un modèle de cellules de moelle osseuse de souris, les héparines diminuent le nombre d'ostéoclastes générés à l'exception de l'héparine non fractionnée à la plus faible dose (Folwarczna et al., 2005). Irie et coll. ont montré que l'héparine augmente la différenciation ostéoclastique dans un modèle de moelle osseuse de souris en co-culture avec des ostéoblastes murins (Irie et al., 2007). Leurs travaux suggèrent que l'héparine inhibe l'activité de l'OPG et prévient par conséquent la liaison de l'OPG à RANKL. Cette interaction entre l'héparine et l'OPG (par son domaine de liaison à l'héparine) avait été mise en évidence par notre équipe (Theoleyre et al., 2006). Ces résultats sont en complet désaccord avec ceux de Ariyoshi et coll. (Ariyoshi et al., 2008) qui démontrent que l'héparine inhibe la différenciation ostéoclastique dans le modèle RAW 264.7. Cette inhibition serait le résultat de l'interaction directe entre l'héparine et RANKL (Ariyoshi et *al.*, 2008). Il apparaît donc que l'effet de l'héparine sur l'ostéoclaste diverge selon les auteurs.

2. Les autres membres de la famille des glycosaminoglycanes

Différentes familles peuvent être distinguées au sein des glycosaminoglycanes (GAGs). L'héparine, que nous venons d'évoquer, appartient aux héparanes sulfates. Dans ce groupe figure l'héparane sulfate qui présente les mêmes résidus osidiques que l'héparine mais dont le pourcentage de sulfatation ne dépasse pas les 50 % (contre plus de 80 % pour l'héparine). Quatre autres membres viennent compléter les GAGS : l'acide hyaluronique, le kératane sulfate, le dermatane sulfate (DS) et la chondroïtine sulfate (CS). Ils diffèrent par leur composition en sous-unités disaccharidiques et par leur degré de sulfatation (tableau III).

<u>Tableau III</u> : Composition en sous-unités disaccharidiques des différentes familles de glycosaminoglycanes (d'après Lamoureux et *al.*, 2007a).



Les GAGs sont des molécules que l'on retrouve dans tous les types de tissus. Ils sont localisés à la surface des cellules et dans la matrice extracellulaire mais ils sont, en général, liés à des protéines pour former les protéoglycanes (PGs) (Lamoureux et *al.*, 2007a). Les GAGs sont capables de se lier à des protéines telles que des chémokines (CXCL4), des facteurs de croissance (FGF) ou des molécules d'adhérence (fibronectine) et contrôlent, par conséquent, des processus biologiques ou pathologiques tels que l'angiogenèse, la migration cellulaire ou la croissance tumorale (Gandhi et Mancera, 2008). Leur intervention dans le métabolisme osseux a également était rapportée, notamment dans la différenciation ostéoclastique.

L'effet de l'acide hyaluronique sur l'ostéoclastogenèse diffère selon les auteurs. Chang et coll. évoquent une inhibition de la différenciation *via* le toll like receptor 4 dans trois modèles d'ostéoclastogenèse (Chang et *al.*, 2007). Pourtant peu de temps auparavant, c'est l'effet inverse qui a été décrit. L'acide hyaluronique favoriserait la différenciation ostéoclastique en se liant à son récepteur CD44 (Ariyoshi et *al.*, 2005). L'acide hyaluronique est également capable d'augmenter l'expression de RANKL dans les cellules stromales de moelle osseuse, ce qui a pour conséquence directe une régulation positive de l'ostéoclastogenèse (Cao et *al.*, 2005). Enfin, une dernière étude vient de montrer que l'acide hyaluronique inhibe la résorption osseuse en supprimant l'expression de PGE2 dans les ostéoblastes traités par l'IL-1 (Hirata et *al.*, 2009).

Les autres familles de GAGs ont également été étudiées. Le DS inhibe l'ostéoclastogenèse en se liant directement à RANKL (Shinmyouzu et *al.*, 2007) à des doses fortes uniquement. La CS ne semble pas avoir d'effet selon les travaux de Irie (Irie et *al.*, 2007) alors qu'elle favoriserait le remodelage osseux lorsqu'elle est déposée sur des matériaux de comblement osseux (Schneiders et *al.*, 2008 ; Schneiders et *al.*, 2009).

L'ensemble de ces travaux met en évidence le contexte particulier et contradictoire des effets des GAGs sur l'ostéoclastogenèse. De plus, ces GAGs exercent d'autres fonctions sur le tissu osseux lorsqu'ils sont sous forme de protéoglycanes.

3. Les protéoglycanes et leurs effets dans la biologie osseuse

Les protéoglycanes (PGs) sont une famille ubiquitaire de molécules composées d'un corps protéique et d'une ou plusieurs chaînes de glycosaminoglycanes sulfatés. Les GAGs sont reliés à la protéine au niveau d'une sérine par l'intermédiaire d'une liaison O-glycosidique. L'ensemble des GAGs, excepté l'acide hyaluronique, peut entrer dans la composition des PGs. La partie protéique des PGs est d'une grande diversité dans sa nature et dans sa taille (de 10 kDa à plus de 5000 kDa) ce qui confère aux différentes familles de PGs des fonctions spécifiques, telles que la migration neurale, l'adhérence cellulaire ou l'angiogenèse (Lamoureux et *al.*, 2007a, article en annexe). Les PGs, exprimés dans presque tous les types de tissus, sont localisés dans le compartiment intracellulaire, à la surface membranaire ou dans la matrice organique du tissu osseux : ils représentent environ 5% des protéines non-collagéniques (Leaver et *al.*, 1975). Les principaux PGs du tissu osseux sont les heparane sulfates PGs (HSPGs), l'aggreccan et les small leucine reach proteoglycans (SLRPs).

Les SLRPs, dont la décorine, le biglycan et la fibromoduline, sont les PGs les plus abondants dans la matrice osseuse (Waddington et *al.*, 2003). La décorine et le biglycan sont principalement substitués par la CS et le DS. Ils jouent un rôle important dans la formation du tissu osseux comme le suggèrent des études de délétion génique chez la souris. Des souris déficientes en biglycan présentent une diminution de la formation osseuse par un défaut de quantité et d'activité des ostéoblastes (Xu et *al.*, 1998). Le biglycan et la décorine interviennent également dans la régulation de l'activité d'effecteurs du remodelage osseux. Théoleyre et coll. ont montré que le DS et la CS possèdent une forte affinité pour l'OPG, leurs travaux évoquent un rôle potentiel des SLRPs dans la biodisponibilité de l'OPG et de ce fait dans la biologie osseuse (Theoleyre et *al.*, 2006). Comme l'OPG, la biodisponibilité du TGF β est également contrôlée par la décorine et le biglycan (Bi et *al.*, 2005 ; Bi et *al.*, 2006). Ces observations montrent que les SLRPs, grâce à leurs chaîne saccharidiques (CS et DS), sont essentiels dans le remodelage osseux en modulant la prolifération et la différenciation des cellules osseuses.

Les HSPGs sont également présents dans le tissu osseux, localisés dans la matrice extracellulaire ou associés à la membrane cellulaire des ostéoblastes et des ostéoclastes (Nakamura et Ozawa, 1994). Tout comme les SLRPs, les HSPGs fixent de nombreuses

molécules telles que les FGFs, le VEGF et le TGF et en modulent l'activité (Bernfield et *al.*, 1999 ; Park et *al.*, 2000). Ces propriétés sont dues aux chaînes saccharidiques (heparane sulfate et heparin) chargées négativement. Les HSPGs modulent également l'activité de l'OPG comme le font les SLRPs. Standal et coll. ont montré que les cellules de myélome internalisent et dégradent l'OPG par l'intermédiaire du syndécan-1 (Standal et *al.*, 2002). Cette observation est soutenue par les travaux de Mosheimer dans lesquels l'OPG induit le chimiotactisme des monocytes *via* le syndécan-1 (Mosheimer et *al.*, 2005). Le syndecan-1 participe donc à la biodisponibiltié et à l'activité de l'OPG, ce qui évoque son rôle dans le remodelage osseux. Une étude montre l'implication directe des HSPGs dans la différenciation ostéoclastique : le FGF-2 en se liant aux HSPGs de fibroblastes synoviaux provoque l'expression de RANKL et provoque la maturation des ostéoclastes (Nakano et *al.*, 2004). Le perlécan, un HS/CSPG péricellulaire, joue également un rôle dans la biologie osseuse. L'étude histologique de souris perlécan -/- révèle une désorganisation de la plaque de croissance et une ossification endochondrale perturbée conduisant à des os de petites tailles (Arikawa-Hirasawa et *al.*, 1999 ; Costell et *al.*, 1999).

II. Article 2

Les glycosaminoglycanes inhibent l'ostéoclastogenèse induite par RANKL

L'os est un tissu conjonctif composé de cellules et d'une matrice extracellulaire minéralisée. La biologie osseuse repose sur l'équilibre des activités de formation assurées par les ostéoblastes et les activités de résorption réalisées par les ostéoclastes. Cette balance entre les fonctions de ces deux types cellulaires est contrôlée par un grand nombre de cytokines et de facteurs de croissance. Ces effecteurs osseux se situent dans le micro-environnement liés ou non aux PGs (ou aux GAGs). L'influence des GAGs sur la biologie osseuse a fait l'objet de nombreuses publications cependant les données qui émergent de ces travaux sont contradictoires. C'est dans ce contexte particulier que le but de notre étude était de clarifier les effets des GAGs sur l'ostéoclastogenèse.

Ces travaux nous ont permis de montrer que :

- l'héparine inhibe la différenciation ostéoclastique induite par RANKL,

- le degré de sulfatation et la longueur des chaînes hépariniques ont une influence sur leur activité,

- d'autres classes de GAGs sont capables comme l'héparine d'inhiber la différenciation ostéoclastique.

Glycosaminoglycans inhibit RANKL-induced osteoclastogenesis

Marc BAUD'HUIN^{1,2}, Carmen RUIZ-VELASCO^{1,2}, Gaëtan JEGO³, Céline CHARRIER^{1,2}, Nijole GASIUNAS⁴, John GALLAGHER⁴, Mike MAILLASSON⁵, Françoise REDINI^{1,2}, Laurence DUPLOMB^{1,2,6} and Dominique HEYMANN^{1,2,6}

¹ INSERM, UMR-S 957, Nantes, F-44035 France ; ² Université de Nantes, Nantes atlantique universités, Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, EA3822, Nantes, F-44035, France ; ³ INSERM U892, Nantes, F-44093 France ; ⁴ Paterson Institute for Cancer Research, University of Manchester, England M20 4BX ; ⁵ INSERM U892 and IFR26- Ouest genopole, F-44035 France ; ⁶CHU, Hôtel Dieu, Nantes, France

Running title: glycosaminoglycans and osteoclastogenesis

Correspondence and reprint request to : Dr. D. HEYMANN, dominique.heymann@univnantes.fr ; INSERM UMR-S 957, Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives,1 rue Gaston Veil 44035 Nantes Cedex 1 Fax: (011) 33 2 40 41 28 60

Key Words: osteoclasts, oligosaccharides, RANKL, adhesion

Disclosure Statement: The authors have nothing to disclose

Glycosaminoglycans (GAGs) are component of the bone matrix and thus participate to the bone metabolism. However data on bone resorption are rare and controversial. We thus studied role of glycosaminoglycans the on different models of RANKL-induced osteoclastogenesis (mouse RAW 264.7 cell line, mouse CD11b⁺ cells, and human CD14⁺ monocytes). We first showed that heparin inhibited osteoclastogenesis in these 3 models, which was confirmed by a decrease in mRNA expression of osteoclastic markers and by an inhibition of the bone resorption capacity. We also demonstrated on the mouse model RAW 264.7 cells that glycosaminoglycans from different families were also able to **RANKL-induced** inhibit osteoclastogenesis, and we showed that this inhibition was dependent on the length of the GAGs and their level of sulfation. Furthermore, this effect of GAGs was specific of osteoclastogenesis as the differentiation in dendritic cells was not affected by GAGs. In a second part of the manuscript, we tried to decipher the mechanisms of action of heparin on human CD14⁺ cells. We showed that heparin acts at 2 distinct steps of osteoclastogenesis. Indeed, heparin first strongly decreases the adherence of osteoclast precursors, and secondly inhibits osteoclasts to spread and to be active. Furthermore, the second action of heparin was reversible as the removal of heparin at the end of the culture allowed the condensed cells to spread out and showed morphological osteoclasts. The present work clearly evidences that GAGs inhibit osteoclastogenesis in vitro and strengthen the therapeutic interest of defined GAGs for osteolytic diseases.

Introduction

Bone metabolism is regulated by a functional balance between catabolic and anabolic activities of bone cells. Thus, multinucleated cells osteoclasts are specialized in bone catabolism and participate to phosphocalcic homeostasis together with cells playing anabolic functions and named osteoblasts.

Osteoclasts originate from monocyte/macrophage lineage through a series of events associating membranous. soluble and extracellular matrix compounds (1). Among these factors, some of them are required for proliferation and differentiation of osteoclast progenitors such as macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) (2-4) and others factor such as receptor activator of nulear factor kB ligand (RANKL) are more specifically involved in the commitment to the osteoclast lineage from the fusion of mononuclear precursors to the formation of multinucleated resorbing osteoclasts (5). In this system, RANKL binds to its receptor RANK expressed at the cell surface of osteoclast precursors and consequently activates specific signal pathways leading to the formation and maturation of the osteoclasts (6, 7). Furthermore, whether M-CSF supports the survival of osteoclast precursors, RANKL exerts similar activity osteoclasts. mature The on RANKL/RANK activities are completed by the function of osteoprotegerin (OPG) which acts as a soluble decoy receptor blocking the binding RANK-RANKL and then osteoclastogenesis and bone resorption (8, 9).

Extracellular matrix components such as glycosaminoglycans (GAGs) also participate to bone metabolism (10). GAGs are linear polymers which are bound to a core protein to form proteoglycans (10). composed of GAGs are repeated disaccharidic units of hexosamine and hexuronic acid, except keratan sulfate in which hexuronic acid is replaced by galactose. According to the epimerization hexosamine hexuronic of and acid. GAGs can different groups of be established. Proteoglycans and GAGs contribute to the maintenance of bone mass through their participation to collagen organization (11). They could exert several activities on bone cells because they serve as co-factors in cell-to-cell adhesion or modulate the binding and activation of cellular growth factors and cytokines (12)

such as TGF- β by decorin (13), b-FGF by heparin (14) and OPG by syndecan-1 (15-17). Unfortunately, the data available on the effects of GAGs on osteoclastogenesis are very limited and very controversial. Indeed, Ariyoshi et al. showed that hyaluronic acid, the most abundant GAG in mammalian tissues, enhances osteoclast formation and function (18). In 2007, Chang et al. described exactly an opposite effect on osteoclastogenis and revealed the implication of Toll-like receptor 4 in the inhibitory effect of hyaluronic acid (19). Irie et al. recently demonstrated that combination heparin in with 1,25(OH)2D3/PGE2 enhanced the pitforming activity of osteoclasts obtained from the coculture of mouse osteoblasts and bone marrow cells (20). They did not observe any direct effect of heparin on osteoclastogenesis. On the other hand, Shinmyouzu et al., demonstrated that high of concentrations dermatan sulfate inhibited osteoclastogenesis (21) and the same group showed similar activities of heparin (22). In these studies they proposed that the mechanisms involved in the inhibition of osteoclastogenesis is through an inhibition of RANKL signaling (inhibition of p38 and ERK phosphorylations upon RANKL stimulation). Thus, these 2 studies are in opposition concerning the effect of GAGs on osteoclastogenesis. The controversial effect of GAGs on osteoclastogenesis is strengthened by the report of Folwarczna et al. (23) who pointed out species differences in the sensitivity of bone marrow cells to standard heparin and lowmolecular weight heparins. For instance; in rat model, low concentrations of heparins increased the formation of osteoclasts, whereas at the highest concentrations they decreased the number of osteoclasts. In the mouse bone marrow cell culture, the heparins suppressed the formation of osteoclasts, with the exception of standard heparin at low concentrations which intensified the process (23).

In this very controversial context, the aim of our study was to clarify the effect of GAGs on osteoclastogenesis using three different models of osteoclastogenesis: murine RAW 264.7 cell line, murine purified CD11b monocytes and human purified CD14⁺ monocytes. These models are characterized by the absence of osteoblastic/stromal cells. allowing investigating the direct effect of GAGs on osteoclast precursors. Various GAGs (bovine and porcine heparin with various sulfation levels, heparan-, chondroitin- and dermatan-sulfate, hyaluronic acid and oligosaccharides) have been assessed in the in vitro osteoclastogenesis models. We found that all GAGs inhibited RANKLinduced osteoclastogenesis in murine and human models, and then demonstrated that heparin induced an inhibition of the sprawl of the osteoclasts.

Materials and methods

Materials

Human M-CSF (hM-CSF) and mouse M-CSF (mM-CSF) were obtained from R&D Systems (Abington, UK). Human RANKL (hRANKL) was kindly provided by Amgen Inc. (Thousand Oaks, USA). Heparin sodium salt, heparan sulfate from bovine kidney (bHS), heparan sulfate from porcine intestinal mucosa (pHS), chondroitin sulfate from shark cartilage (CS), dermatan sulfate from porcine intestinal mucosa (DS) and hyaluronic acid were purchased from Sigma (St Quentin Fallavier, France). Heparin-derived oligosaccharides of defined size were prepared by digestion of porcine mucosal heparin with heparinase I followed by gel filtration chromatography on a Bio-Gel P-10 column (24). Heparin initially contained 97.7% of N-sulfate groups, 89.3% of 2-O-sulfate groups, and 92.4% of 6-O-sulfate groups. De-Nsulfated/re-N-acetylated heparin contained 90.5% of 2-O-sulfate groups, 85.3% of 6-O-sulfates, and a very low amount of remaining N-sulfate groups (2.4%). De-2O-sulfated heparin contained 80.2% of 6-O-sulfate groups, 91.4% of N-sulfate groups, and a residual 2.2% of the 2-Osulfates. De-6-O-sulfated heparin contained 98.2% of N-sulfate groups, 54.7% of 2-O-sulfate groups, and a residual 4.2% of 6-O-sulfates (25).

Osteoclastogenesis assays

Differentiation from the murine RAW 264.7 monocytic cells line.

Murine RAW 264.7 monocytic cells (ATCC, Promochem, Molsheim, France) were cultured in phenol red-free α -Minimal Essential Medium (α -MEM) (Invitrogen, Eragny, France) supplemented with 10 % of fetal calf serum (FCS) (Perbio, Logan, USA), 1 % non essential amino acids (Invitrogen). To induce osteoclast formation, RAW 264.7 cells were scrapped and put back at 37°C for 2 minutes to allow adherence of the more differentiated cells. Non adherent cells were then seeded, 3×10^3 in fresh medium in 96-well plate. After 2 hours, the medium was changed for a fresh one containing 100 ng/ml hRANKL and various forms of different glycosaminoglycans at concentrations (see result section and figure legends). Multinucleated cells (>3 nuclei) were counted under a light microscope (Leica DM IRB, Nanterre, France; Camera: Olympus D70, Analysis Olympus software: DP Controller/Manager, Hamburg, Germany) after TRAP staining (Sigma, Saint Quentin-Fallavier, France)

Differentiation from murine CD11b+ monocytes.

CD11b⁺ monocytes were purified from murine bone marrow cells, obtained by flushing femur and tibiae from 4 weekold C57BL6 male mice. CD11b⁺ cells were magnetically labeled with CD11b Microbeads and positively selected by MACS technology (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). CD11b⁺ cells were seeded in 24-well plates (500 x 10^3 cells / well) in α -MEM without phenol red, containing 10% FCS and 25 ng/ml mM-CSF. After 3 days of culture, medium was changed with fresh medium containing 10% FCS, 25 ng/ml mM-CSF, with or without 100 ng/ml hRANKL, and with or without 125 μ g/ml heparin. Thereafter, medium was changed every 4 days. The formation of osteoclasts occurred around 15 days of culture and was observed by TRAP staining.

Osteoclastogenesis and dendritic cell formation from purified human $CD14^+$ cells

peripheral Human blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by centrifugation over Ficoll gradient (Sigma). $CD14^+$ cells were magnetically labeled with CD14 Microbeads and positively selected by MACS technology. For osteoclast differentiation, CD14⁺ cells were seeded at 250 x 10^3 cells/well in 24well plate or 45×10^3 cells/well in 96-well plate in α -MEM supplemented with 10% FCS and 25 ng/ml hM-CSF. At day 3 of the culture, medium was changed for fresh medium containing 10% FCS, 25 ng/ml hM-CSF and 100 ng/ml hRANKL, with or without heparin (125 μ g/ml). Then medium was changed every 4 days. The formation of osteoclasts occurred around 15 days and was observed by TRAP staining. In some experiments, heparin was added at different time of the culture period, as indicated on the graphs. To test the capacity of osteoclasts to resorb bone, CD14⁺ cells were cultured on dentine the conditions slices in previously described. At the end of the culture, osteoclasts were removed by bleach; dentin slices were fixed with 4% glutaraldehyde in 0.2 M sodium cacodylate solution for 30 minutes, followed by staining with 1% toluidine blue in 0.5% sodium tetraborate solution for 3 minutes. Resorption lacunae were identified by light stereomicroscopy (Zeiss, STEMI 2000-С, Göttingen, Germany).

Adherence of CD14⁺ cells was analyzed by counting the adherent cells

after 3 days of culture in presence of hM-CSF (25 ng/ml) with or without heparin (125 μ g/ml). Briefly, cells were washed 3 times with PBS (Lonza, Verviers, Belgium) and adherent cells were detached with trypsin solution (Lonza), cells were counted using trypan blue exclusion.

differentiation Dendritic was obtained upon 5 ng/ml hIL-4 (Invitrogen) + 100 ng/ml human GM-CSF (kindly provided by UTCG, CHU Nantes) stimulation. Briefly, 1 x 10^6 CD14⁺ cells were cultured in 6-well plate in 3 ml of RPMI 1640 (Lonza) supplemented with 10% FCS, in the presence or the absence of glycosaminoglycans. Medium was replaced after 3 days. After 2 more days of culture, cells were harvested and double stained for 15 min at 4°C with antibodies against CD1a-APC (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) and CD14-PE (Immunotech, Marseille, France) in PBS and then washed and fixed in PBS 1% formaldehyde. Irrelevant isotype-matched antibodies were used to determine levels of nonspecific binding. Flow cvtometrv analysis was carried out on a FACScan using CELLQuest software (both from Becton Dickinson).

Statistical analysis

Each experiment was repeated in triplicate three times independently. The mean \pm SD was calculated for all conditions and compared by ANOVA. Differences relative to a probability of two-tailed p < 0.05 were considered significant.

Results

Glycosaminoglycans inhibit RANKLinduced osteoclastogenesis in murine and human models.

RAW 264.7 cells are murine monocyte/macrophage cells which can differentiate into TRAP-positive multinucleated cells in 5 days upon RANKL stimulation. As shown in figures 1A and 1B, addition of heparin inhibited

83% **RANKL-induced** around osteoclastogenesis (p<0.01). This result was confirmed by the analysis of osteoclastic markers by real-time PCR. Indeed, after 5 days of culture, mRNA expressions of osteoclastic markers such as TRAP and Cathepsin K were strongly increased in the presence of RANKL, whereas their expressions were around 50 % less when cells were cultured in the presence of both RANKL and heparin. confirming the inhibitory effect of heparin on RANKL-induced osteoclastogenesis (Figure 1C). We confirmed this effect in a second of murine model osteoclastogenesis. We used CD11b⁺ purified monocytes and cultured them in presence of RANKL and heparin. As shown in figure 1D, heparin completely inhibited **RANKL**-induced of $CD11b^+$. osteoclastogenesis Same results were obtained in a human model of osteoclastogenesis, using CD14⁺ purified monocytes. As shown in figures 2A and 2B, RANKL stimulation of CD14⁺ cells induced their differentiation in TRAP⁺ multinucleated cells. Again, the addition of heparin strongly inhibited (76%) the RANKL-induced osteoclastogenesis (p<0.01). Furthermore, when cultured on dentine slices, TRAP⁺ osteoclasts showed a strong capacity of resorption (Figure 2C) which was significantly decreased in the presence of heparin.

To investigate the effect of other RANKL-induced GAGs on osteoclastogenesis, we added 5uM of heparan sulfate (bovine and porcine origin), chondroitin sulfate C and dermatan sulfate to the culture of RAW 264.7 cells. After 5 days, all GAGs tested inhibited at 65% RANKL-induced least of the osteoclastogenesis (Figure 3A). GAGs alone had no effect on RAW 264.7 cell line and did not reveal any cell toxicity, any proliferative or apoptotic effect (data not shown).

Furthermore, addition of oligosaccharides (4, 14 and 24) to the culture inhibited RANKL-induced

osteoclastogenesis, in a dose dependent manner as well as in a size dependent manner (Figure 3B). Indeed, 1.56µM of oligosaccharide 4 inhibited 6% of the osteoclastogenesis, whereas at the same concentration, oligosaccharides 14 and 24 inhibited respectively 24% and 53% of the osteoclastogenesis. In the same way, the inhibition of RANKL-induced osteoclastogenesis 12.5µM using of oligosaccharide was around 17% with oligosaccharide 44% 4. with oligosaccharide 14, and 72% with oligosaccharide 100µM, 26. At osteoclastogenesis was almost totally abolished with the 3 sizes of oligosaccharides. These oligosaccharides had no effect on RAW 264.7 cells cultured in medium without RANKL. We then analyzed the effect of hyaluronic acid which is a huge non-sulfated molecule. As shown in figure 3C, hyaluronic acid also inhibited osteoclastogenesis in a dose dependent manner.

Sulfation of oligosaccharides is important for the inhibition of RANKL-induced osteoclastogenesis.

To decipher the inhibition of osteoclastogenesis observed in presence of oligosaccharides and GAGs, we analyzed the importance of sulfation by using different forms of heparin. Indeed, we tested normal heparin, de-N-sulfated re-Nacetvlated heparin, total de-sulfated heparin, de-2-sulfated heparin, de-6sulfated heparin, de-N-sulfated and heparin. As shown in figure 4, RANKLinduced osteoclastogenesis was inhibited by normal heparin (83% of inhibition, p<0.01), by de-N-sulfated re-N-acetylated and de-N-sulfated heparins (around 50% of inhibition), and by de-2O- and de-6Osulafted heparins (around 75% of inhibition. p<0.01). However, the inhibition observed in presence of total desulfated heparin was only 14% (p<0.05). This result demonstrated the importance of sulfation for the inhibition the of osteoclastogenesis by heparin.

GAGs induce differentiation of human monocytes into dendritic cells.

To determine if the inhibitory activity of GAGs was specific of osteoclastogenesis, we then tested the effect of oligosaccharide 16, dermatan sulfate and heparin during the differentiation of human monocytes into dendritic cells. Two different methods of differentiation were used: human isolated monocytes (Figure $CD14^+$ 5A) and monocytes obtained after 2h of adherence of total PBMCs (Figure 5B). As shown in figure 5, oligosaccharide 16, dermatan sulfate and heparin potentiated the effect of GM-CSF / IL-4 cocktail to induce dendritic cells differentiation from both isolated CD14⁺ cells and total PBMCs. For example, using CD14⁺ monocytes, GM-CSF / IL-4 combination induced around 20% of CD14⁻ / CD1a⁺ dendritic cells whereas when oligosaccharide 16 or heparin were added to the culture the differentiation was significantly enhanced by 10 to 20%. Using total PBMCs, the same pattern of differentiation was observed. Indeed, oligosaccharide 16, dermatan sulfate and heparin significantly increased the dendritic cells differentiation with a mean average about 12.5%. These GAGs have no effect alone. Thus the inhibitory effect of GAGs observed on osteoclastogenesis is specific to this pathway as no inhibition has been shown within a different differentiation system such as dendritic differentiation.

Heparin does not bind to RANKL and does not modulate RANKL signaling.

Shinmyouzu *et al.*, demonstrated that dermatan sulfate inhibits RANKLinduced osteoclastogenesis in a mouse bone marrow model of osteoclast differentiation (21). They showed that this inhibition occurred through the binding of dermatan sulfate to RANKL leading to an inhibition of the interaction of RANKL to its receptor RANK and thus to an inhibition of RANKL signaling. Thanks to these observations, they suggested that the same phenomenon should be involved in the inhibition of RANKL-induced osteoclastogenesis that they also observed with heparin or chondroitin sulfate E. However, in our hands, using Plasmon Surface experiments heparin did not bind to RANKL (data not shown). Furthermore, heparin did not inhibit RANKL signaling in RAW 264.7 cells nor in CD14⁺ human monocytes (data not shown).

Heparin inhibits the adherence and the spreading of osteoclast and thus their functionality.

We tested the effect of heparin when added at different times of the culture period. First when heparin was added during the first 3 days of the culture, when only M-CSF was present, we showed that very few osteoclasts were generated (Figure 6A). This can be explained by the fact that the adherence of CD14⁺ cells to the well was affected by the presence of heparin. Indeed, as shown in figure 6B there was around 40% less adherent CD14⁺ cells in presence of M-CSF and heparin than in M-CSF alone. Thus, the fact that fewer cells had adhered to the plastic in this condition explained that less osteoclasts were generated in presence of RANKL. When heparin was added after 10 days of culture, the result in counted osteoclasts was the same that when heparin was present all culture long. Indeed, with these conditions of culture, few osteoclats were counted and many condensed cells were observed. However, when heparin was present only the first 10 days of the culture and then removed for the end of the culture, the number of osteoclasts was almost the same as with RANKL alone.

In the presence of heparin and RANKL, CD14⁺ cells, as well as RAW 264.7 cells, developed 2 different morphological cells: large and usual multinucleated TRAP⁺ cells and very condensed cells (see arrows on Figures 1A and 2A). As this second kind of cells seemed to be TRAP⁺ and multinucleated,

we suggested that heparin inhibited the sprawl of RANKL-generated osteoclasts. Thus. after the formation of large osteoclasts in the control medium containing RANKL, we removed heparin and cultured the cells for 3 more days. Osteoclasts did not die during these 3 more days. Surprisingly, in this condition the number of condensed cells decreased whereas the number of usual large osteoclasts increased, suggesting a sprawl of the condensed cells during these 3 days (Figures 6C and 6D). We thus confirmed this phenomenon using time laps experiment. Same experiment as previously described was performed and a picture was taken every 10 min during 11 hours to realize a time lap's movie (Supplemental data 1). This movie really showed that condensed cells obtained in presence of RANKL and heparin completely spread themselves when heparin was removed of the culture.

This result clearly demonstrated a sequential effect of heparin on RANKLinduced osteoclastogenesis. Heparin acted at two distinct levels of osteoclastogenesis; first at the beginning of the culture by affecting and decreasing cell adherence of and then at the end the osteoclastogenesis process by inhibiting the spreading of the preformed osteoclasts which thus were no functional as shown by the inhibition of the dentine resorption. Furthermore, as shown in figures 6C and 6D, this second effect is reversible as osteoclasts are able to spread when heparin was removed only 3 days after the predicted end of the culture. Actually, we these results suggested that on CD14⁺ monocytes, heparin did not inhibit the fusion of osteoclast precursors, but induced a morphological change of the generatedosteoclasts leading to a misinterpretation of the osteoclast counting and an inhibition of the functionality of these cells.

Discussion

Bone is а connective tissue composed of cells and mineralized extracellular matrix. Its normal remodeling and volume are maintained through the balance of bone formation by osteoblasts and resorption by osteoclasts. Whether this equilibrium between osteoblast and osteoclast activities is controlled by a plethoric number of cytokines and growth factors, extracellular matrix components including proteoglycans and glycosaminoglycans (GAGs) participate also to this phenomenon (10). Indeed, heparan sulfate proteoglycans are found ubiquitously both on the surface of cells as well within the extracellular matrix where they bind and modify function of numerous ligands (10). The influence of GAGs on bone metabolism has been revealed many years ago by long-term administration of heparin can lead to development of osteoporosis. Rats treated once daily by subcutaneous injections of heparin exhibited decreased trabecular bone volume both by decreasing the rate of bone formation and increasing the rate of bone resorption (26). Similar Barbour et al., showed that 36% of pregnant women undergoing long-term treatment heparin had a 10% reduction in femoral bone mineral density (27). However, the mechanisms sustaining this osteoporosis was unclear and it was difficult to determine if these effects on bone resorption were due to the direct effect of heparin on osteoclasts or to an indirect via its osteoblast activity. This study takes place in this context and analyzed the influence of GAGs on osteoclastogenesis and resorption activity.

The effect of GAGs on osteoclastogenesis is controversial as some studies showed а stimulation of osteoclastogenesis (20, 28) and others an inhibition (21, 22). The mechanisms suggested are an inhibition of OPG the decov recepttor for RANKL (20) or a direct interaction of GAGs with RANKL

leading to an inactivation of the cytokine (21, 22). It is worth to note that there are differences in the models used by these two teams. Indeed, Irie et al., used a system of coculture of mouse bone marrow with calvarial osteoblats in a medium supplemented with 1,25(OH)2D3/PGE2 (20) whereas Shinmyouzu et al., simply performed their studies on mouse bone marrow cells (21). In order to better understand the real effect of GAGs on osteoclastogenesis, we used three different models of osteoclastogenesis (murine or human) and tested various GAGs. Our results clearly demonstrated that all GAGs inhibited osteoclastogenesis in all systems tested. Furthermore, we demonstrated the importance of the length and the sulfation of the GAGs in their inhibitory effect. Such structural importance has been already been shown in other biological models (29-31). The influence of length on osteoclastogenesis has been also suggested by in vivo study. Indeed, in contrast to unfractioned heparins which seems decrease bone formation and increase bone resorption, low molecular weight heparins cause less bone loss because they only decrease bone formation (31). The sulfation plays also a key role in biological activities of GAGs as revealed by the present work. The sulfation has been clearly participating to the control of cell biology. For example, Hallak et al, demonstrated that efficient infection of cells by the Respiratory Syncycial Virus requires an interaction of the virus to GAGs containing N-sulfation and a minimum saccharide chain length of 10 (29). McDonnell et al., showed that reduced GAG chain sulfation by chlorate treatment decreases the frequency of acetylcholine receptor spontaneous clustering in skeletal muscle cells (30). Furthermore, sulfation strongly modulates the interaction of GAGs with proteins such as growth factors or enzymes (10, 32). Similarly, osteoclast differentiation and activity are regulated by GAGs at different levels, as revealed in previous studies. For

instance, in an *in vitro* model of osteoclastogenesis, FGF-2 upregulated the expression of RANKL on rheumatoid arthritis synovial fibroblasts, which was diminished by the removal of heparan sulfate with heparitinase.(33) Heparan sulfate can also participate in bone resorption regulation through the inhibition of cathepsin K activity, as demonstrated by the study of Li et al. (34). Cathepsin K is a lysosomal papain-like cysteine protease mainly involved in bone matrix destruction and forms complexes with chondroitin sulfate therefore demonstrating a highly collagenolytic activity. If sulfation clearly modulates GAG activities on osteoclastogenesis, their length appears also as another key parameter of their biological functions. Indeed, although hyaluronic acid is not sulfated (10), its length can explain its inhibitory activity on osteoclastogenesis. These data then revealed a complementary influence of length and sulfation of GAGs on osteoclastogenesis. Overall, our data are in favour of a direct inhibitory activity of GAGs on osteoclastogenesis and the in effect of unfractioned heparin vivo observed can be explained by its effects on osteoblast compartment of bone associated and then by the dysregulation of the osteoblasts balance between and osteoclasts.

However, how can explain the strong discrepancies between the previous data published? First, the models used are different and the present work is the first comparing simultaneously the GAG effects on human and murine cells (purified primary culture cells and cell lines). Thus, Ariyoshi et al. (18) showed that hyaluronic upmodulates osteoclastogenesis acid through activation of CD44 signaling pathway and Chang et al. (19)demonstrated opposite effects revealing an activation of TLR4 signaling pathway without any involvement of CD44. .However, the present work did not evidence any alteration of RANK/RANKL signaling and no specific signaling induced

has been detected after GAG treatments. Ariyoshi et al. (22) demonstrated the binding of heparin to RANKL. unfortunately our surface plasmon resonance experiments did not confirm such binding in contrast for instance to OPG, an heparin binding protein (data not shown, (15, 35). Moreover, Shinmyouzu et al. (21) published that dermatan sulfate inhibits osteoclast formation by binding to RANKL. However, these authors used 300 µg/ml dermatan sulfate, a non relevant physiological concentration and used non purified osteoclast precursors to study osteoclastogenesis. Such effects may be due to the activation of Toll like receptors as shown by Chang et al.(19). In this context, in absence of RANKL-GAG binding and signalisation, we analyzed the effects of GAGs on adhesion and fusion of osteoclast precursors. Thus, the second major point of this study is the effect of heparin on the morphological changes of the cells obtained in presence of RANKL. First, these cells can not be counted as osteoclasts because the number of nuclei is not detectable, and second these cells are not able to resorb dentine, indicating that in any case they can be considered as osteoclasts. However, this effect is reversible by removing heparin from the medium, just few hours are needed to get normal osteoclasts. We clearly revealed that GAGs inhibit early step of osteoclast precursor adhesion and inhibit also the step of cell fusion. The alteration of cell adhesion and morphology avoids the cell fusion of ostoclast precursors and blocks osteoclast resorption which is particularly sensitive to the cell morphology to develop their brush border (36).

The present work evidences a novel mechanism of action of GAGs on the osteoclasts and their precursors. However, although a direct activity of GAGs on osteoclasts has been demonstrated, the mechanisms of action of low molecular weight heparin which have gradually replaced the use of unfractioned heparin in part due a lower risk of causing osteoporosis is not totally elucidated (31). Indeed, if short oligosaccharides are less efficient to inhibit osteoclastogenesis, the effect of low molecular weight heparins on osteoblasts and on osteoblast-osteoclast communications needs to be investigated. Moreover, issues to determine whether the effects of heparin on bone are reversible are needed.

Ackowledgments

This work was supported by the Région des Pays de la Loire [Program entitled "Ciblage Moléculaire et Applications Thérapeutique" (CIMATH)] and by the ANR 2007 INSERM Pathophysiology of Human Diseases project N° R07196NS. Marc BAUD'HUIN received a fellowship from the Région des Pays de la Loire.

References

1. **Bruzzaniti A, Baron R** 2006 Molecular regulation of osteoclast activity. Rev Endocr Metab Disord 7:123-139

2. Wiktor-Jedrzejczak W, Bartocci A, Ferrante AW, Jr., Ahmed-Ansari A, Sell KW, Pollard JW, Stanley ER 1990 Total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (op/op) mouse. Proc Natl Acad Sci U S A 87:4828-4832

3. **Biskobing DM, Fan X, Rubin J** 1995 Characterization of MCSF-induced proliferation and subsequent osteoclast formation in murine marrow culture. J Bone Miner Res 10:1025-1032

4. **Felix R, Cecchini MG, Fleisch H** 1990 Macrophage colony stimulating factor restores in vivo bone resorption in the op/op osteopetrotic mouse. Endocrinology 127:2592-2594

5. **Baud'huin M, Lamoureux F, Duplomb L, Redini F, Heymann D** 2007 RANKL, RANK, osteoprotegerin: key partners of osteoimmunology and vascular diseases. Cell Mol Life Sci 29:29

6. **Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL** 2003 Osteoclast differentiation and activation. Nature 423:337-342 7. Wittrant Y, Theoleyre S, Couillaud S, Dunstan C, Heymann D, Redini F 2004 Relevance of an in vitro osteoclastogenesis system to study receptor activator of NF-kB ligand and osteoprotegerin biological activities. Exp Cell Res 293:292-301

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

9. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ 1997 Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. Cell 89:309-319

10. Lamoureux F, Baud'huin M, Duplomb L, Heymann D, Redini F 2007 Proteoglycans: key partners in bone cell biology. Bioessays 29:758-771

11. Corsi A, Xu T, Chen XD, Boyde A, Liang J, Mankani M, Sommer B, Iozzo RV, Eichstetter I, Robey PG,

Bianco P, Young MF 2002 Phenotypic effects of biglycan deficiency are linked to collagen fibril abnormalities, are synergized by decorin deficiency, and mimic Ehlers-Danlos-like changes in bone and other connective tissues. J Bone Miner Res 17:1180-1189

12. Bernfield M, Gotte M, Park PW, Reizes O, Fitzgerald ML, Lincecum J, Zako M 1999 Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. Annu Rev Biochem 68:729-777

13. Hildebrand A, Romaris M, Rasmussen LM, Heinegard D, Twardzik **DR, Border WA, Ruoslahti E** 1994 Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta. Biochem J 302 (Pt 2):527-534

14. **Robinson CJ, Harmer NJ, Goodger SJ, Blundell TL, Gallagher JT** 2005 Cooperative dimerization of fibroblast growth factor 1 (FGF1) upon a single heparin saccharide may drive the formation of 2:2:1 FGF1.FGFR2c.heparin ternary complexes. J Biol Chem 280:42274-42282

15. **Theoleyre S, Kwan Tat S, Vusio P, Blanchard F, Gallagher J, Ricard-Blum S, Fortun Y, Padrines M, Redini F, Heymann D** 2006 Characterization of osteoprotegerin binding to glycosaminoglycans by surface plasmon resonance: role in the interactions with receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) and RANK. Biochem Biophys Res Commun 347:460-467

16. Mosheimer BA, Kaneider NC, Feistritzer C, Djanani AM, Sturn DH, Patsch JR, Wiedermann CJ 2005 Syndecan-1 is involved in osteoprotegerininduced chemotaxis in human peripheral blood monocytes. J Clin Endocrinol Metab 90:2964-2971

17. Standal T, Seidel C, Hjertner O, Plesner T, Sanderson RD, Waage A, Borset M, Sundan A 2002

Osteoprotegerin is bound, internalized, and degraded by multiple myeloma cells. Blood 100:3002-3007

18. Ariyoshi W, Takahashi T, Kanno T, Ichimiya H, Takano H, Koseki T, Nishihara T 2005 Mechanisms involved in enhancement of osteoclast formation and function by low molecular weight hyaluronic acid. J Biol Chem 280:18967-18972

19. Chang EJ, Kim HJ, Ha J, Kim HJ, Ryu J, Park KH, Kim UH, Lee ZH, Kim HM, Fisher DE, Kim HH 2007 Hyaluronan inhibits osteoclast differentiation via Toll-like receptor 4. J Cell Sci 120:166-176 20. Irie A, Takami M, Kubo H,

Sekino-Suzuki N, Kasahara K, Sanai Y 2007 Heparin enhances osteoclastic bone resorption by inhibiting osteoprotegerin activity. Bone 5:5

21. Shinmyouzu K, Takahashi T, Ariyoshi W, Ichimiya H, Kanzaki S, Nishihara T 2007 Dermatan sulfate inhibits osteoclast formation by binding to receptor activator of NF-kappa B ligand. Biochem Biophys Res Commun 354:447-452

22. Ariyoshi W, Takahashi T, Kanno T, Ichimiya H, Shinmyouzu K, Takano H, Koseki T, Nishihara T 2008 Heparin inhibits osteoclastic differentiation and function. J Cell Biochem 103:1707-1717

23. Folwarczna J, Sliwinski L, Janiec W, Pikul M 2005 Effects of standard heparin and low-molecular-weight heparins on the formation of murine osteoclasts in vitro. Pharmacol Rep 57:635-645

24. **Goger B, Halden Y, Rek A, Mosl R, Pye D, Gallagher J, Kungl AJ** 2002 Different affinities of glycosaminoglycan oligosaccharides for monomeric and dimeric interleukin-8: a model for chemokine regulation at inflammatory sites. Biochemistry 41:1640-1646

25. Lyon M, Rushton G, Askari JA, Humphries MJ, Gallagher JT 2000 Elucidation of the structural features of heparan sulfate important for interaction with the Hep-2 domain of fibronectin. J Biol Chem 275:4599-4606

26. Muir JM, Andrew M, Hirsh J, Weitz JI, Young E, Deschamps P, Shaughnessy SG 1996 Histomorphometric analysis of the effects of standard heparin on trabecular bone in vivo. Blood 88:1314-1320

27. Barbour LA, Kick SD, Steiner JF, LoVerde ME, Heddleston LN, Lear JL, Baron AE, Barton PL 1994 A

prospective study of heparin-induced osteoporosis in pregnancy using bone densitometry. Am J Obstet Gynecol 170:862-869 28. Fuller K, Chambers TJ,

Gallagher AC 1991 Heparin augments osteoclast resorption-stimulating activity in serum. J Cell Physiol 147:208-214

29. Hallak LK, Spillmann D, Collins PL, Peeples ME 2000 Glycosaminoglycan sulfation requirements for respiratory syncytial virus infection. J Virol 74:10508-10513

30. **McDonnell KM, Grow WA** 2004 Reduced glycosaminoglycan sulfation diminishes the agrin signal transduction pathway. Dev Neurosci 26:1-10

31. **Rajgopal R, Bear M, Butcher MK, Shaughnessy SG** 2008 The effects of heparin and low molecular weight heparins on bone. Thromb Res 122:293-298

32. **Gallagher JT** 2006 Multiprotein signalling complexes: regional assembly on heparan sulphate. Biochem Soc Trans 34:438-441

33. Nakano K, Okada Y, Saito K, Tanaka Y 2004 Induction of RANKL expression and osteoclast maturation by the binding of fibroblast growth factor 2 to heparan sulfate proteoglycan on rheumatoid synovial fibroblasts. Arthritis Rheum 50:2450-2458

34. Li Z, Yasuda Y, Li W, Bogyo M, Katz N, Gordon RE, Fields GB, Bromme D 2004 Regulation of collagenase activities of human cathepsins by glycosaminoglycans. J Biol Chem 279:5470-5479

35. Lamoureux F, Picarda G, Garrigue-Antar L, Baud'huin M, Trichet V, Vidal A, Miot-Noirault E, Pitard B, Heymann D, Redini F 2009 Glycosaminoglycans as potential regulators of osteoprotegerin therapeutic activity in osteosarcoma. Cancer Res 69:526-536

36. **Rousselle AV, Heymann D** 2002 Osteoclastic acidification pathways during bone resorption. Bone 30:533-540

Figure 1: Heparin inhibited RANKL-induced osteoclastogenesis in two murine models of osteoclastogenesis



Figure 1: Heparin inhibited RANKL-induced osteoclastogenesis in two murine models of osteoclastogenesis. RAW 264.7 cells were cultured in presence of hRANKL (100 ng/ml) and heparin (125 μ g/ml). After 5 days, cells were stained for TRAP expression (A) and TRAP⁺ multinucleated cells (more than 3 nuclei) were counted under a light microscope (original magnification x 40). Each value represents the mean (± SD) of multinucleated cells per well of a triplicate experiment (B). mRNA expressions of osteoclastic markers (RANK, TRAP, Ctsk) were analyzed by real-time PCR after 5 days of culture. Cyc1 and Hprt1 were used as internal control. Results are expressed as fold increase compared to the control (C). Experiments were performed independently at least 3 times in triplicate. CD11b⁺ purified cells from mouse bone marrow were cultured for 15 days in presence of 25 ng/ml mM-CSF with or without hRANKL 100 ng/ml and heparin 125 μ g/ml. At the end of the culture period, TRAP staining was performed and TRAP⁺ multinucleated cells (more than 3 nuclei) were counted under a light microscope (D) (** p<0.01).

3. Discussion

L'OPG a été décrite pour la première fois comme une molécule anti-résorptive (Simonet et al., 1997 ; Tsuda et al., 1997). Depuis, de nombreuses autres fonctions lui ont été attribuées. L'OPG contrôle l'activité de la cytokine pro-apoptotique TRAIL (Emery et al., 1998). L'importance biologique de l'interaction OPG / TRAIL a été soulignée par des travaux récents montrant que l'affinité de l'OPG pour TRAIL est comparable à celle de l'OPG pour RANKL (Vitovski et al., 2007). Ces propriétés anti-apoptotiques s'exercent sur différents types cellulaires tels que les cellules endothéliales (Malyankar et al., 2000 ; Pritzker et al., 2004 ; Zauli et Secchiero, 2006), les cellules tumorales de rein et de prostate (Holen et al., 2002 ; Holen et al., 2005 ; Thomas et al., 1999) ou les cellules de myélomes multiples (Shipman et Croucher, 2003). L'OPG possède également d'autres partenaires avec lesquels il peut se lier, notamment par son domaine de laison à l'héparine. Dans les cellules de myélomes multiples le syndécan-1 fixe l'OPG et permet son internalisation et sa dégradation (Standal et al., 2002). Cette diminution d'OPG par les cellules de myélome participe à la destruction osseuse observée dans cette pathologie, puisqu'elle augmente l'activité de RANKL et donc celle des ostéoclastes. Les GAGs régulent également la biodisponibilité de l'OPG. L'héparine en s'associant à l'OPG favorise la différenciation ostéoclastique (Irie et al., 2007). Les GAGs, en séquestrant l'OPG, limitent l'activité anti-tumorale spécifique des tumeurs osseuses primitives comme l'ostéosarcome (Lamoureux et al., 2009).

Ces travaux préliminaires montrent que l'OPG est capable d'induire l'adhérence des monocytes CD14⁺. Le rôle de l'OPG dans l'adhérence avait déjà été décrit pour les leucocytes. Elle augmente, en effet, leur contact avec les cellules endothéliales (Zauli et *al.*, 2007). Le domaine de liaison à l'héparine de l'OPG est nécessaire pour promouvoir l'adhérence des monocytes puisque l'OPG tronquée, dépourvue de ce domaine, n'en est pas capable. De plus, les GAGs qui se lient à l'OPG (Theoleyre et *al.*, 2006) diminuent de façon significative le nombre de cellules adhérentes. Cependant, ces GAGs n'inhibent pas ce processus avec la même intensité. Cette différence pourrait s'expliquer par des affinités différentes entre les GAGs et l'OPG. Ces données suggèrent donc que l'OPG interagit avec les monocytes grâce à son domaine de liaison à l'héparine. A ce titre, les HSPGs pourraient constituer un récepteur (ou co-récepteur) pour l'OPG. Les HSPGs exprimés à la surface cellulaire participent à la régulation du cytosquelette d'actine, à la migration et à l'adhérence cellulaires (Secchiero et *al.*, 1997 ; Woods et Couchman, 1998). Le syndécan-1 permet la

Figure 2: Heparin inhibited RANKL-induced osteoclastogenesis in human CD14⁺ monocytes



Figure 2: Heparin inhibited RANKL-induced osteoclastogenesis in human CD14⁺ monocytes. CD14⁺ purified monocytes were cultured for 15 days in presence of 25 ng/ml hM-CSF with or without hRANKL 100 ng/ml and heparin 125 μ g/ml. At the end of the culture period, TRAP staining was performed (original magnification x 40) (A) and TRAP⁺ multinucleated cells (more than 3 nuclei) were counted under a light microscope (B). In some conditions, CD14⁺ monocytes were cultured on dentine slices for 15 days. Resorption areas were visualised after the culture of CD14⁺ cells on dentine sclices (C) (* p<0.05).




Figure 3: Various GAGs are able to inhibit RANKL-induced osteoclastogenesis. RAW 264.7 cells were cultured in presence of hRANKL (100 ng/ml) and 5 μ M of heparan sulfate (bHS: heparan sulfate from bovine kidney, pHS: heparan sulfate from porcine intestinal mucosae), chondroitin sulfate C (CS-C) and dermatan sulfate (DS) (A) or increasing concentrations of oligosaccharides 4 (grey bar), 14 (dark bar) and 24 (hatched bar) (B) or increasing concentrations of hyaluronic acid (C). After 5 days, RAW 264.7 cells were stained for TRAP expression and multinucleated cells (more than 3 nuclei) were counted under a light microscope. Results are expressed as number of multinucleated cells per well: each value represents the mean (\pm SD) of multinucleated cells per well of a triplicate. Experiments were performed at least 3 times in triplicate (* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

Figure 4: Sulfations are important for the inhibition of RANKL-induced osteoclastogenesis by heparin



Figure 4: Sulfations are important for the inhibition of RANKL-induced osteoclastogenesis by heparin. RAW 264.7 cells were cultured in presence of RANKL (100 ng/ml) and different forms of heparin (5 μ M). After 5 days, RAW 264.7 cells were stained for TRAP expression and multinucleated cells (more than 3 nuclei) were counted under a light microscope. Results are expressed as number of multinucleated cells per well: each value represents the mean (± SD) of multinucleated cells per well of a triplicate. Experiments were performed at least 3 times in triplicate (* p<0.05, ** p<0.01).

Figure 5: Oligosaccharides promote dendritic differentiation



Figure 5: Oligosaccharides promote dendritic differentiation. Human $CD14^+$ cells (A) or total PBMCs (B) were cultured in presence of 100 ng/ml GM-CSF + 5 ng/ml IL-4, in presence or not of different oligosaccharides. After 5 days, cells were double stained for CD1a and CD14, and analyzed by flow cytometry. Percentages of $CD1a^+$ cells (dendritic cells) were plotted.



Figure 6: Heparin acts at two different levels of RANKL-induced osteoclastogenesis of human CD14⁺ cells

Figure 6: Heparin acts at two different levels of RANKL-induced osteoclastogenesis of human CD14⁺ cells. CD14⁺ cells were cultured in presence of hM-CSF and hRANKL with or without heparin (125 μ g/ml) added at different time point of the culture. After TRAP staining, osteoclasts were counted under a light microscope (A). Heparin inhibits the adherence of CD14⁺ cells when added only the first 4 days of the culture, in the only presence of hM-CSF (B). Heparin inhibits osteoclast spreading: CD14⁺ monocytes were cultured as usual with hM-CSF and hRANKL, with or without heparin (125 μ g/ml) until the end of the culture. Heparin was then removed from the medium and culture was extended for 3 more days. TRAP staining was then performed and osteoclasts were counting under a light microscope (original magnification x 40) (C and D). Black arrows showed the condensed cells obtained in heparin conditions after the normal culture period + 3 more days (* p<0.05).

III. Discussion

Nous avons abordé en introduction de cet article les données contradictoires qui émergent des études menées sur les différentes classes de GAGs et leurs effets sur l'ostéoclastogenèse. Certains articles montrent une stimulation de la différenciation ostéoclastique (Ariyoshi et *al.*, 2005 ; Fuller et *al.*, 1991 ; Irie et *al.*, 2007) alors que d'autres rapportent une inhibition (Ariyoshi et *al.*, 2008 ; Shinmyouzu et *al.*, 2007). Le but de nos travaux était de clarifier le rôle direct des GAGs dans la différenciation ostéoclastique. Notre étude repose sur l'utilisation de trois modèles d'ostéoclastogenèse *in vitro* (la lignée murine RAW 264.7, les monocytes murins CD11b⁺ et humains CD14⁺). Ces travaux traitent essentiellement de l'activité directe de l'héparine sur la différenciation ostéoclastique de ces modèles.

L'héparine lorqu'elle est ajoutée au milieu de différenciation induit une diminution significative du nombre d'ostéoclastes générés en présence de RANKL. L'activité de résorption des ostéoclastes est également diminuée comme le montrent les essais de résorption sur dentine. Nous avons ensuite rechercher quelles caractéristiques chimiques de l'héparine pouvaient agir sur son activité anti-ostéoclastique. Nous disposions au laboratoire de différentes structures hépariniques issues d'héparine native. Nous avons pu montrer que le degré d'inhibition de l'ostéoclastogenèse est directement lié au degré de sulfatation des résidus hépariniques. En effet, l'inhibition due à l'héparine totalement désulfatée n'atteint que 16% alors qu'elle est de 83 % pour l'héparine native. En revanche, la localisation des sites sulfatés n'a pas d'influence sur l'acivité anti-ostéoclastique de l'héparine. L'importance de la sulfatation de structures osidiques a déjà été décrite dans d'autres processus biologiques. Hallak et coll. ont montré que le virus respiratoire syncitial doit se lier à des GAGs contenant des N-sulfatations, pour pouvoir infecter une cellule (Hallak et al., 2000). De plus, la désulfatation des glycosaminoglycanes à la surface des cellules MG-63 provoque une diminution de prolifération et de minéralisation (Kumarasuriyar et al., 2009). La taille des chaînes osidiques est également un paramètre important dans l'activité de l'héparine. A des concentrations identiques, les chaînes hépariniques de grande taille (24 sous-unités dissacharidiques) inhibent plus fortement l'ostéoclastogenèse que les chaînes hépariniques de taille restreinte qui ne présentent que 4 sous-unités dissachiridiques (oligosaccharide 4).

Ces travaux nous ont donc permis de mettre en évidence que le nombre de répétitions des sous-unités dissacharidiques ainsi que leur degré de sulfatation sont des paramètres critiques dans l'effet anti-ostéoclastique de l'héparine. Nous avons évalué ensuite l'effet d'autres représentants de la famille des GAGs sur la différenciation ostéoclastique. Ces GAGs ont une structure chimique proche de l'héparine, c'est-à-dire qu'ils sont basés sur la répétition d'une sous-unité dissacharidique. Les différences résident dans la nature des résidus osidiques et dans leur degré de sulfatation. Nous avons donc évaluer l'impact de ces modifications sur la différenciation ostéoclastique induite par RANKL. Il apparaît que les autres GAGs étudiés (héparane sulfate, chondroïtine sulfate dermatane sulfate) inhibent de façon similaire la différenciation ostéoclastique. Afin de confirmer l'importance de la taille et de la sulfatation de ces autres GAGs, nous envisageons de réaliser les mêmes travaux que pour l'héparine. Nous avons par ailleurs étudié l'effet d'un GAG non sulfaté, l'acide hyaluronique. Il apparaît que l'acide hyaluronique est également capable d'inhiber l'ostéoclastogenèse à des concentrations équivalentes à celles utilisées pour l'héparine. Nous supposons que cette activité est inhhibitrice est due à la taille relativement importante de l'acide hyaluronique. L'utilisation de fragments de petite taille d'acide hyaluronique permettrait de confirmer cette hypothèse.

L'activité anti-ostéoclastique de l'héparine que nous décrivons ici est quelque peu contradictoire avec les données cliniques recueillies lors de l'administartion à long terme d'héparine non fractionnée. En effet, les résultats d'études cliniques montrent l'induction d'une perte de masse osseuse lorsque des patients reçoivent de manière prolongée un traitement héparinique. Cette différence peut s'expliquer par le fait que dans cette étude nous analysons l'effet direct de l'héparine sur les précurseurs ostéoclastiques. Ces études in vitro écartent les activités potentielles de l'héparine sur les autres cellules de l'environnement osseux. Nous pouvons supposer que l'héparine possède également une activité sur la composante ostéoblastique de la biologie osseuse. Des études menées actuellement au laboratoire sur un exopolysaccharide d'origine marine (en collaboration avec l'IFREMER) permettent d'apporter certains éléments de réponse quand à l'effet de polysaccharides sur les ostéoblastes. Cet exopolysaccharide (que nous nommerons EXO) est constitué de la répétition d'une unité nonasaccharidique et présente des ramifications. Son poids moléculaires moyen est de 20 kDa, proche de celui de l'héparine. Deux formes d'EXO ont été étudiées : une forme peu sulfatée (EXO NS) et une forme sulfatée (EXO S). Les travaux préliminaires menés sur des cellules souches mésenchymateuses (CSM) de rat en condition de différenciation ostéoblastique montrent une diminution de prolifération cellulaire lors d'un traitement par la forme sulfatée d'EXO (figure 29). La forme EXO NS n'a en revanche aucune activité sur la prolifération cellulaire.



<u>Figure 29</u> : Effets d'EXO NS et d'EXO S sur la prolifération de cellules souches mésenchymateuses de rat en condition de différenciation ostéoblastique.

 25.10^3 de CSM de rat ont été ensemencées en plaque 24 puits et mis en condition de différenciation ostéoblastique. Après 7 jours de culture, le nombre des cellules a été évalué par coloration au bleu trypan.

D'autre part, EXO S diminue la capacité des CSM de rat à former une matrice minérale (figure 30) alors qu'un traitement par EXO NS est sans effet.



<u>Figure 29</u> : EXO NS et EXO S diminuent la capacité des cellules souches mésenchymateuses de rat à former une matrice minérale.

 50.10^3 de CSM de rat ont été ensemencées en plaque 24 puits et mis en condition de différenciation ostéoblastique. Après 21 jours de culture, la matrice minérale est coloré par une solution de rouge alizarine.

Ces premiers résultats laissent supposer que des polysaccharides sulfatés inhibent de façon directe la différenciation ostéoblastique. Ces travaux auront besoin d'être étendu à

l'héparine ainsi qu'aux autres glycosaminoglycanes sulfatés. Toutefois, nous pouvons envisager que des structures saccharidiques sulfatées (héparine, GAGs, EXO S) auraient des activités inhibitrices directes sur les différenciations ostéoclastique et ostéoblastique. Ce dérèglement du remodelage osseux conduirait aux lésions ostéoporotiques décrites lors d'un traitement héparinique au long cours.

Le second temps de notre étude s'inscrit dans la recherche des mécanismes impliqués dans l'inhibition de l'ostéoclastogenèse par l'héparine. Basés sur la littérature, nos travaux se sont orientés vers une interaction directe entre l'héparine et RANKL comme le suggérait Ariyoshi. (Ariyoshi et *al.*, 2008). Cependant, l'analyse par résonance plasmonique de surface n'a pas mis en évidence de liaison directe entre RANKL et l'héparine (données non montrées). De plus, nous n'avons observé ni modification des voies de signalisation RANK / RANKL ni induction d'une voie de signalisation propre à l'héparine. Nos investigations ont porté sur les récepteurs CD44 (récepteur à l'acide hyaluronique) et TLR4 (toll like receptor). Il a été montré que l'acide hyaluronique inhibait l'ostéoclastogenèse via l'activation du TLR4 (Chang et al., 2007) alors que l'acide hyaluronique de bas poids moléculaires stimulait la différenciation ostéoclastique en se liant au CD44 (Ariyoshi et al., 2005).

Nos recherches se sont alors concentrées sur le rôle de l'héparine dans l'adhérence des précurseurs et des ostéoclastes matures. En effectuant des traitements à différents temps de culture, nous avons pu observé que l'héparine agit de façon séquentielle. Dans les premiers temps de l'ostéoclastogenèse, l'héparine modifie la capacité des précurseurs ostéoclastiques à adhérer au support. Cette perte d'adhérence engendre une diminution du nombre de précurseurs et donc d'ostéoclastes. Si l'héparine est ajoutée dans les temps intermédiaires, elle est sans effet sur le processus d'osteoclastogenèse. En revanche, l'exposition des ostéoclastes dans les derniers temps de culture à l'héparine entraîne un changement de morphologie. Les cellules perdent leur capacité à s'étaler, et prennent un aspect arrondi. Cet effet est en revanche réversible, une fois l'héparine retirée, les ostéoclastes sont capables de s'étaler sur la surface de culture en quelques heures.

A travers ces travaux, nous avons pu mettre en évidence que l'héparine inhibait l'ostéoclastogenèse et que le processus d'adhérence (des précurseurs ou des ostéoclastes matures) entrait dans le mécanisme d'inhibition. L'adhérence des ostéoclastes sur la surface osseuse est une étape essentielle de la résorption osseuse. Elle est régie par les intégrines $\alpha_V\beta_3$, qui reconnaissent les séquences RGD des protéines de la matrice telles que la vitronectine, la fibronectine et l'ostéocalcine (Datta et al., 2008). L'interaction entre l'ostéoclaste et l'os induit la formation de la zone claire et une réorganisation du cytosquelette pour former la bordure en brosse caractéristique de l'ostéoclaste mature. Afin de mieux comprendre le mécanisme d'inhibition de l'ostéoclastogenèse par l'héparine, nous poursuivons nos investigations sur ces phénomènes d'adhérence. Nous étudions actuellement le cytosquelette d'actine en microscopie confocale (marquage par la phalloïdine) afin de déceler une éventuelle désorganisation de la bordure en brosse des ostéoclastes matures. Cependant, la différenciation des CD14⁺ sur des supports adaptés à la microscopie confocale a posé certaines difficultés (adhérence des précurseurs diminuée, temps de culture plus long, nombre d'ostéoclastes réduit). Des améliorations de ces conditions de culture sont actuellement à l'essai pour étudier la localisation des intégrines $\alpha_V\beta_3$, et l'activation des protéines régulatrices de l'adhérence telles que c-src, FAK et PYK-2 (Miyazaki et al., 2004 ; Nakamura et al., 2007). Nous pensons que l'héparine modifie la distribution de ces protéines ou leur degré de phosphorylation, ce qui perturbe l'ostéoclastogenèse et la résorption osseuse. D'autres travaux sont également nécessaires pour identifier les récepteurs ou les interactions moléculaires à l'origine de cette modification d'adhérence due à l'héparine. Est-ce le résultat d'une trop grande quantité de charges négatives que porte l'héparine ? L'héparine agit-elle comme un film moléculaire limitant l'adhérence des cellules ? L'héparine modifie-t-elle localement le pH, ce qui cause la désorganisation cellulaire ?

IV. Travaux complémentaires

<u>1. Introduction</u>

Pour que les monocytes circulants gagnent les tissus par diapédèse et se différencient en macrophages, leur adhérence aux cellules endothéliales est nécessaire. Cette étape est régulée par des un grand nombre de facteurs membranaires et solubles comme les molécules d'adhérence (I-CAM-1, sélectines) et les chémokines (IL-8, CCL2) (Martin et *al.*, 2007). L'adhérence de ces mêmes précurseurs monocytaires est également requise pour la différenciation ostéoclastique. Cette étape d'adhérence, de 72 heures environ, est assurée par le M-CSF dans nos modèles d'ostéoclastogenèse.

L'OPG, qui possède un domaine de liaison à l'héparine, est impliquée dans des phénomènes d'adhérence et de migration. En 2005, Mosheimer et coll. ont montré que l'OPG augmentait, par chimiotactisme, la migration des monocytes (Mosheimer et *al.*, 2005). L'OPG favorise la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses des artères pulmonaires ainsi que des cellules endothéliales (Lawrie et *al.*, 2008 ; Kobayashi-Sakamoto et *al.*, 2008). L'OPG augmente l'expression de molécules d'adhérence (ICAM-1, V-CAM-1 et E-sélectine) dans les cellules endothéliales traitées par le TNF α (Mangan et *al.*, 2007). L'OPG est également capable d'accroître l'adhérence des leucocytes aux cellules endothéliales (Zauli et *al.*, 2007). Dans cette étude, les auteurs ont mis en évidence qu'un traitement par l'héparine diminuait l'adhérence des leucocytes induite par l'OPG.

L'ensemble de ces travaux prouve le rôle majeur de l'OPG dans l'adhérence et la migration cellulaire. C'est dans ce contexte que nous avons étudié l'effet de l'OPG sur l'adhérence des monocytes CD14⁺ et le contrôle de ce processus par les GAGs.

2. Résultats

Le domaine de liaison à l'héparine de l'OPG induit l'adhérence des monocytes

Pour déterminer l'effet potentiel de l'OPG sur l'adhérence, des monocytes CD14⁺ ont été cultivés en présence ou en l'absence de 100 ng/ml d'OPG humaine et de 125 μ g/ml d'héparine. Après 3 jours de culture et en l'absence de M-CSF, l'OPG a augmenté de façon significative l'adhérence des monocytes au plastique. La présence d'héparine inhibe totalement l'effet de l'OPG (p<0,01) (figure 31).



<u>Figure 31</u> : **L'OPG induit l'adhérence des monocytes qui est inhibée par l'héparine.** 1.10^{6} cellules ont été ensemencées en plaque 6 puits, et cultivées en présence ou non d'OPG (100 ng/ml) et/ou d'héparine (125 µg/ml). Après 3 jours, les cellules ont été lavées et observées au microscope.

Les mêmes effets de l'OPG et de l'héparine ont été observés sur d'autres supports tels que la vitronectine et le collagène (données non montrées). Le traitement des monocytes par de l'OPG tronquée dépourvue de domaine de liaison à l'héparine n'a aucun effet sur l'adhérence (données non montrées). Afin de quantifier le phénomène et de confirmer les observations microscopiques, les cellules adhérentes ont été décollées et dénombrées par un comptage au bleu trypan (figure 32).



<u>Figure 32</u>: L'OPG augmente l'adhérence des monocytes CD14⁺ de façon significative. 1.10^6 cellules ont été ensemencées en plaque 6 puits, et cultivées en présence ou non d'OPG (100 ng/ml) et/ou d'héparine (125 µg/ml). Après 3 jours, les cellules ont été lavées et dénombrées (** p<0,01).

Effets d'autres glycosaminoglycanes sur l'adhérence

Nous avons ensuite recherché les effets d'autres glycosaminoglycanes dans le processus d'adhérence (figure 33). Nous avons montré que le DS et qu'un oligosaccharide de 18 sousunités disaccharidiques (Oligo 18) sont capables d'inhiber l'activité de l'OPG avec la même intensité que l'héparine (90 % d'inbition). En revanche, la CS et un oligosaccharide de 4 sous-unités disaccharidiques (Oligo 4) inhibent moins fortement l'adhérence induite par l'OPG (50 % d'inhibition).



<u>Figure 33</u> : Effets des glycosaminoglycanes sur l'adhérence des monocytes induite par l'OPG. 50.10^3 cellules ont été ensemencées en plaque 96 puits et cultivées en présence

ou non d'OPG (100 ng/ml) avec ou sans glycosaminoglycanes (5 μ M). Après 3 jours, les cellules ont été lavées puis un test de viabilité cellulaire (XTT) a été réalisé (* p<0,05, comparé à OPG seule).

L'OPG stimule l'adhérence des monocytes par l'activation de la voie PI3Kinase/Akt.

Pour explorer les mécanismes impliqués dans l'adhérence des monocytes, nous avons tout d'abord analysé le rôle des molécules d'adhérence comme ICAM-1 et V-CAM-1. Aucune modification d'expression de ces molécules n'a été observée à la surface des cellules CD14⁺ après une stimulation par l'OPG. Nous avons ensuite étudié l'implication de voies de signalisation activées par l'OPG. L'OPG induit la phosphorylation d'Akt qui est inhibée par l'héparine (figure 34).



<u>Figure 34</u> : **L'OPG stimule la voie PI3Kinase/Akt dans les monocytes CD14**⁺. Les monocytes CD14⁺ ont été stimulés pendant 10 (ou 45 minutes) avec 100 ng/ml d'OPG avec ou sans héparine (125 μ g/ml). Le western-blot a été réalisé sur les lysats cellulaires afin de déterminer le niveau de phosphorylation d'Akt. L'actine est utilisé comme témoin de chargement. L'expérience a été réalisée 3 fois indépendamment.

Pour confirmer le rôle de la voie PI3Kinase/Akt dans l'adhérence induite par l'OPG, nous avons traité les monocytes CD14⁺ par un inhibiteur chimique spécifique de PI3Kinase (LY294002). Comme le montre la figure 35, le LY294002 inhibe l'adhérence de monocytes de façon dose-dépendante. En effet, 1,25 μ M de LY294002 inhibe de manière significative (de l'ordre de 57%) l'activité de l'OPG et 10 μ M de LY294002 empêche totalement l'adhérence sans aucun effet toxique sur les cellules.



<u>Figure 35</u>: L'inhibition de la voie PI3Kinase/Akt empêche l'adhérence des monocytes. 50.10³ cellules ont été ensemencées en plaque 96 puits et cultivées en présence d'OPG (100 ng/ml) et de LY294002 à des concentrations croissantes . Après 3 jours, les cellules ont été lavées puis un test de viabilité cellulaire (XTT) a été réalisé.

Ces résultats viennent confirmer le rôle de la voie PI3Kinase/Akt dans l'adhérence des monocytes induite par l'OPG.

migration par chimiotactisme des monocytes CD14⁺ (Mosheimer et *al.*, 2005). De plus, nos études de western-blot montrent une activation de la voie PI3kinase/Akt en 10 minutes. C'est cette voie qui est activée dans les travaux de Mosheimer. Nous pouvons émettre l'hypothèse que le syndécan-1 est responsable de l'adhérence des monocytes induite par l'OPG. Pour apporter certains éléments de réponse, nous envisageons de bloquer ce PG par un anticorps et d'évaluer son effet sur l'adhérence. La stratégie inverse pourra également être réalisée en transfectant de façon transitoire les monocytes par le syndécan-1.

Cette étude démontre pour la première fois le rôle de l'OPG dans l'adhérence des monocytes. L'OPG pourrait participer au recrutement des monocytes au niveau de sites où sa production est augmentée. Certains types tumoraux expriment de grandes quantités d'OPG (Reid et Holen, 2009). Ces monocytes, par diapédèse, pourraient rejoindre le site tumoral et se différencier en macrophages. Il est maintenant bien établi que les macrophages infiltrant les tumeurs sont responsables non seulement de la croissance tumorale mais aussi de la néovascularisation indispensable au développement tumoral (Hagemann et *al.*, 2009). L'OPG pourrait favoriser la progression tumorale par deux voies distinctes : l'adhérence des monocytes / macrophages et l'inhibition de l'activité de TRAIL.

Toutefois ces monocytes peuvent emprunter une autre voie de différenciation. Sous l'action de RANKL et de M-CSF, ils sont capables de se différencier en ostéoclastes. L'OPG, pourtant molécule anti-résorptive, pourrait d'après nos données, favoriser le recrutement de monocytes dans des pathologies où elle est fortement exprimée. Les cancers du sein, de la prostate et du poumon font partie de ces tumeurs où la production d'OPG est élevée (Reid et Holen, 2009). La présence de métastases osseuses dans ces pathologies tumorales est relativement fréquente (Mountzios et *al.*, 2007). L'OPG pourrait favoriser le développement de ces atteintes osseuses secondaires en permettant le recrutement de monocytes qui peuvent se différencier en ostéoclastes, responsables de lésions ostéolytiques.

PERSPECTIVES ET CONCLUSIONS

GENERALES

Il existe entre les systèmes osseux et vasculaire une coopération cellulaire et une communication chimique assurée par des messagers moléculaires. Cette communication s'effectue dès le plus jeune âge, lors de la vie fœtale, avec le processus d'ossification qui requiert une vascularisation importante des zones cartilagineuses.Les vaisseaux sanguins assurent, tout au long de la vie, le transport des cellules sanguines produites par la moelle osseuse et la cicatrisation rapide d'une fracture osseuse (Laroche, 2002). Ces vaisseaux apportent les nutriments, l'oxygène et les précurseurs des futures cellules osseuses (ostéoblastes et ostéoclastes). D'un point de vue moléculaire, certains effecteurs du tissu osseux jouent un rôle prépondérant dans l'homéostasie vasculaire. Parmi ces molécules, l'OPG soutient la prolifération et la survie des cellules endothéliales et favorise par conséquent l'angiogenèse (McGonigle et al., 2009). Les BMPs, inducteurs de la différenciation ostéoblastique, activent la prolifération et la migration de cellules endothéliales grâce à l'activation des voies VEGF/VEGFR2 et Angiopoietin/Tie2 (Suzuki et al., 2008). De plus, des molécules du système vasculaire participent activement à la biologie osseuse. Le VEGF, molécule majeure de l'angiogenèse, contrôle la différenciation des deux types cellulaires osseux (Grellier et al., 2009 ; Nakagawa et al., 2000). Les FGFs, qui possèdent une activité mitogénique sur les cellules endothéliales, ont également des effets sur les cellules osseuses. La délétion du gène FGF-2 provoque une diminution de la densité et de la formation osseuses chez la souris (Montero et al., 2000).

Les travaux de cette thèse ont permis de définir le rôle de deux autres molécules majeures de l'homéostasie vasculaire dans la biologie osseuse et plus particulièrement dans la différenciation ostéoclastique. Nous avons étudié d'une part le complexe FVIII/FvW un acteur de l'hémostase sanguine et d'autre part l'héparine, glycosaminoglycane sulfaté régulant la coagulation sanguine.

De récents travaux ont montré la colocalisation de l'OPG et du FvW dans les cellules endothéliales au sein des corps de Weibel-Palade (Zannettino et *al.*, 2005). Les interactions entre ces deux molécules sont désormais bien connues (Shahbazi et *al.*, 2007). Ces résultats laissaient supposer une implication potentielle du FvW dans la biologie osseuse en contrôlant l'activité de l'OPG. Or dans la circulation sanguine, le FvW est lié au FVIII de la coagulation. C'est pour cela que nous avons recherché les effets du complexe FVIII/FvW sur l'ostéoclastogenèse, processus fondamental du remodelage osseux. Nous avons montré dans la première partie de ce manuscrit, que le complexe FVIII/FvW possédait une double activité sur l'ostéoclastogenèse. Non seulement, il inhibe de façon directe la différenciation ostéoclastique en se liant à RANKL mais il renforçe aussi la fonction inhibitrice de l'OPG. Puis, nous avons mis en évidence l'intervention du complexe FVIII/FvW dans l'interaction OPG / TRAIL. En se fixant à l'OPG, le complexe FVIII/FvW est capable d'empêcher l'inhibition de l'apoptose induite par TRAIL.

Ces résultats permettent d'expliquer en partie, le bénéfice sur la masse osseuse des traitements prophylactiques chez les patients hémophiles (Khawaji et *al.*, 2009). Il apparaît aussi clairement que le complexe FVIII/FvW intervient dans les activités pro- et anti-apoptotiques de TRAIL et d'OPG. Ces données ouvrent de nouvelles perspectives de recherche dans des domaines où l'OPG, TRAIL, RANKL et le complexe FVIII/FvW sont impliqués. Il est possible d'envisager une intervention du complexe FVIII/FvW dans la survenue des lésions athérosclérotiques et des calcifications vasculaires (Collin-Osdoby, 2004).

Les cellules des systèmes sanguin et osseux et leurs molécules régulatrices interviennent dans la physiopathologie de ces atteintes vasculaires. L'apparition de calcifications artérielles chez les souris déficientes pour l'OPG constituait une première preuve de l'implication de cette molécule dans la biologie vasculaire (Bucay et al., 1998). Pourtant, ces observations chez l'animal sont contradictoires avec les données cliniques. Les concentrations sériques d'OPG sont élévées chez des patients présentant des calcifications artérielles (Van Campenhout et Golledge, 2009 ; Ziegler et al., 2005), cependant le rôle exact de cette ptotéine dans les atteintes vasculaires est encore incertain. Tout comme l'OPG, l'intervention de RANKL dans des atteintes vasculaires a été documentée. RANKL stimule la transmigration des monocytes à travers la barrière endothéliale et facilite leur différenciation en ostéoclastes capables de résorber le tissu minéralisé dans les lésions athérosclérotiques avancées (Collin-Osdoby, 2004). TRAIL, un autre membre de la superfamille du TNF contribue également à la biologie vasculaire mais les données sur ce sujet sont relativement controversées. Il serait responsable de la déstabilisation de la plaque d'athérome en provoquant l'apoptose des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses (Pritzker et al., 2004 ; Sato et al., 2006). Pourtant certains auteurs lui attribuent un rôle protecteur et anti-inflammatoire (Secchiero et al., 2003; Secchiero et al., 2004; Zauli et al., 2003). L'implication des facteurs de coagulation FVIII et FvW dans la survenue de lésions vasculaires a été montrée : le FvW favorise la formation d'un thrombus par recrutement et adhérence des plaquettes à la surface endothéliale, tout en facilitant la génération de thrombine par le FVIII dont il maintient la biodisponibilité (Vischer, 2006). Une récente étude clinique vient confirmer ces observations : les patients hémophiles présentent, en effet, un risque plus faible de développer des lésions athérosclérotiques (Bilora et *al.*, 2006). Nos travaux s'inscrivent dans une meilleure compréhension de l'orchestration moléculaire et cellulaire de ces pathologies. Nous pouvons effectivement envisager que le complexe FVIII/FvW contrôle les concentrations sériques et module l'activité d'OPG, de RANKL et de TRAIL, puisque tous les trois se lient à ce complexe. En inhibant l'ostéoclastogenèse, il éviterait la déstabilisation de la plaque d'athérome par les ostéoclastes. En bloquant l'activité de l'OPG vis-à-vis de TRAIL, il induirait indirectement la mort par apoptose des cellules inflammatoires qui infiltrent la plaque d'athérome. Pour s'assurer du rôle du complexe FVIII/FvW dans les lésions athérosclérotiques, l'existence des interactions au sein de la circulation sanguine devra être examinée.

Le rôle de ces molécules pourrait être beaucoup plus ambigu. En effet, Zannettino et coll. ont montré que sous l'action de TNF α et d'IL-1, les cellules endothéliales libèrent de grande quantité de FvW et d'OPG (Zannettino et *al.*, 2005). De telles conditions inflammatoires existent dans l'athérosclérose. La libération de l'OPG pourrait permettre à la cellule endothéliale de se protéger de l'activité de TRAIL. Une étude de Shoppet et coll. montre d'ailleurs une colocalisation d'OPG et de TRAIL dans des régions de calcifications vasculaires chez des patients athérosclérotiques (Schoppet et *al.*, 2004).

Afin de clarifier le déroulement et la mise en place de ces lésions, ainsi que le rôle joué par les différents acteurs moléculaires, des travaux devront être menés à la fois sur les cellules endothéliales et sur les cellules osseuses. Les activités de l'OPG, de RANKL et de TRAIL sur la cellule endothéliale seront évalués en présence de complexe FVIII/FvW. Ces effets pourront être quantifiés en terme de prolifération et de survie cellulaires. Les fonctions de l'ostéoblaste (minéralisation, expression de RANKL et d'OPG) seront mesurées en présence de complexe FVIII/FvW.

L'activité directe du complexe FVIII/FvW sur RANKL que nous avons décrite dans l'ostéoclastogenèse sera explorée dans d'autres processus où RANKL intervient. La survie des cellules dendritiques par RANKL sera étudiée en présence du complexe FVIII/FvW. Ces résultats pourront être comparés aux données de la littérature sur le rôle des cellules dendritiques dans la dégradation du FVIII (Kaveri et *al.*, 2007) et dans l'athérosclérose (Niessner et Weyand, 2009).

Le FvW ne se fixe pas uniquement à l'OPG et au FVIII, il possède également un domaine de liaison à l'héparine. Nous pouvons donc envisager des études dans lesquelles l'héparine modifierait les activités du complexe FVIII/FvW. A ce titre, nous avons pu

observer qu'une fois l'héparine fixée au FvW, l'OPG n'est plus capable d'interagir avec ce facteur de la coagulation (figure 36). Nous envisageons de poursuivre ces travaux sur les interactions entre le FvW et ses partenaires (le FVIII, TRAIL, OPG, l'héparine) et d'étudier leurs conséquences biologiques.





Le FvW est immobilisé sur une chip C1. L'OPG est capable de se lier au FvW lorsque la chip est saturée par du PBS (pas de fixation au FvW, sensorgramme en pointillé). En revanche, l'OPG ne peut plus se fixer au FvW une fois le FvW saturé par de l'héparine (sensorgramme en trait plein).

La seconde partie de notre travail a mis en évidence l'intervention de l'héparine et de l'ensemble des GAGs dans le processus de différenciation ostéoclastique. Nous avons effectivement montré que les GAGs inhibent la résorption osseuse par perte d'adhérence des précurseurs et des ostéoclastes matures. Il est bien établi désormais que les GAGS et les PGs participent à de nombreux processus biologiques dans l'ensemble des tissus du corps. Dans la biologie osseuse, ils sont un réservoir important de facteurs de croissance (Lamoureux et *al.*, 2007a) et de cytokines comme l'OPG (Lamoureux et *al.*, 2009). Dans la biologie vasculaire, ils contrôlent des molécules impliquées dans le développement et la cicatrisation des vaisseaux comme le VEGF et les FGFs (Alexopoulou et *al.*, 2007). Nos travaux ont mis en avant l'importance des sulfatations et de la longueur des GAGs dans leur activité.

Les héparines de bas poids moléculaire ont des répercussions sur le tissu osseux bien moins importantes que les héparines non fractionnées : la perte osseuse est limitée (Rajgopal et *al.*, 2008). L'utilisation récente dans l'arsenal thérapeutique du fondaparinux vient confirmer le rôle de la taille des GAGs. Ce pentasaccharide synthétique ne présente a priori que des avantages. Contrairement à l'héparine, il ne se fixe à aucune protéine plasmatique et ne présente de ce fait aucune variation de biodisponibilité. Bien qu'aucune donnée clinique n'ait été rapportée à ce sujet, le fondaparinux ne semble pas avoir d'effet délétère sur le tissu osseux. Seule une étude *in vitro* indique qu'il ne modifie ni la différenciation ni la prolifération des ostéoblastes (Handschin et *al.*, 2005). Il serait intéressant d'étendre ces résultats à l'ostéoclaste, comme nous l'avons effectué avec l'héparine. D'autre part, nous pourrions également évaluer les effets de ce pentasaccharide sur les activités de l'OPG, puisque nous avons montré par des études de résonance plasmonique de surface que de petits oligosaccharides se lient à l'OPG.

Les sulfatations des GAGs sont des caractéristiques structurales déterminantes dans l'activité des GAGs. Nous avons pu le montrer par l'utilisation de GAGs partiellement ou totalement désulfatés. Ces GAGs modifiés inhibaient la différenciation ostéoclastique dans une moindre mesure que l'héparine native. Ce n'est pas la seule étude qui relate l'importance des sulfatations. La désulfatation des GAGs à la surface des cellules ostéoblastiques MG-63 provoque un retard de minéralisation (Kumarasuriyar et *al.*, 2009). Les sulfatases qui hydrolysent les esters de sulfates de nombreux substrats comme les GAGs ou les sulfolipides interviennent dans l'activité de ces molécules sulfatées. Récemment, il a été montré que la désulfatation des GAGs était un processus essentiel dans biologie du cartilage et de l'organogenèse, notamment en contrôlant les concentrations de FGF (Khatri et Schipani, 2008). Nous pourrions évaluer l'activité de ces enzymes dans des processus biologiques contrôlés par les GAGs et les PGs (différenciation cellulaire, angiogenèse, adhérence cellulaire).

Les potentiels thérapeutiques des GAGs ne se limitent pas aux traitements des maladies thrombo-emboliques ou au traitement symptomatique de l'arthrose (chondroïtine sulfate : Chondrosulf®). Les GAGs peuvent en effet être utilisés comme inhibiteurs des héparanases. Ces enzymes sont responsables de la dégradation des HSPGs et participent de ce fait à de nombreux processus biologiques. De manière physiologique, les héparanases favorisent l'angiogenèse en libérant les facteus pro-angiogéniques séquestrés (VEGF, FGFs) par les HSPGs de la matrice extracellulaire et en générant de petits fragments d'héparane sulfate qui améliorent la liaison du bFGF à son récepteur et donc sa signalisation (Elkin et *al.*, 2001). Les

héparanases sont également impliquées dans l'immunité en soutenant la formation de vaisseaux lymphatiques (Vlodavsky et *al.*, 2007). En revanche, elles interviennent dans la progression tumorale notamment par leurs potentiels angiogénique et métastatique (Sanderson et *al.*, 2004). C'est à ce titre que des firmes pharmaceutiques développent de courtes structures saccharidiques pour bloquer l'activité des héparanases et ainsi limiter l'angiogenèse et les phénomènes métastatiques. La plus connue de ces molécules est le Pi-88. Elle a montré son efficacité dans les phases I et II sur différents types de tumeurs dont le mélanome et les carcinomes hépatocellulaires (Kudchadkar et *al.*, 2008). Cependant l'apparition d'anticorps menant à une thrombocytopénie a limité son usage chez certains patients (Kudchadkar et *al.*, 2008). Aucune donnée en revanche n'est disponible concernant les effets de ce traitement sur la masse osseuse. Comme le montrent nos travaux, ces petites structures saccharidiques n'auraient qu'un faible impact sur la résorption osseuse. Toutefois, il serait intéressant d'évaluer l'activité du fondaparinux sur les cellules osseuses *in vitro* et son impact sur l'architecture osseuse *in vivo*.

Les patients atteints de cancers présentent une hypercoagulabilité due en partie à l'élévation des taux sériques de FVIII et de FvW (Dogan et Demirkazik, 2005). Cette situation entraîne l'apparition d'un thrombus et la survenue d'accidents thrombo-emboliques tels que des embolies pulmonaires ou des ischémies cardiaques thrombo-emboliques qui peuvent être une cause de décès. L'héparine en inhibant la cascade de coagulation prévient la formation du thrombus et augmente par conséquent l'espérance de vie des patients (Vlodavsky et al., 2007). Cependant son utilisation est limitée par les risques de saignements qu'elle peut engendrer. L'héparine présenterait également des propriétés anti-métastatiques (Vlodavsky et al., 2007). Les mécanismes mis en jeu ne sont pas encore totalement élucidés, toutefois l'inhibition des héparanases constitue une des explications potentielles. Le blocage de l'adhérence entre les plaquettes et les cellules tumorales ainsi que l'inhibition des interactions cellulaires via les sélectines sont d'autres hypothèses actuellement avancées (Borsig et al., 2001; Hostettler et al., 2007). Ces hypothèses rejoignent d'une certaine façon nos travaux complémentaires présentés dans la seconde partie du manuscrit. En effet, l'héparine et l'ensemble des glycosaminoglycanes empêchent l'adhérence des précurseurs monocytaires. Cette observation pourrait participer à l'activité anti-tumorale des GAGs en évitant le recrutement de monocytes / macrophages sur le site tumoral qui entretiennent la croissance tumorale par la libération de cytokines pro-inflammatoires (TNF, IL-1). Des études chez des animaux porteurs de tumeurs peuvent être envisagées. En marquant les cellules d'origine monocytaire / macrophagique par une sonde fluorescente et en les réinjectant à

l'animal, nous pourrions suivre ces monocytes et étudier les effets de l'héparine et de ses dérivés sur leur devenir au sein de la tumeur.

Nous avons évoqué ci-dessus que les concentrations plasmatiques de FVIII et de FvW étaient augmentées dans les pathologies tumorales. Il serait intéressant de comprendre les origines et les répercussions sur la tumeur d'une telle augmentation en comparaison de nos travaux (article 1). Nous pourrions rechercher les sites de production privilégiés. Certaines données de la littérature nous laissent à penser que le FvW pourrait avoir comme origine les cellules endothéliales des vaisseaux de la tumeur. Les conditions inflammatoires présentes au sein de la masse tumorale augmentent en effet la libération du FvW (Zannettino et al., 2005) par les cellules endothéliales. La concentration de FvW à l'intérieur de la tumeur pourrait être comparée à la concentration de ce facteur dans la circulation générale. Il faudra également évaluer la capacité de ce FvW libéré à se lier au FVIII de la coagulation pour former le complexe FVIII/FvW. D'après nos travaux, si une augmentation de concentration du complexe FVIII/FvW devait être observée, elle serait un moyen pour l'organisme de lutter contre la progression tumorale. En effet, en se fixant à l'OPG, le complexe FVIII/FvW augmente le pouvoir pro-apoptotique de la cytokine TRAIL. Mais peut-on envisager de traiter les cancers par l'administration de FvW et de FVIII ? Les risques de thrombose veineuse seraient potentiellement plus élevés et le développement d'anticorps anti-FVIII serait possible, ce qui pourrait conduire à des hémophilies secondaires. A ce titre, certains patients cancéreux développent des hémophilies secondaires par acquisition d'inhibiteurs du FVIII (Franchini et al., 2008). Un tout récent rapport suggère la production par l'environnement tumoral d'antigènes FVIII-like que le système immunitaire reconnaît et qui conduit à une hémophilie A (van Durme et al., 2008). Ces observations et nos travaux permettent d'émettre certaines hypothèses. La production de ces antigènes FVIII-like n'est-il pas un moyen pour la cellule tumorale de se protéger de l'effet du complexe FVIII/FvW sur TRAIL ? La tumeur par ce biais peut également faciliter l'angiogenèse indispensable à sa progression. En effet, les saignements causés par l'hémophilie engendrent des conditions inflammatoires proprices à l'angiogenèse. Des investigations plus poussées sur le rôle exact du complexe FVIII/FvW dans les pathologies tumorales sont donc nécessaires.

La vascularisation de l'os joue un rôle important dans la formation et le développement du squelette. Les vaisseaux apportent les éléments nécessaires à la prolifération, la différenciation et la survie des ostéoblastes et des ostéoclastes qui assurent le processus de remodelage osseux. Ce processus est essentiel dans le maintien des propriétés biomécaniques du squelette. Les vaisseaux qui colonisent le tissu osseux participent activement à certaines fonctions de l'os comme l'équilibre phophocalcique (transport des ions libérés lors du remodelage) ou l'hématopoïèse (prise en charge des cellules sanguines issues de la moelle osseuse). Pour assurer ces activités, le tissu osseux et le système vasculaire entretiennent des contacts cellulaires (recrutement des précurseurs osseux par l'endothélium) et communiquent par un réseau complexe de messagers solubles (RANKL, OPG, VEGF...).

Nous décrivons, à travers nos travaux de recherche, l'implication du complexe FVIII/Facteur de von Willebrand et de l'héparine, deux molécules de l'homéostasie vasculaire, dans le contrôle de la différenciation ostéoclastique. Nous avons déterminé les mécanismes mis en jeu : interaction moléculaire directe et activité sur l'adhérence cellulaire. Ces données viennent compléter les différentes voies de communication entre les systèmes osseux et vasculaire.

ANNEXES

Bibliographie

Abshire, T.C. 2006. Prophylaxis and von Willebrand's disease (vWD). Thromb Res 118 Suppl 1: S3-7.

Alam, A.S., Gallagher, A., Shankar, V., Ghatei, M.A., Datta, H.K., Huang, C.L., Moonga, B.S., Chambers, T.J., Bloom, S.R., et Zaidi, M. 1992. Endothelin inhibits osteoclastic bone resorption by a direct effect on cell motility: implications for the vascular control of bone resorption. Endocrinology 130(6): 3617-3624.

Alexopoulou, A.N., Multhaupt, H.A., et Couchman, J.R. 2007. Syndecans in wound healing, inflammation and vascular biology. Int J Biochem Cell Biol 39(3): 505-528.

Anderson, D.M., Maraskovsky, E., Billingsley, W.L., Dougall, W.C., Tometsko, M.E., Roux, E.R., Teepe, M.C., DuBose, R.F., Cosman, D., et Galibert, L. 1997. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. Nature 390(6656): 175-179.

Ando, K., Mori, K., Redini, F., et Heymann, D. 2008. RANKL/RANK/OPG: key therapeutic target in bone oncology. Curr Drug Discov Technol 5(3): 263-268.

Aragon-Ching, J.B., et Dahut, W.L. 2008. The role of angiogenesis inhibitors in prostate cancer. Cancer J 14(1): 20-25.

Arikawa-Hirasawa, E., Watanabe, H., Takami, H., Hassell, J.R., et Yamada, Y. 1999. Perlecan is essential for cartilage and cephalic development. Nat Genet 23(3): 354-358.

Ariyoshi, W., Takahashi, T., Kanno, T., Ichimiya, H., Takano, H., Koseki, T., et Nishihara, T. 2005. Mechanisms involved in enhancement of osteoclast formation and function by low molecular weight hyaluronic acid. J Biol Chem 280(19): 18967-18972.

Ariyoshi, W., Takahashi, T., Kanno, T., Ichimiya, H., Shinmyouzu, K., Takano, H., Koseki, T., et Nishihara, T. 2008. Heparin inhibits osteoclastic differentiation and function. J Cell Biochem 103(6): 1707-1717.

Armstrong, A.P., Miller, R.E., Jones, J.C., Zhang, J., Keller, E.T., et Dougall, W.C. 2008. RANKL acts directly on RANK-expressing prostate tumor cells and mediates migration and expression of tumor metastasis genes. Prostate 68(1): 92-104.

Azuma, Y., Kaji, K., Katogi, R., Takeshita, S., et Kudo, A. 2000. Tumor necrosis factor-alpha induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts. J Biol Chem 275(7): 4858-4864.

Barbour, L.A., Kick, S.D., Steiner, J.F., LoVerde, M.E., Heddleston, L.N., Lear, J.L., Baron, A.E., et Barton, P.L. 1994. A prospective study of heparin-induced osteoporosis in pregnancy using bone densitometry. Am J Obstet Gynecol 170(3): 862-869.

Barnes, C., Wong, P., Egan, B., Speller, T., Cameron, F., Jones, G., Ekert, H., et Monagle, P. 2004. Reduced bone density among children with severe hemophilia. Pediatrics 114(2): e177-181.

Baud'huin, M., Duplomb, L., Ruiz Velasco, C., Fortun, Y., Heymann, D., et Padrines, M. 2007a. Key roles of the OPG-RANK-RANKL system in bone oncology. Expert Rev Anticancer Ther 7(2): 221-232.

Baud'huin, M., Lamoureux, F., Duplomb, L., Redini, F., et Heymann, D. 2007b. RANKL, RANK, osteoprotegerin: key partners of osteoimmunology and vascular diseases. Cell Mol Life Sci 29: 29.

Bellido, T., Borba, V.Z., Roberson, P., et Manolagas, S.C. 1997. Activation of the Janus kinase/STAT (signal transducer and activator of transcription) signal transduction pathway by interleukin-6-type cytokines promotes osteoblast differentiation. Endocrinology 138(9): 3666-3676.

Ben-Tal Cohen, E., Hohensinner, P.J., Kaun, C., Maurer, G., Huber, K., et Wojta, J. 2007. Statins decrease TNF-alpha-induced osteoprotegerin production by endothelial cells and smooth muscle cells in vitro. Biochem Pharmacol 73(1): 77-83.

Bennett, C.N., Longo, K.A., Wright, W.S., Suva, L.J., Lane, T.F., Hankenson, K.D., et MacDougald, O.A. 2005. Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. Proc Natl Acad Sci U S A 102(9): 3324-3329.

Bernfield, M., Gotte, M., Park, P.W., Reizes, O., Fitzgerald, M.L., Lincecum, J., et Zako, M. 1999. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. Annu Rev Biochem 68: 729-777.

Bi, Y., Stuelten, C.H., Kilts, T., Wadhwa, S., Iozzo, R.V., Robey, P.G., Chen, X.D., et Young, M.F. 2005. Extracellular matrix proteoglycans control the fate of bone marrow stromal cells. J Biol Chem 280(34): 30481-30489.

Bi, Y., Nielsen, K.L., Kilts, T.M., Yoon, A., M, A.K., Wimer, H.F., Greenfield, E.M., Heegaard, A.M., et Young, M.F. 2006. Biglycan deficiency increases osteoclast differentiation and activity due to defective osteoblasts. Bone 38(6): 778-786.

Bilora, F., Zanon, E., Petrobelli, F., Cavraro, M., Prandoni, P., Pagnan, A., et Girolami, A. 2006. Does hemophilia protect against atherosclerosis? A case-control study. Clin Appl Thromb Hemost 12(2): 193-198.

Blair, H.C., Kahn, A.J., Crouch, E.C., Jeffrey, J.J., et Teitelbaum, S.L. 1986. Isolated osteoclasts resorb the organic and inorganic components of bone. J Cell Biol 102(4): 1164-1172.

Blanchard, F., Duplomb, L., Baud'huin, M., et Brounais, B. 2009. The dual role of IL-6-type cytokines on bone remodeling and bone tumors. Cytokine Growth Factor Rev 20(1): 19-28.

Bonnelye, E., Chabadel, A., Saltel, F., et Jurdic, P. 2008. Dual effect of strontium ranelate: stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption in vitro. Bone 42(1): 129-138.

Borchiellini, A., Fijnvandraat, K., ten Cate, J.W., Pajkrt, D., van Deventer, S.J., Pasterkamp, G., Meijer-Huizinga, F., Zwart-Huinink, L., Voorberg, J., et van Mourik, J.A. 1996.

Quantitative analysis of von Willebrand factor propeptide release in vivo: effect of experimental endotoxemia and administration of 1-deamino-8-D-arginine vasopressin in humans. Blood 88(8): 2951-2958.

Borset, M., Hjertner, O., Yaccoby, S., Epstein, J., et Sanderson, R.D. 2000. Syndecan-1 is targeted to the uropods of polarized myeloma cells where it promotes adhesion and sequesters heparin-binding proteins. Blood 96(7): 2528-2536.

Borsig, L., Wong, R., Feramisco, J., Nadeau, D.R., Varki, N.M., et Varki, A. 2001. Heparin and cancer revisited: mechanistic connections involving platelets, P-selectin, carcinoma mucins, and tumor metastasis. Proc Natl Acad Sci U S A 98(6): 3352-3357.

Bosshardt, D.D. 2005. Are cementoblasts a subpopulation of osteoblasts or a unique phenotype? J Dent Res 84(5): 390-406.

Boyce, B.F., et Xing, L. 2007. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. Arthritis Res Ther 9 Suppl 1(1): S1.

Boyle, W.J., Simonet, W.S., et Lacey, D.L. 2003. Osteoclast differentiation and activation. Nature 423(6937): 337-342.

Brandi, M.L., et Collin-Osdoby, P. 2006. Vascular biology and the skeleton. J Bone Miner Res 21(2): 183-192.

Brounais, B., David, E., Chipoy, C., Trichet, V., Ferre, V., Charrier, C., Duplomb, L., Berreur, M., Redini, F., Heymann, D., et Blanchard, F. 2009. Long term oncostatin M treatment induces an osteocyte-like differentiation on osteosarcoma and calvaria cells. Bone 44(5): 830-839.

Brown, K.D., Claudio, E., et Siebenlist, U. 2008. The roles of the classical and alternative nuclear factor-kappaB pathways: potential implications for autoimmunity and rheumatoid arthritis. Arthritis Res Ther 10(4): 212.

Bucay, N., Sarosi, I., Dunstan, C.R., Morony, S., Tarpley, J., Capparelli, C., Scully, S., Tan, H.L., Xu, W., Lacey, D.L., Boyle, W.J., et Simonet, W.S. 1998. osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. Genes Dev 12(9): 1260-1268.

Cao, J.J., Singleton, P.A., Majumdar, S., Boudignon, B., Burghardt, A., Kurimoto, P., Wronski, T.J., Bourguignon, L.Y., et Halloran, B.P. 2005. Hyaluronan increases RANKL expression in bone marrow stromal cells through CD44. J Bone Miner Res 20(1): 30-40.

Cao, Y. 2009. Tumor angiogenesis and molecular targets for therapy. Front Biosci 14: 3962-3973.

Castaldo, G., D'Argenio, V., Nardiello, P., Zarrilli, F., Sanna, V., Rocino, A., Coppola, A., Di Minno, G., et Salvatore, F. 2007. Haemophilia A: molecular insights. Clin Chem Lab Med 45(4): 450-461.

Chang, E.J., Kim, H.J., Ha, J., Kim, H.J., Ryu, J., Park, K.H., Kim, U.H., Lee, Z.H., Kim, H.M., Fisher, D.E., et Kim, H.H. 2007. Hyaluronan inhibits osteoclast differentiation via Tolllike receptor 4. J Cell Sci 120(Pt 1): 166-176.

Chen, L., Wei, X.Q., Evans, B., Jiang, W., et Aeschlimann, D. 2008. IL-23 promotes osteoclast formation by up-regulation of receptor activator of NF-kappaB (RANK) expression in myeloid precursor cells. Eur J Immunol 38(10): 2845-2854.

Civitelli, R. 2008. Cell-cell communication in the osteoblast/osteocyte lineage. Arch Biochem Biophys 473(2): 188-192.

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

Collin-Osdoby, P. 2004. Regulation of vascular calcification by osteoclast regulatory factors RANKL and osteoprotegerin. Circ Res 95(11): 1046-1057.

Costell, M., Gustafsson, E., Aszodi, A., Morgelin, M., Bloch, W., Hunziker, E., Addicks, K., Timpl, R., et Fassler, R. 1999. Perlecan maintains the integrity of cartilage and some basement membranes. J Cell Biol 147(5): 1109-1122.

Crotti, T.N., Sharma, S.M., Fleming, J.D., Flannery, M.R., Ostrowski, M.C., Goldring, S.R., et McHugh, K.P. 2008. PU.1 and NFATc1 mediate osteoclastic induction of the mouse beta3 integrin promoter. J Cell Physiol 215(3): 636-644.

Dahlman, T.C., Sjoberg, H.E., et Ringertz, H. 1994. Bone mineral density during long-term prophylaxis with heparin in pregnancy. Am J Obstet Gynecol 170(5 Pt 1): 1315-1320.

Dai, J., et Rabie, A.B. 2007. VEGF: an essential mediator of both angiogenesis and endochondral ossification. J Dent Res 86(10): 937-950.

Darowish, M., Rahman, R., Li, P., Bukata, S.V., Gelinas, J., Huang, W., Flick, L.M., Schwarz, E.M., et O'Keefe, R.J. 2009. Reduction of particle-induced osteolysis by interleukin-6 involves anti-inflammatory effect and inhibition of early osteoclast precursor differentiation. Bone.

Datta, H.K., Ng, W.F., Walker, J.A., Tuck, S.P., et Varanasi, S.S. 2008. The cell biology of bone metabolism. J Clin Pathol 61(5): 577-587.

Davis, R.L., Weintraub, H., et Lassar, A.B. 1987. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. Cell 51(6): 987-1000.

Dhore, C.R., Cleutjens, J.P., Lutgens, E., Cleutjens, K.B., Geusens, P.P., Kitslaar, P.J., Tordoir, J.H., Spronk, H.M., Vermeer, C., et Daemen, M.J. 2001. Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques. Arterioscler Thromb Vasc Biol 21(12): 1998-2003.

Diaz-Flores, L., Gutierrez, R., Madrid, J.F., Varela, H., Valladares, F., Acosta, E., Martin-Vasallo, P., et Diaz-Flores, L., Jr. 2009. Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche. Histol Histopathol 24(7): 909-969.

Dogan, M., et Demirkazik, A. 2005. Venous thromboembolism in patients with cancer and its relationship to the coagulation cascade and vascular endothelial growth factor. Support Cancer Ther 3(1): 28-34.

Doherty, M.J., Ashton, B.A., Walsh, S., Beresford, J.N., Grant, M.E., et Canfield, A.E. 1998. Vascular pericytes express osteogenic potential in vitro and in vivo. J Bone Miner Res 13(5): 828-838.

Douketis, J.D., Ginsberg, J.S., Burrows, R.F., Duku, E.K., Webber, C.E., et Brill-Edwards, P. 1996. The effects of long-term heparin therapy during pregnancy on bone density. A prospective matched cohort study. Thromb Haemost 75(2): 254-257.

Duplomb, L., Baud'huin, M., Charrier, C., Berreur, M., Trichet, V., Blanchard, F., et Heymann, D. 2008. Interleukin-6 inhibits receptor activator of nuclear factor kappaB ligand-induced osteoclastogenesis by diverting cells into the macrophage lineage: key role of Serine727 phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 3. Endocrinology 149(7): 3688-3697.

Elkin, M., Ilan, N., Ishai-Michaeli, R., Friedmann, Y., Papo, O., Pecker, I., et Vlodavsky, I. 2001. Heparanase as mediator of angiogenesis: mode of action. Faseb J 15(9): 1661-1663.

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

Eppert, K., Wunder, J.S., Aneliunas, V., Kandel, R., et Andrulis, I.L. 2005. von Willebrand factor expression in osteosarcoma metastasis. Mod Pathol 18(3): 388-397.

Erices, A., Conget, P., Rojas, C., et Minguell, J.J. 2002. Gp130 activation by soluble interleukin-6 receptor/interleukin-6 enhances osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Exp Cell Res 280(1): 24-32.

Eriksen, E.F., Eghbali-Fatourechi, G.Z., et Khosla, S. 2007. Remodeling and vascular spaces in bone. J Bone Miner Res 22(1): 1-6.

Fata, J.E., Kong, Y.Y., Li, J., Sasaki, T., Irie-Sasaki, J., Moorehead, R.A., Elliott, R., Scully, S., Voura, E.B., Lacey, D.L., Boyle, W.J., Khokha, R., et Penninger, J.M. 2000. The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. Cell 103(1): 41-50.

Felix, R., Cecchini, M.G., et Fleisch, H. 1990. Macrophage colony stimulating factor restores in vivo bone resorption in the op/op osteopetrotic mouse. Endocrinology 127(5): 2592-2594.

Folwarczna, J., Sliwinski, L., Janiec, W., et Pikul, M. 2005. Effects of standard heparin and low-molecular-weight heparins on the formation of murine osteoclasts in vitro. Pharmacol Rep 57(5): 635-645.

Franchini, M., Targher, G., Manzato, F., et Lippi, G. 2008. Acquired factor VIII inhibitors in oncohematology: a systematic review. Crit Rev Oncol Hematol 66(3): 194-199.

Fuller, K., Chambers, T.J., et Gallagher, A.C. 1991. Heparin augments osteoclast resorptionstimulating activity in serum. J Cell Physiol 147(2): 208-214.

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

Gandhi, N.S., et Mancera, R.L. 2008. The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. Chem Biol Drug Des 72(6): 455-482.

Ganz, P.R., Atkins, J.S., Palmer, D.S., Dudani, A.K., Hashemi, S., et Luison, F. 1991. Definition of the affinity of binding between human von Willebrand factor and coagulation factor VIII. Biochem Biophys Res Commun 180(1): 231-237.

Gaur, T., Lengner, C.J., Hovhannisyan, H., Bhat, R.A., Bodine, P.V., Komm, B.S., Javed, A., van Wijnen, A.J., Stein, J.L., Stein, G.S., et Lian, J.B. 2005. Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. J Biol Chem 280(39): 33132-33140.

Geboes, L., Dumoutier, L., Kelchtermans, H., Schurgers, E., Mitera, T., Renauld, J.C., et Matthys, P. 2009. Proinflammatory role of the Th17 cytokine interleukin-22 in collageninduced arthritis in C57BL/6 mice. Arthritis Rheum 60(2): 390-395.

Georges, S., Ruiz Velasco, C., Trichet, V., Fortun, Y., Heymann, D., et Padrines, M. 2009. Proteases and bone remodelling. Cytokine Growth Factor Rev 20(1): 29-41.

Gerber, H.P., et Ferrara, N. 2000. Angiogenesis and bone growth. Trends Cardiovasc Med 10(5): 223-228.

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

Glowacki, J., Rey, C., Glimcher, M.J., Cox, K.A., et Lian, J. 1991. A role for osteocalcin in osteoclast differentiation. J Cell Biochem 45(3): 292-302.

Gotzos, B., Schöni-Affolter, F., et Celio, M. 2007. Os compact et spongieux Page consultée le. Adresse:

http://www.unifr.ch/anatomy/elearningfree/francais/stuetzgewebe/knochen/popup_knochen/k ortikalis.php Grellier, M., Ferreira-Tojais, N., Bourget, C., Bareille, R., Guillemot, F., et Amedee, J. 2009. Role of vascular endothelial growth factor in the communication between human osteoprogenitors and endothelial cells. J Cell Biochem 106(3): 390-398.

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

Gurevitch, O., et Slavin, S. 2006. The hematological etiology of osteoporosis. Med Hypotheses 67(4): 729-735.

Hadjidakis, D.J., et Androulakis, II. 2006. Bone remodeling. Ann N Y Acad Sci 1092: 385-396.

Hagemann, T., Biswas, S.K., Lawrence, T., Sica, A., et Lewis, C.E. 2009. Regulation of macrophage function in tumors: the multifaceted role of NF-kappaB. Blood 113(14): 3139-3146.

Hallak, L.K., Spillmann, D., Collins, P.L., et Peeples, M.E. 2000. Glycosaminoglycan sulfation requirements for respiratory syncytial virus infection. J Virol 74(22): 10508-10513.

Handschin, A.E., Trentz, O.A., Hoerstrup, S.P., Kock, H.J., Wanner, G.A., et Trentz, O. 2005. Effect of low molecular weight heparin (dalteparin) and fondaparinux (Arixtra) on human osteoblasts in vitro. Br J Surg 92(2): 177-183.

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

Hayman, A.R. 2008. Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and the osteoclast/immune cell dichotomy. Autoimmunity 41(3): 218-223.

Heinrich, P.C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H.M., Muller-Newen, G., et Schaper, F. 2003. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. Biochem J 374(Pt 1): 1-20.

Helas, S., Goettsch, C., Schoppet, M., Zeitz, U., Hempel, U., Morawietz, H., Kostenuik, P.J., Erben, R.G., et Hofbauer, L.C. 2009. Inhibition of receptor activator of NF-kappaB ligand by denosumab attenuates vascular calcium deposition in mice. Am J Pathol 175(2): 473-478.

Heymann, D., et Rousselle, A.V. 2000. gp130 Cytokine family and bone cells. Cytokine 12(10): 1455-1468.

Hikita, A., Yana, I., Wakeyama, H., Nakamura, M., Kadono, Y., Oshima, Y., Nakamura, K., Seiki, M., et Tanaka, S. 2006. Negative regulation of osteoclastogenesis by ectodomain shedding of receptor activator of NF-kappaB ligand. J Biol Chem 281(48): 36846-36855.

Hill, P.A. 1998. Bone remodelling. Br J Orthod 25(2): 101-107.

Hirata, M., Kobayashi, M., Takita, M., Matsumoto, C., Miyaura, C., et Inada, M. 2009. Hyaluronan inhibits bone resorption by suppressing prostaglandin E synthesis in osteoblasts treated with interleukin-1. Biochem Biophys Res Commun 381(2): 139-143.

Hofbauer, L.C., Khosla, S., Dunstan, C.R., Lacey, D.L., Boyle, W.J., et Riggs, B.L. 2000. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. J Bone Miner Res 15(1): 2-12.

Holen, I., Croucher, P.I., Hamdy, F.C., et Eaton, C.L. 2002. Osteoprotegerin (OPG) is a survival factor for human prostate cancer cells. Cancer Res 62(6): 1619-1623.

Holen, I., Cross, S.S., Neville-Webbe, H.L., Cross, N.A., Balasubramanian, S.P., Croucher, P.I., Evans, C.A., Lippitt, J.M., Coleman, R.E., et Eaton, C.L. 2005. Osteoprotegerin (OPG) expression by breast cancer cells in vitro and breast tumours in vivo--a role in tumour cell survival? Breast Cancer Res Treat 92(3): 207-215.

Holen, I., et Shipman, C.M. 2006. Role of osteoprotegerin (OPG) in cancer. Clin Sci (Lond) 110(3): 279-291.

Hollestelle, M.J., Thinnes, T., Crain, K., Stiko, A., Kruijt, J.K., van Berkel, T.J., Loskutoff, D.J., et van Mourik, J.A. 2001. Tissue distribution of factor VIII gene expression in vivo--a closer look. Thromb Haemost 86(3): 855-861.

Holtrop, M.E., et King, G.J. 1977. The ultrastructure of the osteoclast and its functional implications. Clin Orthop Relat Res 123(123): 177-196.

Hostettler, N., Naggi, A., Torri, G., Ishai-Michaeli, R., Casu, B., Vlodavsky, I., et Borsig, L. 2007. P-selectin- and heparanase-dependent antimetastatic activity of non-anticoagulant heparins. Faseb J 21(13): 3562-3572.

Hsu, H., Lacey, D.L., Dunstan, C.R., Solovyev, I., Colombero, A., Timms, E., Tan, H.L., Elliott, G., Kelley, M.J., Sarosi, I., Wang, L., Xia, X.Z., Elliott, R., Chiu, L., Black, T., Scully, S., Capparelli, C., Morony, S., Shimamoto, G., Bass, M.B., et Boyle, W.J. 1999. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. Proc Natl Acad Sci U S A 96(7): 3540-3545.

Ikeda, T., Kasai, M., Utsuyama, M., et Hirokawa, K. 2001. Determination of three isoforms of the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and their differential expression in bone and thymus. Endocrinology 142(4): 1419-1426.

Irie, A., Takami, M., Kubo, H., Sekino-Suzuki, N., Kasahara, K., et Sanai, Y. 2007. Heparin enhances osteoclastic bone resorption by inhibiting osteoprotegerin activity. Bone 5: 5.

Ishida, A., Fujita, N., Kitazawa, R., et Tsuruo, T. 2002. Transforming growth factor-beta induces expression of receptor activator of NF-kappa B ligand in vascular endothelial cells derived from bone. J Biol Chem 277(29): 26217-26224.

Jacquemin, M., Neyrinck, A., Hermanns, M.I., Lavend'homme, R., Rega, F., Saint-Remy, J.M., Peerlinck, K., Van Raemdonck, D., et Kirkpatrick, C.J. 2006. FVIII production by human lung microvascular endothelial cells. Blood 108(2): 515-517.

Jones, D.H., Nakashima, T., Sanchez, O.H., Kozieradzki, I., Komarova, S.V., Sarosi, I., Morony, S., Rubin, E., Sarao, R., Hojilla, C.V., Komnenovic, V., Kong, Y.Y., Schreiber, M., Dixon, S.J., Sims, S.M., Khokha, R., Wada, T., et Penninger, J.M. 2006. Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. Nature 440(7084): 692-696.

Kaden, J.J., Bickelhaupt, S., Grobholz, R., Haase, K.K., Sarikoc, A., Kilic, R., Brueckmann, M., Lang, S., Zahn, I., Vahl, C., Hagl, S., Dempfle, C.E., et Borggrefe, M. 2004. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulate aortic valve calcification. J Mol Cell Cardiol 36(1): 57-66.

Kanazawa, K., et Kudo, A. 2005. Self-assembled RANK induces osteoclastogenesis ligandindependently. J Bone Miner Res 20(11): 2053-2060.

Kartsogiannis, V., Zhou, H., Horwood, N.J., Thomas, R.J., Hards, D.K., Quinn, J.M., Niforas, P., Ng, K.W., Martin, T.J., et Gillespie, M.T. 1999. Localization of RANKL (receptor activator of NF kappa B ligand) mRNA and protein in skeletal and extraskeletal tissues. Bone 25(5): 525-534.

Kasama, T., Isozaki, T., Odai, T., Matsunawa, M., Wakabayashi, K., Takeuchi, H.T., Matsukura, S., Adachi, M., Tezuka, M., et Kobayashi, K. 2007. Expression of angiopoietin-1 in osteoblasts and its inhibition by tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma. Transl Res 149(5): 265-273.

Kaveri, S.V., Dasgupta, S., Andre, S., Navarrete, A.M., Repesse, Y., Wootla, B., et Lacroix-Desmazes, S. 2007. Factor VIII inhibitors: role of von Willebrand factor on the uptake of factor VIII by dendritic cells. Haemophilia 13 Suppl 5: 61-64.

Khatri, R., et Schipani, E. 2008. About the importance of being desulfated. Genes Dev 22(20): 2750-2754.

Khawaji, M., Akesson, K., et Berntorp, E. 2009. Long-term prophylaxis in severe haemophilia seems to preserve bone mineral density. Haemophilia 15(1): 261-266.

Kim, H.H., Shin, H.S., Kwak, H.J., Ahn, K.Y., Kim, J.H., Lee, H.J., Lee, M.S., Lee, Z.H., et Koh, G.Y. 2003. RANKL regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Faseb J 17(14): 2163-2165.

Kim, J.H., Jin, H.M., Kim, K., Song, I., Youn, B.U., Matsuo, K., et Kim, N. 2009. The mechanism of osteoclast differentiation induced by IL-1. J Immunol 183(3): 1862-1870.

Kim, N.S., Kim, H.J., Koo, B.K., Kwon, M.C., Kim, Y.W., Cho, Y., Yokota, Y., Penninger, J.M., et Kong, Y.Y. 2006. Receptor activator of NF-kappaB ligand regulates the proliferation of mammary epithelial cells via Id2. Mol Cell Biol 26(3): 1002-1013.

Kim, S., Yamazaki, M., Shevde, N.K., et Pike, J.W. 2007. Transcriptional control of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand by the protein kinase A activator forskolin and the transmembrane glycoprotein 130-activating cytokine, oncostatin M, is exerted through multiple distal enhancers. Mol Endocrinol 21(1): 197-214.

Kim, Y., Sato, K., Asagiri, M., Morita, I., Soma, K., et Takayanagi, H. 2005. Contribution of nuclear factor of activated T cells c1 to the transcriptional control of immunoreceptor osteoclast-associated receptor but not triggering receptor expressed by myeloid cells-2 during osteoclastogenesis. J Biol Chem 280(38): 32905-32913.

Kim, Y.M., Kim, Y.M., Lee, Y.M., Kim, H.S., Kim, J.D., Choi, Y., Kim, K.W., Lee, S.Y., et Kwon, Y.G. 2002. TNF-related activation-induced cytokine (TRANCE) induces angiogenesis through the activation of Src and phospholipase C (PLC) in human endothelial cells. J Biol Chem 277(9): 6799-6805.

Kindle, L., Rothe, L., Kriss, M., Osdoby, P., et Collin-Osdoby, P. 2006. Human microvascular endothelial cell activation by IL-1 and TNF-alpha stimulates the adhesion and transendothelial migration of circulating human CD14+ monocytes that develop with RANKL into functional osteoclasts. J Bone Miner Res 21(2): 193-206.

Kitamura, H., Kawata, H., Takahashi, F., Higuchi, Y., Furuichi, T., et Ohkawa, H. 1995. Bone marrow neutrophilia and suppressed bone turnover in human interleukin-6 transgenic mice. A cellular relationship among hematopoietic cells, osteoblasts, and osteoclasts mediated by stromal cells in bone marrow. Am J Pathol 147(6): 1682-1692.

Klein, B., Zhang, X.G., Jourdan, M., Boiron, J.M., Portier, M., Lu, Z.Y., Wijdenes, J., Brochier, J., et Bataille, R. 1990. Interleukin-6 is the central tumor growth factor in vitro and in vivo in multiple myeloma. Eur Cytokine Netw 1(4): 193-201.

Knothe Tate, M.L., Adamson, J.R., Tami, A.E., et Bauer, T.W. 2004. The osteocyte. Int J Biochem Cell Biol 36(1): 1-8.

Knowles, H.J., et Athanasou, N.A. 2009. Canonical and non-canonical pathways of osteoclast formation. Histol Histopathol 24(3): 337-346.

Kobayashi-Sakamoto, M., Isogai, E., Hirose, K., et Chiba, I. 2008. Role of alpha(v) integrin in osteoprotegerin-induced endothelial cell migration and proliferation. Microvasc Res 4: 4.

Kobayashi, K., Takahashi, N., Jimi, E., Udagawa, N., Takami, M., Kotake, S., Nakagawa, N., Kinosaki, M., Yamaguchi, K., Shima, N., Yasuda, H., Morinaga, T., Higashio, K., Martin, T.J., et Suda, T. 2000. Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. J Exp Med 191(2): 275-286.

Kodama, H., Nose, M., Niida, S., et Yamasaki, A. 1991. Essential role of macrophage colonystimulating factor in the osteoclast differentiation supported by stromal cells. J Exp Med 173(5): 1291-1294.

Koga, T., Inui, M., Inoue, K., Kim, S., Suematsu, A., Kobayashi, E., Iwata, T., Ohnishi, H., Matozaki, T., Kodama, T., Taniguchi, T., Takayanagi, H., et Takai, T. 2004. Costimulatory signals mediated by the ITAM motif cooperate with RANKL for bone homeostasis. Nature 428(6984): 758-763.

Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R.T., Gao, Y.H., Inada, M., Sato, M., Okamoto, R., Kitamura, Y., Yoshiki, S., et

Kishimoto, T. 1997. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. Cell 89(5): 755-764.

Kong, Y.Y., Yoshida, H., Sarosi, I., Tan, H.L., Timms, E., Capparelli, C., Morony, S., Oliveira-dos-Santos, A.J., Van, G., Itie, A., Khoo, W., Wakeham, A., Dunstan, C.R., Lacey, D.L., Mak, T.W., Boyle, W.J., et Penninger, J.M. 1999. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. Nature 397(6717): 315-323.

Koppelman, S.J., van Hoeij, M., Vink, T., Lankhof, H., Schiphorst, M.E., Damas, C., Vlot, A.J., Wise, R., Bouma, B.N., et Sixma, J.J. 1996. Requirements of von Willebrand factor to protect factor VIII from inactivation by activated protein C. Blood 87(6): 2292-2300.

Kotake, S., Sato, K., Kim, K.J., Takahashi, N., Udagawa, N., Nakamura, I., Yamaguchi, A., Kishimoto, T., Suda, T., et Kashiwazaki, S. 1996. Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptors in the synovial fluids from rheumatoid arthritis patients are responsible for osteoclast-like cell formation. J Bone Miner Res 11(1): 88-95.

Kovacs, C.S. 2008. Hemophilia, low bone mass, and osteopenia/osteoporosis. Transfus Apher Sci 38(1): 33-40.

Kudchadkar, R., Gonzalez, R., et Lewis, K.D. 2008. PI-88: a novel inhibitor of angiogenesis. Expert Opin Investig Drugs 17(11): 1769-1776.

Kumarasuriyar, A., Lee, I., Nurcombe, V., et Cool, S.M. 2009. De-sulfation of MG-63 cell glycosaminoglycans delays in vitro osteogenesis, up-regulates cholesterol synthesis and disrupts cell cycle and the actin cytoskeleton. J Cell Physiol 219(3): 572-583.

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

Labrinidis, A., Liapis, V., Thai le, M., Atkins, G.J., Vincent, C., Hay, S., Sims, N.A., Zannettino, A.C., Findlay, D.M., et Evdokiou, A. 2008. Does Apo2L/TRAIL play any physiologic role in osteoclastogenesis? Blood 111(11): 5411-5412; autor reply 5413.

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

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

Lakkakorpi, P.T., et Vaananen, H.K. 1996. Cytoskeletal changes in osteoclasts during the resorption cycle. Microsc Res Tech 33(2): 171-181.
Lamoureux, F., Baud'huin, M., Duplomb, L., Heymann, D., et Redini, F. 2007a. Proteoglycans: key partners in bone cell biology. Bioessays 29(8): 758-771.

Lamoureux, F., Richard, P., Wittrant, Y., Battaglia, S., Pilet, P., Trichet, V., Blanchard, F., Gouin, F., Pitard, B., Heymann, D., et Redini, F. 2007b. Therapeutic relevance of osteoprotegerin gene therapy in osteosarcoma: blockade of the vicious cycle between tumor cell proliferation and bone resorption. Cancer Res 67(15): 7308-7318.

Lamoureux, F., Picarda, G., Garrigue-Antar, L., Baud'huin, M., Trichet, V., Vidal, A., Miot-Noirault, E., Pitard, B., Heymann, D., et Redini, F. 2009. Glycosaminoglycans as potential regulators of osteoprotegerin therapeutic activity in osteosarcoma. Cancer Res 69(2): 526-536.

Laroche, M. 2002. Intraosseous circulation from physiology to disease. Joint Bone Spine 69(3): 262-269.

Lawrie, A., Waterman, E., Southwood, M., Evans, D., Suntharalingam, J., Francis, S., Crossman, D., Croucher, P., Morrell, N., et Newman, C. 2008. Evidence of a role for osteoprotegerin in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. Am J Pathol 172(1): 256-264.

Leaver, A.G., Triffitt, J.T., et Holbrook, I.B. 1975. Newer knowledge of non-collagenous protein in dentin and cortical bone matrix. Clin Orthop Relat Res (110): 269-292.

Lerner, U.H. 2006. Bone remodeling in post-menopausal osteoporosis. J Dent Res 85(7): 584-595.

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

Lin, H., Lee, E., Hestir, K., Leo, C., Huang, M., Bosch, E., Halenbeck, R., Wu, G., Zhou, A., Behrens, D., Hollenbaugh, D., Linnemann, T., Qin, M., Wong, J., Chu, K., Doberstein, S.K., et Williams, L.T. 2008. Discovery of a cytokine and its receptor by functional screening of the extracellular proteome. Science 320(5877): 807-811.

Liu, X.H., Kirschenbaum, A., Yao, S., et Levine, A.C. 2005. Cross-talk between the interleukin-6 and prostaglandin E(2) signaling systems results in enhancement of osteoclastogenesis through effects on the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor-{kappa}B (RANK) ligand/RANK system. Endocrinology 146(4): 1991-1998.

Mabilleau, G., et Sabokbar, A. 2009. Interleukin-32 promotes osteoclast differentiation but not osteoclast activation. PLoS One 4(1): e4173.

Malyankar, U.M., Scatena, M., Suchland, K.L., Yun, T.J., Clark, E.A., et Giachelli, C.M. 2000. Osteoprotegerin is an alpha vbeta 3-induced, NF-kappa B-dependent survival factor for endothelial cells. J Biol Chem 275(28): 20959-20962.

Mangan, S.H., Campenhout, A.V., Rush, C., et Golledge, J. 2007. Osteoprotegerin upregulates endothelial cell adhesion molecule response to tumor necrosis factor-alpha associated with induction of angiopoietin-2. Cardiovasc Res 76(3): 494-505.

Manolagas, S.C., et Jilka, R.L. 1995. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. N Engl J Med 332(5): 305-311.

Marie, P.J. 2008. Transcription factors controlling osteoblastogenesis. Arch Biochem Biophys 473(2): 98-105.

Marie, P.J. 2009. The calcium sensing receptor in bone cells: A potential therapeutic target in osteoporosis. Bone.

Marieb, E. 1998 Human Anatomy and Physiology

Martin, J., Collot-Teixeira, S., McGregor, L., et McGregor, J.L. 2007. The dialogue between endothelial cells and monocytes/macrophages in vascular syndromes. Curr Pharm Des 13(17): 1751-1759.

Massey, H.M., et Flanagan, A.M. 1999. Human osteoclasts derive from CD14-positive monocytes. Br J Haematol 106(1): 167-170.

Matsumoto, M., Kogawa, M., Wada, S., Takayanagi, H., Tsujimoto, M., Katayama, S., Hisatake, K., et Nogi, Y. 2004. Essential role of p38 mitogen-activated protein kinase in cathepsin K gene expression during osteoclastogenesis through association of NFATc1 and PU.1. J Biol Chem 279(44): 45969-45979.

McGonigle, J.S., Giachelli, C.M., et Scatena, M. 2009. Osteoprotegerin and RANKL differentially regulate angiogenesis and endothelial cell function. Angiogenesis 12(1): 35-46.

Meury, T., Verrier, S., et Alini, M. 2006. Human endothelial cells inhibit BMSC differentiation into mature osteoblasts in vitro by interfering with osterix expression. J Cell Biochem 98(4): 992-1006.

Mikami, S., Katsube, K., Oya, M., Ishida, M., Kosaka, T., Mizuno, R., Mochizuki, S., Ikeda, T., Mukai, M., et Okada, Y. 2009. Increased RANKL expression is related to tumour migration and metastasis of renal cell carcinomas. J Pathol 218(4): 530-539.

Min, H., Morony, S., Sarosi, I., Dunstan, C.R., Capparelli, C., Scully, S., Van, G., Kaufman, S., Kostenuik, P.J., Lacey, D.L., Boyle, W.J., et Simonet, W.S. 2000. Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis. J Exp Med 192(4): 463-474.

Miyazaki, T., Sanjay, A., Neff, L., Tanaka, S., Horne, W.C., et Baron, R. 2004. Src kinase activity is essential for osteoclast function. J Biol Chem 279(17): 17660-17666.

Montero, A., Okada, Y., Tomita, M., Ito, M., Tsurukami, H., Nakamura, T., Doetschman, T., Coffin, J.D., et Hurley, M.M. 2000. Disruption of the fibroblast growth factor-2 gene results in decreased bone mass and bone formation. J Clin Invest 105(8): 1085-1093.

Mori, K., Le Goff, B., Charrier, C., Battaglia, S., Heymann, D., et Redini, F. 2007. DU145 human prostate cancer cells express functional receptor activator of NFkappaB: new insights in the prostate cancer bone metastasis process. Bone 40(4): 981-990.

Mori, K., Ando, K., Heymann, D., et Redini, F. 2009. Receptor activator of nuclear factorkappa B ligand (RANKL) stimulates bone-associated tumors through functional RANK expressed on bone-associated cancer cells? Histol Histopathol 24(2): 235-242.

Mosheimer, B.A., Kaneider, N.C., Feistritzer, C., Djanani, A.M., Sturn, D.H., Patsch, J.R., et Wiedermann, C.J. 2005. Syndecan-1 is involved in osteoprotegerin-induced chemotaxis in human peripheral blood monocytes. J Clin Endocrinol Metab 90(5): 2964-2971.

Mountzios, G., Dimopoulos, M.A., Bamias, A., Papadopoulos, G., Kastritis, E., Syrigos, K., Pavlakis, G., et Terpos, E. 2007. Abnormal bone remodeling process is due to an imbalance in the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL)/osteoprotegerin (OPG) axis in patients with solid tumors metastatic to the skeleton. Acta Oncol 46(2): 221-229.

Muir, J.M., Andrew, M., Hirsh, J., Weitz, J.I., Young, E., Deschamps, P., et Shaughnessy, S.G. 1996. Histomorphometric analysis of the effects of standard heparin on trabecular bone in vivo. Blood 88(4): 1314-1320.

Nair, A.P., Jijina, F., Ghosh, K., Madkaikar, M., Shrikhande, M., et Nema, M. 2007. Osteoporosis in young haemophiliacs from western India. Am J Hematol 82(6): 453-457.

Nakagawa, M., Kaneda, T., Arakawa, T., Morita, S., Sato, T., Yomada, T., Hanada, K., Kumegawa, M., et Hakeda, Y. 2000. Vascular endothelial growth factor (VEGF) directly enhances osteoclastic bone resorption and survival of mature osteoclasts. FEBS Lett 473(2): 161-164.

Nakagawa, N., Kinosaki, M., Yamaguchi, K., Shima, N., Yasuda, H., Yano, K., Morinaga, T., et Higashio, K. 1998. RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. Biochem Biophys Res Commun 253(2): 395-400.

Nakamura, H., et Ozawa, H. 1994. Immunohistochemical localization of heparan sulfate proteoglycan in rat tibiae. J Bone Miner Res 9(8): 1289-1299.

Nakamura, I., Duong le, T., Rodan, S.B., et Rodan, G.A. 2007. Involvement of alpha(v)beta3 integrins in osteoclast function. J Bone Miner Metab 25(6): 337-344.

Nakano, K., Okada, Y., Saito, K., et Tanaka, Y. 2004. Induction of RANKL expression and osteoclast maturation by the binding of fibroblast growth factor 2 to heparan sulfate proteoglycan on rheumatoid synovial fibroblasts. Arthritis Rheum 50(8): 2450-2458.

Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J.M., Behringer, R.R., et de Crombrugghe, B. 2002. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. Cell 108(1): 17-29.

Nanes, M.S. 2003. Tumor necrosis factor-alpha: molecular and cellular mechanisms in skeletal pathology. Gene 321: 1-15.

Naot, D., et Cornish, J. 2008. The role of peptides and receptors of the calcitonin family in the regulation of bone metabolism. Bone 43(5): 813-818.

Nicholson, G.C., Malakellis, M., Collier, F.M., Cameron, P.U., Holloway, W.R., Gough, T.J., Gregorio-King, C., Kirkland, M.A., et Myers, D.E. 2000. Induction of osteoclasts from CD14-positive human peripheral blood mononuclear cells by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL). Clin Sci (Lond) 99(2): 133-140.

Niessner, A., et Weyand, C.M. 2009. Dendritic cells in atherosclerotic disease. Clin Immunol.

Niida, S., Kaku, M., Amano, H., Yoshida, H., Kataoka, H., Nishikawa, S., Tanne, K., Maeda, N., Nishikawa, S., et Kodama, H. 1999. Vascular endothelial growth factor can substitute for macrophage colony-stimulating factor in the support of osteoclastic bone resorption. J Exp Med 190(2): 293-298.

Nishimura, R., Hata, K., Ikeda, F., Ichida, F., Shimoyama, A., Matsubara, T., Wada, M., Amano, K., et Yoneda, T. 2008. Signal transduction and transcriptional regulation during mesenchymal cell differentiation. J Bone Miner Metab 26(3): 203-212.

Noble, B.S., Peet, N., Stevens, H.Y., Brabbs, A., Mosley, J.R., Reilly, G.C., Reeve, J., Skerry, T.M., et Lanyon, L.E. 2003. Mechanical loading: biphasic osteocyte survival and targeting of osteoclasts for bone destruction in rat cortical bone. Am J Physiol Cell Physiol 284(4): C934-943.

Noble, B.S. 2008. The osteocyte lineage. Arch Biochem Biophys 473(2): 106-111.

Owen, M. 1988. Marrow stromal stem cells. J Cell Sci Suppl 10: 63-76.

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

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

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

Parfitt, A.M. 2000. The mechanism of coupling: a role for the vasculature. Bone 26(4): 319-323.

Park, P.W., Reizes, O., et Bernfield, M. 2000. Cell surface heparan sulfate proteoglycans: selective regulators of ligand-receptor encounters. J Biol Chem 275(39): 29923-29926.

Pettersen, I., Bakkelund, W., Smedsrod, B., et Sveinbjornsson, B. 2005. Osteoprotegerin is expressed in colon carcinoma cells. Anticancer Res 25(6B): 3809-3816.

Pilkington, M.F., Sims, S.M., et Dixon, S.J. 1998. Wortmannin inhibits spreading and chemotaxis of rat osteoclasts in vitro. J Bone Miner Res 13(4): 688-694.

Poole, K.E., et Reeve, J. 2005. Parathyroid hormone - a bone anabolic and catabolic agent. Curr Opin Pharmacol 5(6): 612-617.

Poole, K.E., van Bezooijen, R.L., Loveridge, N., Hamersma, H., Papapoulos, S.E., Lowik, C.W., et Reeve, J. 2005. Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation. Faseb J 19(13): 1842-1844.

Pothet, A., et Jean, S. 2007. Les gènes des Hémophilies. Page consultée le: 16 juillet 2009. Adresse: <u>http://www.svt.ac-versailles.fr/archives/docpeda/banques/electro/ph%E9notyopes/html/hemogen.htm</u>

Price, P.A., June, H.H., Buckley, J.R., et Williamson, M.K. 2001. Osteoprotegerin inhibits artery calcification induced by warfarin and by vitamin D. Arterioscler Thromb Vasc Biol 21(10): 1610-1616.

Pritzker, L.B., Scatena, M., et Giachelli, C.M. 2004. The role of osteoprotegerin and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in human microvascular endothelial cell survival. Mol Biol Cell 15(6): 2834-2841.

Qin, L., Raggatt, L.J., et Partridge, N.C. 2004. Parathyroid hormone: a double-edged sword for bone metabolism. Trends Endocrinol Metab 15(2): 60-65.

Rajgopal, R., Bear, M., Butcher, M.K., et Shaughnessy, S.G. 2008. The effects of heparin and low molecular weight heparins on bone. Thromb Res 122(3): 293-298.

Reid, P., et Holen, I. 2009. Pathophysiological roles of osteoprotegerin (OPG). Eur J Cell Biol 88(1): 1-17.

Rini, B.I. 2009. Vascular endothelial growth factor-targeted therapy in metastatic renal cell carcinoma. Cancer 115(10 Suppl): 2306-2312.

Rivollier, A., Mazzorana, M., Tebib, J., Piperno, M., Aitsiselmi, T., Rabourdin-Combe, C., Jurdic, P., et Servet-Delprat, C. 2004. Immature dendritic cell transdifferentiation into osteoclasts: a novel pathway sustained by the rheumatoid arthritis microenvironment. Blood 104(13): 4029-4037.

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

Rosenberg, J.B., Foster, P.A., Kaufman, R.J., Vokac, E.A., Moussalli, M., Kroner, P.A., et Montgomery, R.R. 1998. Intracellular trafficking of factor VIII to von Willebrand factor storage granules. J Clin Invest 101(3): 613-624.

Rousselle, A.V., et Heymann, D. 2002. Osteoclastic acidification pathways during bone resorption. Bone 30(4): 533-540.

Rubin, J., Rubin, C., et Jacobs, C.R. 2006. Molecular pathways mediating mechanical signaling in bone. Gene 367: 1-16.

Ruoslahti, E. 1991. Integrins. J Clin Invest 87(1): 1-5.

Sakariassen, K.S., Bolhuis, P.A., et Sixma, J.J. 1979. Human blood platelet adhesion to artery subendothelium is mediated by factor VIII-Von Willebrand factor bound to the subendothelium. Nature 279(5714): 636-638.

Sanderson, R.D., Yang, Y., Suva, L.J., et Kelly, T. 2004. Heparan sulfate proteoglycans and heparanase--partners in osteolytic tumor growth and metastasis. Matrix Biol 23(6): 341-352.

Sato, K., Niessner, A., Kopecky, S.L., Frye, R.L., Goronzy, J.J., et Weyand, C.M. 2006. TRAIL-expressing T cells induce apoptosis of vascular smooth muscle cells in the atherosclerotic plaque. J Exp Med 203(1): 239-250.

Scatena, M., et Giachelli, C. 2002. The alpha(v)beta3 integrin, NF-kappaB, osteoprotegerin endothelial cell survival pathway. Potential role in angiogenesis. Trends Cardiovasc Med 12(2): 83-88.

Schneeweis, L.A., Willard, D., et Milla, M.E. 2005. Functional dissection of osteoprotegerin and its interaction with receptor activator of NF-kappaB ligand. J Biol Chem 280(50): 41155-41164.

Schneiders, W., Reinstorf, A., Ruhnow, M., Rehberg, S., Heineck, J., Hinterseher, I., Biewener, A., Zwipp, H., et Rammelt, S. 2008. Effect of chondroitin sulphate on material properties and bone remodelling around hydroxyapatite/collagen composites. J Biomed Mater Res A 85(3): 638-645.

Schneiders, W., Reinstorf, A., Biewener, A., Serra, A., Grass, R., Kinscher, M., Heineck, J., Rehberg, S., Zwipp, H., et Rammelt, S. 2009. In vivo effects of modification of hydroxyapatite/collagen composites with and without chondroitin sulphate on bone remodeling in the sheep tibia. J Orthop Res 27(1): 15-21.

Schoppet, M., Al-Fakhri, N., Franke, F.E., Katz, N., Barth, P.J., Maisch, B., Preissner, K.T., et Hofbauer, L.C. 2004. Localization of osteoprotegerin, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, and receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand in Monckeberg's sclerosis and atherosclerosis. J Clin Endocrinol Metab 89(8): 4104-4112.

Schoppet, M., Henser, S., Ruppert, V., Stubig, T., Al-Fakhri, N., Maisch, B., et Hofbauer, L.C. 2007. Osteoprotegerin expression in dendritic cells increases with maturation and is NF-kappaB-dependent. J Cell Biochem 100(6): 1430-1439.

Secchiero, P., Sun, D., De Vico, A.L., Crowley, R.W., Reitz, M.S., Jr., Zauli, G., Lusso, P., et Gallo, R.C. 1997. Role of the extracellular domain of human herpesvirus 7 glycoprotein B in virus binding to cell surface heparan sulfate proteoglycans. J Virol 71(6): 4571-4580.

Secchiero, P., Gonelli, A., Carnevale, E., Milani, D., Pandolfi, A., Zella, D., et Zauli, G. 2003. TRAIL promotes the survival and proliferation of primary human vascular endothelial cells by activating the Akt and ERK pathways. Circulation 107(17): 2250-2256.

Secchiero, P., Zerbinati, C., Rimondi, E., Corallini, F., Milani, D., Grill, V., Forti, G., Capitani, S., et Zauli, G. 2004. TRAIL promotes the survival, migration and proliferation of vascular smooth muscle cells. Cell Mol Life Sci 61(15): 1965-1974.

Shahbazi, S., Lenting, P.J., Fribourg, C., Terraube, V., Denis, C.V., et Christophe, O.D. 2007. Characterization of the interaction between von Willebrand factor and osteoprotegerin. J Thromb Haemost 5(9): 1956-1962.

Shaughnessy, S.G., Hirsh, J., Bhandari, M., Muir, J.M., Young, E., et Weitz, J.I. 1999. A histomorphometric evaluation of heparin-induced bone loss after discontinuation of heparin treatment in rats. Blood 93(4): 1231-1236.

Shi, Q., Wilcox, D.A., Fahs, S.A., Kroner, P.A., et Montgomery, R.R. 2003. Expression of human factor VIII under control of the platelet-specific alphaIIb promoter in megakaryocytic cell line as well as storage together with VWF. Mol Genet Metab 79(1): 25-33.

Shinmyouzu, K., Takahashi, T., Ariyoshi, W., Ichimiya, H., Kanzaki, S., et Nishihara, T. 2007. Dermatan sulfate inhibits osteoclast formation by binding to receptor activator of NF-kappa B ligand. Biochem Biophys Res Commun 354(2): 447-452.

Shinohara, M., Koga, T., Okamoto, K., Sakaguchi, S., Arai, K., Yasuda, H., Takai, T., Kodama, T., Morio, T., Geha, R.S., Kitamura, D., Kurosaki, T., Ellmeier, W., et Takayanagi, H. 2008. Tyrosine kinases Btk and Tec regulate osteoclast differentiation by linking RANK and ITAM signals. Cell 132(5): 794-806.

Shipman, C.M., et Croucher, P.I. 2003. Osteoprotegerin is a soluble decoy receptor for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo2 ligand and can function as a paracrine survival factor for human myeloma cells. Cancer Res 63(5): 912-916.

Simonet, W.S., Lacey, D.L., Dunstan, C.R., Kelley, M., Chang, M.S., Luthy, R., Nguyen, H.Q., Wooden, S., Bennett, L., Boone, T., Shimamoto, G., DeRose, M., Elliott, R., Colombero, A., Tan, H.L., Trail, G., Sullivan, J., Davy, E., Bucay, N., Renshaw-Gegg, L., Hughes, T.M., Hill, D., Pattison, W., Campbell, P., Sander, S., Van, G., Tarpley, J., Derby, P., Lee, R., et Boyle, W.J. 1997. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. Cell 89(2): 309-319.

Sorensen, M.G., Henriksen, K., Schaller, S., Henriksen, D.B., Nielsen, F.C., Dziegiel, M.H., et Karsdal, M.A. 2007. Characterization of osteoclasts derived from CD14+ monocytes isolated from peripheral blood. J Bone Miner Metab 25(1): 36-45.

Sporn, L.A., Chavin, S.I., Marder, V.J., et Wagner, D.D. 1985. Biosynthesis of von Willebrand protein by human megakaryocytes. J Clin Invest 76(3): 1102-1106.

Srivastava, S., Matsuda, M., Hou, Z., Bailey, J.P., Kitazawa, R., Herbst, M.P., et Horseman, N.D. 2003. Receptor activator of NF-kappaB ligand induction via Jak2 and Stat5a in mammary epithelial cells. J Biol Chem 278(46): 46171-46178.

St-Arnaud, R. 2008. The direct role of vitamin D on bone homeostasis. Arch Biochem Biophys 473(2): 225-230.

Standal, T., Seidel, C., Hjertner, O., Plesner, T., Sanderson, R.D., Waage, A., Borset, M., et Sundan, A. 2002. Osteoprotegerin is bound, internalized, and degraded by multiple myeloma cells. Blood 100(8): 3002-3007.

Suda, T., Takahashi, N., et Martin, T.J. 1992. Modulation of osteoclast differentiation. Endocr Rev 13(1): 66-80.

Suda, T., Takahashi, N., Udagawa, N., Jimi, E., Gillespie, M.T., et Martin, T.J. 1999. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. Endocr Rev 20(3): 345-357.

Suzuki, H., Nakamura, I., Takahashi, N., Ikuhara, T., Matsuzaki, K., Isogai, Y., Hori, M., et Suda, T. 1996. Calcitonin-induced changes in the cytoskeleton are mediated by a signal pathway associated with protein kinase A in osteoclasts. Endocrinology 137(11): 4685-4690.

Suzuki, J., Ikeda, T., Kuroyama, H., Seki, S., Kasai, M., Utsuyama, M., Tatsumi, M., Uematsu, H., et Hirokawa, K. 2004. Regulation of osteoclastogenesis by three human RANKL isoforms expressed in NIH3T3 cells. Biochem Biophys Res Commun 314(4): 1021-1027.

Suzuki, Y., Montagne, K., Nishihara, A., Watabe, T., et Miyazono, K. 2008. BMPs promote proliferation and migration of endothelial cells via stimulation of VEGF-A/VEGFR2 and angiopoietin-1/Tie2 signalling. J Biochem 143(2): 199-206.

Swaminathan, R. 2001. Biochemical markers of bone turnover. Clin Chim Acta 313(1-2): 95-105.

Tamura, T., Udagawa, N., Takahashi, N., Miyaura, C., Tanaka, S., Yamada, Y., Koishihara, Y., Ohsugi, Y., Kumaki, K., Taga, T., et et al. 1993. Soluble interleukin-6 receptor triggers osteoclast formation by interleukin 6. Proc Natl Acad Sci U S A 90(24): 11924-11928.

Tanabe, N., Maeno, M., Suzuki, N., Fujisaki, K., Tanaka, H., Ogiso, B., et Ito, K. 2005. IL-1 alpha stimulates the formation of osteoclast-like cells by increasing M-CSF and PGE2 production and decreasing OPG production by osteoblasts. Life Sci 77(6): 615-626.

Terraube, V., O'Donnell, J.S., et Jenkins, P.V. 2009. Factor VIII and von Willebrand factor interaction: biological, clinical and therapeutic importance. Haemophilia.

Theoleyre, S., Kwan Tat, S., Vusio, P., Blanchard, F., Gallagher, J., Ricard-Blum, S., Fortun, Y., Padrines, M., Redini, F., et Heymann, D. 2006. Characterization of osteoprotegerin binding to glycosaminoglycans by surface plasmon resonance: role in the interactions with receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) and RANK. Biochem Biophys Res Commun 347(2): 460-467.

Theriaque. 2009. HEPARINE NA CHOAY 25000UI/5ML INJ Page consultée le. Adresse:

Thomas, R.J., Guise, T.A., Yin, J.J., Elliott, J., Horwood, N.J., Martin, T.J., et Gillespie, M.T. 1999. Breast cancer cells interact with osteoblasts to support osteoclast formation. Endocrinology 140(10): 4451-4458.

Tombran-Tink, J., et Barnstable, C.J. 2004. Osteoblasts and osteoclasts express PEDF, VEGF-A isoforms, and VEGF receptors: possible mediators of angiogenesis and matrix remodeling in the bone. Biochem Biophys Res Commun 316(2): 573-579.

Toppets, V., Pastoret, V., De Behr, V., Antoine, N., Dessy, C., Gabriel, A. 2004. Morphologie, croissance et remaniement du tissu osseux. Ann. Méd. Vét 148: 1-13.

Traina, T.A. 2009. Bevacizumab in the treatment of metastatic breast cancer. Oncology (Williston Park) 23(4): 327-332.

Tsuda, E., Goto, M., Mochizuki, S., Yano, K., Kobayashi, F., Morinaga, T., et Higashio, K. 1997. Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. Biochem Biophys Res Commun 234(1): 137-142.

Tuddenham, E.G., Lane, R.S., Rotblat, F., Johnson, A.J., Snape, T.J., Middleton, S., et Kernoff, P.B. 1982. Response to infusions of polyelectrolyte fractionated human factor VIII concentrate in human haemophilia A and von Willebrand's disease. Br J Haematol 52(2): 259-267.

Turner, C.H., et Pavalko, F.M. 1998. Mechanotransduction and functional response of the skeleton to physical stress: the mechanisms and mechanics of bone adaptation. J Orthop Sci 3(6): 346-355.

Udagawa, N., Takahashi, N., Katagiri, T., Tamura, T., Wada, S., Findlay, D.M., Martin, T.J., Hirota, H., Taga, T., Kishimoto, T., et Suda, T. 1995. Interleukin (IL)-6 induction of osteoclast differentiation depends on IL-6 receptors expressed on osteoblastic cells but not on osteoclast progenitors. J Exp Med 182(5): 1461-1468.

Vaaraniemi, J., Halleen, J.M., Kaarlonen, K., Ylipahkala, H., Alatalo, S.L., Andersson, G., Kaija, H., Vihko, P., et Vaananen, H.K. 2004. Intracellular machinery for matrix degradation in bone-resorbing osteoclasts. J Bone Miner Res 19(9): 1432-1440.

Van Campenhout, A., et Golledge, J. 2009. Osteoprotegerin, vascular calcification and atherosclerosis. Atherosclerosis 204(2): 321-329.

van den Biggelaar, M., Bierings, R., Storm, G., Voorberg, J., et Mertens, K. 2007. Requirements for cellular co-trafficking of factor VIII and von Willebrand factor to Weibel-Palade bodies. J Thromb Haemost 5(11): 2235-2242.

van Durme, C.M., Idema, R.N., et van Guldener, C. 2008. Two rare complications of glioblastoma multiforme: persistent hiccup and acquired haemophilia A. Neth J Med 66(7): 286-288.

van Schooten, C.J., Shahbazi, S., Groot, E., Oortwijn, B.D., van den Berg, H.M., Denis, C.V., et Lenting, P.J. 2008. Macrophages contribute to the cellular uptake of von Willebrand factor and factor VIII in vivo. Blood 112(5): 1704-1712.

Veyradier, A., Goudemand, J., Fressinaud, E., Trossaert, M., Lambert, T., Dreyfus, M., et Borel-Derlon, A. 2006. Page consultée le: 17 juillet 2009. Adresse: http://www.orpha.net/data/patho/Pub/fr/Willebrand-FRfrPub3497.pdf

Villars, F., Bordenave, L., Bareille, R., et Amedee, J. 2000. Effect of human endothelial cells on human bone marrow stromal cell phenotype: role of VEGF? J Cell Biochem 79(4): 672-685.

Vischer, U.M. 2006. von Willebrand factor, endothelial dysfunction, and cardiovascular disease. J Thromb Haemost 4(6): 1186-1193.

Vitovski, S., Phillips, J.S., Sayers, J., et Croucher, P.I. 2007. Investigating the interaction between osteoprotegerin and receptor activator of NF-kappaB or tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand: evidence for a pivotal role for osteoprotegerin in regulating two distinct pathways. J Biol Chem 282(43): 31601-31609.

Vlodavsky, I., Ilan, N., Nadir, Y., Brenner, B., Katz, B.Z., Naggi, A., Torri, G., Casu, B., et Sasisekharan, R. 2007. Heparanase, heparin and the coagulation system in cancer progression. Thromb Res 120 Suppl 2: S112-120.

Vlot, A.J., Koppelman, S.J., van den Berg, M.H., Bouma, B.N., et Sixma, J.J. 1995. The affinity and stoichiometry of binding of human factor VIII to von Willebrand factor. Blood 85(11): 3150-3157.

von Schroeder, H.P., Veillette, C.J., Payandeh, J., Qureshi, A., et Heersche, J.N. 2003. Endothelin-1 promotes osteoprogenitor proliferation and differentiation in fetal rat calvarial cell cultures. Bone 33(4): 673-684.

Waddington, R.J., Roberts, H.C., Sugars, R.V., et Schonherr, E. 2003. Differential roles for small leucine-rich proteoglycans in bone formation. Eur Cell Mater 6: 12-21; discussion 21.

Wagner, D.D. 1990. Cell biology of von Willebrand factor. Annu Rev Cell Biol 6: 217-246.

Wakkach, A., Mansour, A., Dacquin, R., Coste, E., Jurdic, P., Carle, G.F., et Blin-Wakkach, C. 2008. Bone marrow microenvironment controls the in vivo differentiation of murine dendritic cells into osteoclasts. Blood 112(13): 5074-5083.

Wallny, T.A., Scholz, D.T., Oldenburg, J., Nicolay, C., Ezziddin, S., Pennekamp, P.H., Stoffel-Wagner, B., et Kraft, C.N. 2007. Osteoporosis in haemophilia - an underestimated comorbidity? Haemophilia 13(1): 79-84.

Walton, K.J., Duncan, J.M., Deschamps, P., et Shaughnessy, S.G. 2002. Heparin acts synergistically with interleukin-11 to induce STAT3 activation and in vitro osteoclast formation. Blood 100(7): 2530-2536.

Wilcox, D.A., Shi, Q., Nurden, P., Haberichter, S.L., Rosenberg, J.B., Johnson, B.D., Nurden, A.T., White, G.C., 2nd, et Montgomery, R.R. 2003. Induction of megakaryocytes to synthesize and store a releasable pool of human factor VIII. J Thromb Haemost 1(12): 2477-2489.

Wion, K.L., Kelly, D., Summerfield, J.A., Tuddenham, E.G., et Lawn, R.M. 1985. Distribution of factor VIII mRNA and antigen in human liver and other tissues. Nature 317(6039): 726-729.

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

Wong, B.R., Rho, J., Arron, J., Robinson, E., Orlinick, J., Chao, M., Kalachikov, S., Cayani, E., Bartlett, F.S., 3rd, Frankel, W.N., Lee, S.Y., et Choi, Y. 1997. TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. J Biol Chem 272(40): 25190-25194.

Wong, B.R., Besser, D., Kim, N., Arron, J.R., Vologodskaia, M., Hanafusa, H., et Choi, Y. 1999. TRANCE, a TNF family member, activates Akt/PKB through a signaling complex involving TRAF6 and c-Src. Mol Cell 4(6): 1041-1049.

Woods, A., et Couchman, J.R. 1998. Syndecans: synergistic activators of cell adhesion. Trends Cell Biol 8(5): 189-192.

Wu, Q.Y., Drouet, L., Carrier, J.L., Rothschild, C., Berard, M., Rouault, C., Caen, J.P., et Meyer, D. 1987. Differential distribution of von Willebrand factor in endothelial cells. Comparison between normal pigs and pigs with von Willebrand disease. Arteriosclerosis 7(1): 47-54.

Wu, X., McKenna, M.A., Feng, X., Nagy, T.R., et McDonald, J.M. 2003. Osteoclast apoptosis: the role of Fas in vivo and in vitro. Endocrinology 144(12): 5545-5555.

Xu, T., Bianco, P., Fisher, L.W., Longenecker, G., Smith, E., Goldstein, S., Bonadio, J., Boskey, A., Heegaard, A.M., Sommer, B., Satomura, K., Dominguez, P., Zhao, C., Kulkarni, A.B., Robey, P.G., et Young, M.F. 1998. Targeted disruption of the biglycan gene leads to an osteoporosis-like phenotype in mice. Nat Genet 20(1): 78-82.

Yago, T., Nanke, Y., Kawamoto, M., Furuya, T., Kobashigawa, T., Kamatani, N., et Kotake, S. 2007. IL-23 induces human osteoclastogenesis via IL-17 in vitro, and anti-IL-23 antibody attenuates collagen-induced arthritis in rats. Arthritis Res Ther 9(5): R96.

Yamaguchi, K., Kinosaki, M., Goto, M., Kobayashi, F., Tsuda, E., Morinaga, T., et Higashio, K. 1998. Characterization of structural domains of human osteoclastogenesis inhibitory factor. J Biol Chem 273(9): 5117-5123.

Yamamoto, K., de Waard, V., Fearns, C., et Loskutoff, D.J. 1998. Tissue distribution and regulation of murine von Willebrand factor gene expression in vivo. Blood 92(8): 2791-2801.

Yao, S., Liu, D., Pan, F., et Wise, G.E. 2006. Effect of vascular endothelial growth factor on RANK gene expression in osteoclast precursors and on osteoclastogenesis. Arch Oral Biol 51(7): 596-602.

Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Mochizuki, S.I., Yano, K., Fujise, N., Sato, Y., Goto, M., Yamaguchi, K., Kuriyama, M., Kanno, T., Murakami, A., Tsuda, E., Morinaga, T., et

Higashio, K. 1998. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. Endocrinology 139(3): 1329-1337.

Yavropoulou, M.P., et Yovos, J.G. 2008. Osteoclastogenesis--current knowledge and future perspectives. J Musculoskelet Neuronal Interact 8(3): 204-216.

Yen, M.L., Tsai, H.F., Wu, Y.Y., Hwa, H.L., Lee, B.H., et Hsu, P.N. 2008. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces osteoclast differentiation from monocyte/macrophage lineage precursor cells. Mol Immunol 45(8): 2205-2213.

Yoshida, H., Hayashi, S., Kunisada, T., Ogawa, M., Nishikawa, S., Okamura, H., Sudo, T., Shultz, L.D., et Nishikawa, S. 1990. The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. Nature 345(6274): 442-444.

Yoshitake, F., Itoh, S., Narita, H., Ishihara, K., et Ebisu, S. 2008. Interleukin-6 directly inhibits osteoclast differentiation by suppressing receptor activator of NF-kappaB signaling pathways. J Biol Chem 283(17): 11535-11540.

Yun, T.J., Chaudhary, P.M., Shu, G.L., Frazer, J.K., Ewings, M.K., Schwartz, S.M., Pascual, V., Hood, L.E., et Clark, E.A. 1998. OPG/FDCR-1, a TNF receptor family member, is expressed in lymphoid cells and is up-regulated by ligating CD40. J Immunol 161(11): 6113-6121.

Zannettino, A.C., Holding, C.A., Diamond, P., Atkins, G.J., Kostakis, P., Farrugia, A., Gamble, J., To, L.B., Findlay, D.M., et Haynes, D.R. 2005. Osteoprotegerin (OPG) is localized to the Weibel-Palade bodies of human vascular endothelial cells and is physically associated with von Willebrand factor. J Cell Physiol 204(2): 714-723.

Zauli, G., Pandolfi, A., Gonelli, A., Di Pietro, R., Guarnieri, S., Ciabattoni, G., Rana, R., Vitale, M., et Secchiero, P. 2003. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) sequentially upregulates nitric oxide and prostanoid production in primary human endothelial cells. Circ Res 92(7): 732-740.

Zauli, G., Rimondi, E., Nicolin, V., Melloni, E., Celeghini, C., et Secchiero, P. 2004. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) blocks osteoclastic differentiation induced by RANKL plus M-CSF. Blood 104(7): 2044-2050.

Zauli, G., et Secchiero, P. 2006. The role of the TRAIL/TRAIL receptors system in hematopoiesis and endothelial cell biology. Cytokine Growth Factor Rev 17(4): 245-257.

Zauli, G., Corallini, F., Bossi, F., Fischetti, F., Durigutto, P., Celeghini, C., Tedesco, F., et Secchiero, P. 2007. Osteoprotegerin increases leukocyte adhesion to endothelial cells both in vitro and in vivo. Blood 110(2): 536-543.

Zauli, G., Rimondi, E., Stea, S., Baruffaldi, F., Stebel, M., Zerbinati, C., Corallini, F., et Secchiero, P. 2008. TRAIL inhibits osteoclastic differentiation by counteracting RANKL-dependent p27Kip1 accumulation in pre-osteoclast precursors. J Cell Physiol 214(1): 117-125.

Ziegler, S., Kudlacek, S., Luger, A., et Minar, E. 2005. Osteoprotegerin plasma concentrations correlate with severity of peripheral artery disease. Atherosclerosis 182(1): 175-180.

Zimmerman, T.S., et Edgington, T.S. 1973. Factor VIII coagulant activity and factor VIII-like antigen: independent molecular entities. J Exp Med 138(4): 1015-1020.

Liste des publications

Articles originaux acceptés dans des journaux internationaux à comité de lecture

Lamoureux F., Picarda G., Garrigue-Antar L., <u>**Baud'huin** M</u>., Trichet V., Vidal A., Miot-Noirault E., Pitard B., Heymann D and Redini F. "Glycosaminoglycans as Potential Regulators of Osteoprotegerin Therapeutic Activity in Osteosarcoma" (2009) *Cancer Res* 69(2):526-536.

Duplomb L*, **<u>Baud'huin M</u>***, Charrier C, Berreur M, Trichet V, Blanchard F and Heymann D. "Interleukin-6 inhibits receptor activator of nuclear factor kappaB ligand-induced osteoclastogenesis by diverting cells into the macrophage lineage: key role of Serine727 phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 3" (2008) *Endocrinology*. 149(7):3688-3697 (* : equal author contribution)

Baud'huin M., Duplomb L., Charrier C., Maillasson M., Fouassier M. and Heymann D. "Factor VIII/von Willebrand Factor complex inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis and controls cell survival" *J Biol Chem*, sous presse.

Articles originaux soumis dans des journaux internationaux à comité de lecture

<u>Baud'huin M.</u>, Renault R., Charrier C., Moreau A., Gouin F., Duplomb L. and Heymann D.. "Interleukin-34 can substitute for macrophage-colony stimulating factor in RANKL-induced osteoclastogenesis." *Soumis pour publication*

Baud'huin M., Charrier C., Jego G., Gasiunas N., Gallagher J., Maillasson M., Redini F., Duplomb L. and Heymann D. "Glycosaminoglycans inhibit RANKL-induced osteoclastogenesis". *Soumis pour publication*.

Verron E., Masson M., Khoshniat S., Duplomb L., **<u>Baud'huin M.</u>**, Badran Z., Bujoli B., Janvier P., Bouler JM. and Guicheux J., "Gallium modulates osteoclastic bone resorption *in vitro* without affecting osteoblasts" *Soumis pour publication*.

Revues acceptées dans des journaux internationaux à comité de lecture

Blanchard F, Duplomb L, <u>**Baud'huin M</u>** and Brounais B. "The dual role of IL-6-type cytokines on bone remodeling and bone tumors" (2009) *Cytokine Growth Factor Rev* 20(1):19-28.</u>

Lamoureux F, <u>Baud'huin M</u>, Duplomb L, Heymann D, Rédini F. "Proteoglycans: key partners in bone cell biology" (2007) *Bioessays*. 29(8):758-71.

Baud'huin M, Lamoureux F, Duplomb L, Rédini F, Heymann D. "RANKL, RANK, osteoprotegerin: key partners of osteoimmunology and vascular diseases" (2007) *Cell Mol Life Sci.* 64(18):2334-2350.

Baud'huin M, Duplomb L, Ruiz Velasco C, Fortun Y, Heymann D, Padrines M. "Key roles of the OPG-RANK-RANKL system in bone oncology" (2007) *Expert Rev Anticancer Ther*.;7(2):221-232...

Articles et revue cités dans le manuscrit

Interleukin-34 is expressed by giant cell tumours of bone and plays a key role in RANKL-induced osteoclastogenesis

Marc BAUD'HUIN^{1,2}, Romain RENAULT^{1,2}, Céline CHARRIER^{1,2}, Anne RIET^{1,2}, Anne MOREAU³, François GOUIN^{1,2,3}, Laurence DUPLOMB^{1,2,3} and Dominique HEYMANN^{1,2,3} ^{1.} INSERM, UMR-S 957, Nantes, F-44035 France, ^{2.}Université de Nantes, Nantes atlantique universités, Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, EA3822, Nantes, F-44035, France, ^{3.} CHU, Hôtel Dieu, Nantes, France

Running title: IL-34 expression in Giant cell tumours: role in osteoclastogenesis

Corresponding author: Dr. D. HEYMANN INSERM UMR-S 957 - Université de Nantes, Faculté de Médecine 1 rue Gaston Veil 44035, Nantes Cedex 1 France, (+33)240412845 ; Fax (+33)240412860 ; e-mail: dominique.heymann@univ-nantes.fr

Interleukin-34 (IL-34) is a newly discovered regulator of myeloid lineage differentiation, proliferation, and survival, acting via the Macrophage-**Colony Stimulating Factor Receptor (M-**CSF receptor, c-fms). M-CSF is also considered required as for osteoclastogenesis and has been already identified as a major contributor of the pathogenesis of giant cell tumours of bone (GCT), tumours rich in osteoclasts. According to the key role of M-CSF in osteoclastogenesis and GCT. the expression of IL-34 in human GCT, was first assessed. Quantitative analysis of IL-34 mRNA expression in 14 human GCT revealed expression of this cytokine in GCT as well as M-CSF and Immunohistochemistv c-fms. demonstrated that osteoclast-like cells exhibited a huge immunostaining for IL-34 and that mononuclear stromal cells slightly expressed this protein. In contrast to osteoblasts, bone-resorbing osteoclasts showed a very strong staining for IL-34 then suggesting its potential role in the pathogenesis of GCT by facilitating osteoclast formation. The role of IL-34 in osteoclastogenesis was then studied in murine and human models. IL-34 was able to support **RANKL-induced** osteoclastogenesis in the absence of M-CSF in all models. Multinucleated cells generated in the presence of IL-34 and RANKL specific osteoclastic markers and resorbed dentine. IL-34 induced phosphorylation of ERK1/2. MAP-Kinase and Akt through the c-fms, as revealed by the inhibition of signaling by a specific c-fms tyrosine kinase inhibitor. Furthermore, IL-34 stimulated RANKL-dependent osteoclastogenesis by promoting the adhesion and proliferation of osteoclast progenitors and had no effect on osteoclast survival. Overall, these data reveal that IL-34 can entirely substitute for M-CSF in **RANKL-induced** osteoclastogenesis, thus identifying a novel biological activity for this cytokine and a contribution to the pathogenesis of GCT.

INTRODUCTION

Giant cell tumour of bone (GCT) accounts for 5 to 9 percent of all primary bone tumours, occur most often during the second to the fourth decades and are found more commonly in men than women excepted in the second decade of life [1]. These tumours are usually detected in the long bones, most often the distal femur, proximal tibia, and distal radius. GCT are characterised by osteoclast-like cells, in a background of mononuclear rounded

(CD68⁺ monocytes) and spindle-shaped cells (stromal cells) which appear to be the neoplastic component [2]. There is evidence that theses stromal cells strongly support the recruitment and formation of mature osteoclasts [3]. Thus, the morbidity observed in GCT is the consequence of the destructive osteolysis due to the hyperresorptive activity of these giant cells. This exacerbated osteolysis is in fine the result of a dysregulation of osteoclastogenesis. Indeed, in a physiologic context, bone depends remodelling on osteoblasts responsible for bone apposition and osteoclasts specialized in bone resorption [4]. Differentiation of osteoclastic precursors into mature osteoclasts in vivo depends on a tight interaction with osteoblastic/stromal cells: cell-to-cell interactions as well as the production of various soluble factors by osteoblasts are required [5-8]. Thus, all disturbances of osteoclastogenesis lead to an osteolytic disorder such as GCT.

The differentiation of osteoclasts is mainly dependent on RANKL, a TNF family cytokine [11-18], as well as on M-CSF [8-11]. The role for M-CSF in osteoclastogenesis has been demonstrated in osteopetrotic (op/op) mutant mice which suffer from congenital osteopetrosis due to a deficiency of osteoclasts associated with an absence of M-CSF [19]. M-CSF is therefore considered as required for osteoclastogenesis, stimulating both the adhesion and the proliferation of osteoclast precursors [20, 21]. Thus, according their role in osteoclastogenesis, M-CSF and RANKL have been clearly involved in the pathogenesis of GCT [3, 22, 23]

Recently, Lin *et al.* discovered a new cytokine, interleukin-34 [24]. Functional studies showed that IL-34 binds to the M-CSF Receptor (also called CSF-1 Receptor or c-fms) expressed on the cell surface of human monocytes. Furthermore, IL-34 induces the formation of the colony forming unit-macrophage in human bone marrow cultures, with the same efficiency as M-CSF. In light of this work, it can be hypothesized that IL-34 may contribute to osteoclastogenesis and to the pathogenesis of GCT.

The aim of the present study was to determine if IL-34 is expressed by a series of 14 human GCT. We next analyzed if M-CSF can be substituted *in vitro* by IL-34 in RANKL-induced osteoclastogenesis using several murine and human models and studied the mechanism by which IL-34 can support osteoclastogenesis.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Tissue specimens and osteoclastic differentiation assays

Fourteen patients, the treated at of Orthopaedic Department Surgery (University Hospital of Nantes, France), were included in the present study (Table I). The experimental procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible institutional committee on human experimentation and with the Helsinki Declaration. The study was approved by the institutional ethics committee.

Murine RAW 264.7 cells (ATCC, France) were cultured in α-MEM medium containing 10% FCS and 100 ng/ml recombinant human RANKL (Amgen Inc, USA) in the presence or absence of 100 ng/ml murine M-CSF (mM-CSF) or mIL-34 (R&D Systems, UK). Multinucleated cells (> 3 nuclei) were counted after May Grünwald Giemsa staining.

 $CD11b^+$ cells were isolated from murine bone marrow of C57Bl/6 mice, and CD14⁺ cells were isolated from human peripheral blood, by selection using MACS microbeads (Miltenyi Biotec, Germany) as previously described [25]. Culture medium containing 10% FCS, M-CSF or IL-34 and 100 ng/ml hRANKL was changed every 4 days. After 15 days of culture, osteoclasts were visualized by TRAP staining (Sigma, The resorption capacity France). of osteoclasts was assessed after cell culture on dentine slices. At the end of the culture, osteoclasts were removed and dentin slices were fixed with 4% glutaraldehyde followed by staining with 1% toluidine blue for 3 minutes.

RNA isolation and real-time PCR.

Total RNA was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen, France). First strand cDNA was synthesized at 37°C for 1 hour from 5 µg of total RNA using Moloney Leukemia Virus-Reverse Transcriptase manufacturer's according the to recommendations (Invitrogen). The realtime PCR contained 10 ng of reverse transcribed total RNA, 300 nM of primers (Table II) and 2x SYBR green buffer (Biorad, France). Quantitative PCRs (qPCR) were carried out on a Chromo4TM System (Biorad). Analysis was performed according to the method described by Vandesompele et al. [26] using both human and mouse hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1 (Hprt1) and cytochrome c-1 (cyc1) as invariant controls.

Immunohistochemistry

GCT samples harvested during incisional and excisional biopsies were immediately fixed in 10% formaldehyde solution. The samples were decalcified by electrolysis and embedding in paraffin augmented by pycolytis (Dubar Electronique, France), 5-µm thick sections mounted were on glass slides. performed Immunohistochemistry was using an autostainer 360 (MM, France). Briefly, deparaffinised sections were for 5 minutes to block endogenous peroxidase then incubated with and primary polyclonal anti-human IL-34 (ProSci Inc, USA) (1/200 in PBS), anti-human M-CSF or anti-human c-fms antibodies (Abcam, France) (respectively at 1/100 and 1/50) for 1h. The slides were then incubated with anti-rabbit 1/800biotinylated immunoglobulin (Sigma) for 1 hour and extravidin-peroxidase 1/150 for 30 minutes, and then revealed with an AEC staining kit (Sigma). Preparations were counterstained with hematoxylin. Negative control was analyzed using a similar procedure excluding the primary antibody and using an irrelevant IgG.

Western Blot Analysis

After 5 hours of culture in serum-free medium, undifferentiated RAW 264.7 or $CD14^+$ cells were stimulated with 100 ng/ml of IL-34 or M-CSF for 15 minutes at 37°C. In some experiments, cells were preincubated for 2 hours with 20 µM of c-fms specific inhibitor GW2580 (Calbiochem, USA). Cell lysates were obtained and protein concentrations were determined as described previously [25]. Proteins were run on 10% SDS-PAGE gels and transferred to Immobilon-P membranes (Millipore, USA) which were then incubated with antibodies to Phospho-ERK1/2, Phospho-Akt, Total-ERK1/2 and Total-Akt (Cell Signaling Technologies, USA). Bands were visualized using ECL reagent (Roche, Germany).

Cell adhesion, proliferation and osteoclast survival

Human $CD14^+$ monocytes were cultured for 3 days (adhesion assay) or 10 days (proliferation assay) in the presence of hM-CSF or hIL-34 or absence of these factors (control condition). Cell adhesion and proliferation were determined using reagent XTT (Roche Molecular Biomedicals, Germany) which was added to each well and incubated for 5h at 37°C. The corresponding absorbance was then determined at 490 nm. Osteoclast survival was determined in the presence or absence of hRANKL, hM-CSF and hIL-34. Alive and apoptotic osteoclasts were visualized after TRAP staining.

Statistical analysis

Experiments were performed 3 times in triplicate. The mean \pm SD was calculated for all conditions and results were analyzed by ANOVA, with Bonferroni multiple comparisons test as post-hoc test. p<0.05 is considered as significant.

Osteoclast-like cells from giant cell tumours of bone strongly express IL-34

examine To the functional implication of IL-34 in the pathogenesis of GCT, the expression of M-CSF, IL-34 and c-fms was first analyzed by qPCR in 14 human GCT (Table I). Results clearly demonstrated that all human GCT expressed IL-34 and M-CSF (Figure 1A). as well as c-fms (Figure 1B). Interestingly, in 9 patients the relative gene expressions of IL34 and M-CSF are inversely related. Indeed, in patients 1, 2, 4, 5, 6, 7, 9, the expression of IL-34 was high with a relatively low expression of M-CSF and in contrast to patients 11 and 12 for who M-CSF was highly expressed. All GCT assessed expressed c-fms, which appears fairly homogeneous (Figure 1B).

To identify the source of IL-34 in immunohistochemistry GCT. human analysis has been carried out. Most of the multinucleated osteoclast-like giant cells huge cytoplasmic exhibited a immunostaining for IL-34 (Figure 2b) compared to the control (Figure 2a) and occasional (1-2 %) osteoclast-like cells lacked IL-34 protein expression (Figure Interestingly, 2c). bone-resorbing osteoclasts were positive for IL-34 in contrast to osteoblasts (Figure 2d) and mononucleated stromal cells slightly expressed this protein (Figure 2e). We then compared this expression pattern to those of M-CSF and c-fms. Osteoclast-like cells and stromal cells were similarly positive for M-CSF (Figure 2f) and c-fms was restricted to osteoclast-like and monocytic cell types (Figure 2h). Bone-resorbing cells positively expressed M-CSF (Figure 2g) and c-fms (Figure 2i). Thus, the presence of IL-34 strongly suggested its involvement in the pathogenesis of GCT.

IL-34 cooperates with RANKL to support osteoclastogenesis from murine RAW 264.7 cells and CD11b⁺ cells

To better understand the potential role of IL-34 in GCT, we then analyzed the effect of IL-34 on RANKL-induced osteoclastogenesis. First, using the murine monocytic cell line RAW264.7 [27, 28], 100 ng/ml of mM-CSF or 100 ng/ml of mIL-34 exerted a synergistic effect on RANKL-induced osteoclastogenesis (Figure 3A). While RANKL alone resulted in the generation of 83 osteoclasts per well, this was significantly increased to 247 osteoclasts per well (3-fold increase, p<0.05) with the addition of mM-CSF and 294 osteoclasts (3.5-fold increase, p<0.05) in the presence of mIL-34 (Figure 3B). Furthermore, osteoclasts generated in the presence of M-CSF or IL-34 were larger in size compared to those obtained with RANKL alone (Figure 3A). These findings were confirmed by analysis of expression of osteoclastic markers by qPCR (Figure 3C). The presence of RANKL in the culture medium of RAW 264.7 cells induced a 6-fold increase in gene expression of TRAP and Cathepsin K, two well-known osteoclastic markers. When mM-CSF or mIL-34 were added to the culture medium, expression of these markers increased 8.5- to 10.5-fold, confirming a strong impact of both M-CSF and IL-34 on osteoclastogenesis (Figure 3C). To determine if IL-34 can substitute for M-CSF in mouse primary cultures. osteoclastogenesis was assessed from murine CD11b⁺ bone marrow cells. In CD11b⁺ cells, similarly to mM-CSF, mIL-34 allowed RANKL-induced osteoclastogenesis in a dose dependent manner (Figure 3D). Thus, 50 ng/ml of mIL-34 are as effective as 25 ng/ml of mM-CSF.

IL-34 can substitute for M-CSF in RANKL-induced osteoclastogenesis from human CD14⁺ monocytes

To determine if IL-34 can substitute for M-CSF in human primary cultures, osteoclastogenesis was assessed from human CD14⁺ monocytes. Results revealed that M-CSF (which is normally required to

form osteoclasts in these models) can be completely substituted by IL-34 (Figures 4A, 4B and 4C). Similarly to hM-CSF, hIL-34 increased in a dose-dependent **RANKL-induced** the manner osteoclastogenesis (Figure 4B). In CD14⁺ monocytes, 50 ng/ml hM-CSF or 100 ng/ml hIL-34 supported RANKL-induced osteoclastogenesis with similar efficiency (Figure 4B). Analysis of osteoclastic markers by quantitative PCR revealed upregulated expression of TRAP, NFATc1 and Cathepsin K in the presence of RANKL in combination with either hM-CSF or hIL34, confirming the presence of osteoclasts in these cultures (Figure 4C). Furthermore, the differentiation of CD14⁺ cells on dentine slices showed the activity of osteoclasts generated in presence of IL-34 to resorb calcified matrix (Figure 4D). These data thus demonstrate, for the first time, a key role for IL-34 in human and mouse osteoclastogenesis.

IL-34 signals through c-fms during osteoclastogenesis

We next analyzed the signal transduction pathways of IL-34 in RAW 264.7 cells and CD14⁺ human monocytes. As shown in Figure 5 (left panel), both mM-CSF and mIL-34induced phosphorylation of AKT and ERK 1/2 in RAW 264.7 cells. When a specific c-fms inhibitor (GW2580) was added for 2 hours at 20 µM prior to the stimulation with mM-CSF or mIL-34, signal transduction was completely inhibited in response to either mM-CSF or mIL-34 stimulation. Similar results were obtained using human CD14⁺ monocytes; hM-CSF and hIL-34 induced the phosphorylation of AKT and ERK1/2 and this was completely inhibited in the presence of GW2580 (Figure 5, right panel). These results demonstrate that IL-34 induces osteoclastogenesis through cfms, and that the biological activities of M-CSF and IL-34 overlap during osteoclastogenesis.

IL-34 promotes the adhesion and proliferation of osteoclast precursors but does not modulate osteoclast survival

To better understand the mechanism by which IL-34 increases osteoclastognesis, we analyzed its impact on monocyte adhesion, proliferation and survival. Figure osteoclast 6A demonstrated that hIL-34 and h-M-CSF promoted the adhesion of CD14⁺ cells in a dose-dependent manner. Furthermore, hIL-34 with a twice higher concentration hM-CSF compared to induced the proliferation of CD14⁺ cells and confirmed the data published by Lin et al. [24] (Figure 6B). We then assessed the effect of IL-34 deprivation on osteoclast survival (Figure 6C). Three days of hIL-34 or hMdeprivation had no effect on CSF osteoclast survival in contrast to RANKL deprivation which resulted in a strong apoptosis of these cells. hIL-34 is an inductor **RANKL**-dependent of osteoclastogenesis but does not act as a survival factor of osteoclast. Overall, these data demonstrated that IL-34 stimulated RANKL-dependent osteoclastogenesis by promoting the adhesion and proliferation of osteoclast progenitors.

DISCUSSION

Numerous cytokines has been already involved in the pathophysiology of osteoclasts [3, 7, 22, 29]. Two main factors appeared as key molecules orchestrating the osteoclast differentiation process and survival [7]: M-CSF which modulates cell adhesion, differentiation, fusion [30] and resorbing activity and RANKL which is dedicated to the osteoclast fusion. activation and survival [8, 11]. RANKL and M-CSF then represent the canonical pathway of osteoclastogenesis which can be substituted by other protagonists in specific contexts. Thus, substitutes for RANKL include TNFa, IL-11 and IL-8 [31, 32] and those for M-CSF include VEGF, HGF and FLt-3 ligand [32]. IL-34 is a recently discovered cytokine which the unique role already described is its action as a regulator of myeloid lineage differentiation, proliferation, and survival, acting *via* c-fms [24]. The present study showed that IL-34 plays an important role in RANKL-induced osteoclastogenesis as it can substitute for M-CSF and support osteoclast differentiation in the same way as M-CSF does. IL-34 must be now considered as a novel non-canonical pathway of osteoclast formation.

M-CSF was identified as а molecule mediating the survival and proliferation of precursors of monocytes and their differentiation onto mature phagocyte [33]. The role of M-CSF has been confirmed by the observation that op/op mice which fail to express functional M-CSF because of a point mutation in the Csfl gene are osteopetrotic [19]. c-fms, is the sole known receptor for M-CSF and its implication functional osteoclastogenesis has been established by the fact that mice lacking Csflr gene coding for c-fms, exhibit a more severe osteopetrosis than op/op, suggesting the existence of a second ligand for this receptor [34]. Autocrine regulation by M-CSF has been reported specifically during inflammatory response and in cancer cells [35]. Indeed, transgenic expression of M-CSF in c-fms-expressing cells leads to macrophage activation associated with osteoporosis [35]. However in vitro experiments evidenced that no osteoclasteogenesis occurred in the absence of M-CSF or of its known substitutes [32]. Thus, autocrine and paracrine regulation pathways by M-CSF in c-fms-bearing cells participate to the of osteoclastogenesis. control The mechanisms allowing the formation of large osteoclasts in GCT which are responsible to the associated osteolytic lesions [2, 36, 37], are not well understood. However, it is accepted that stromal cells located between osteoclasts represent the promoting tumour component

osteoclastogenesis [38]. M-CSF has been identified as one of the numerous factors associated with this pathology. Indeed, Atkins *et al*, evidenced that stromal cells from GCT highly expressed M-CSF and thus contribute to osteoclastogenesis in a paracrine manner [3] confirming that M-CSF acts mainly through paracrine pathway activity [22]. Similarly, RANKL produced by stromal cells induces osteoclast formation in GCT in a paracrine manner [3, 23, 36]. Despite its direct activity on osteoclast precursors, RANKL also stimulates partially osteoclastogenesis via endogenous IL-1 production [39].

In this context, IL-34 appears as a new non-canonical candidate associated with osteoclastogenesis process. Overall, the present data reveal that the recently discovered IL-34 cytokine is strongly expressed by GCT and can substitute for M-CSF in **RANKL-induced** osteoclastogenesis in both human and mouse models. The present work identifies an important novel function for this cytokine. The immunolocalization of IL-34 demonstrates that the cytokine is mainly expressed by osteoclast-like cells and slightly by the stromal compartment suggesting a main autocrine and secondary paracrine mechanism of action on osteoclastogenesis. The autocrine loop controlling osteoclast differentiation and activity is strengthened by the presence of IL-34 positive staining in bone resorbing osteoclasts. The detection of M-CSF has been also evidenced in osteoclasts and strongly in stromal component [40]. These observations suggest that the presence of M-CSF in osteoclasts also observed in stromal cells could be explained by an production of osteoclastexcessive inducing cytokines then inducing osteoclast-like differentiation of inappropriate or unusual precursors. Monocytes and osteoclast-like cells appear as the main targets of M-CSF and IL-34 as revealed by the pattern of c-fms Around expression. 50% of GCT expressed an opposite concentrations of M- CSF and IL-34, pointing out the redundancy of these two cytokines. This observation allow to evidence two sub-types of GCT with high and low expression of IL-34.

Similarly, RANKL produced by stromal cells has been detected in osteoclast-like cells of GCT [23]. The authors suggested that the presence of RANKL in osteoclast can be explained by a pathological production of RANKL by these cells or by the accumulation of pathologic accumulation of the cytokine by the cells overexpressing its receptor RANK. In the present paper, similar hypothesis can be envisaged, especially because osteoclasts express c-fms. The involvement of IL-34 in inflammatory process associated with the tumour development is strengthened by its pattern of expression including endothelial cells and smooth muscle cells of vessels. However, around 2% of the giant cells in GCT did not express IL-34. The absence of immunostaining demonstrates the heterogeneity osteoclast-like cells of composing the tumour mass. This negativity can be explained by the absence of c-fms on a sub-cellular population of giant cells or by the lack of undetermined specific receptor of IL-34 on the cell surface. Another explanation could be the non-monocytic origin of these IL-34multinucleated cells. Such cellular heterogeneity has been previously pointed out for RANKL expression [23].

As a new ligand of c-fms, IL-34 can be now considered as a key protagonist of osteoclastogenesis. These results then open novel era for investigation in pathophysiology of bone resorption. Further experiments are needed to determine the involvement of IL-34 in human pathological osteolysis in which M-CSF and RANKL have previously been implicated.

Acknowledgements

We thank Dr. Anke Roelofs for commentaries and English corrections.

Supports: This work was supported by the Région des Pays de la Loire [Program "Ciblage entitled Moléculaire et Applications Thérapeutique" (CIMATH)] and by the program of Agence Nationale de la Recherche 2007 « Pathophysiology N° Human diseases » Project of R07196NS. Marc BAUD'HUIN received a fellowship from the Région des Pays de la Loire.

Disclosure Statement: The authors have nothing to disclose

REFERENCES

1. Gupta R, Seethalakshmi V, Jambhekar NA, Prabhudesai S, Merchant N, Puri A *et al.* Clinicopathologic profile of 470 giant cell tumors of bone from a cancer hospital in western India. Ann Diagn Pathol 2008;**12**:239-248.

2. Werner M. Giant cell tumour of bone: morphological, biological and histogenetical aspects. Int Orthop 2006;**30**:484-489.

3. Atkins GJ, Haynes DR, Graves SE, Evdokiou A, Hay S, Bouralexis S *et al.* Expression of osteoclast differentiation signals by stromal elements of giant cell tumors. J Bone Miner Res 2000;**15**:640-649.

4. Rousselle AV, Heymann D. Osteoclastic acidification pathways during bone resorption. Bone 2002;**30**:533-540.

5. Epker BN, Frost HM. Correlation of Bone Resorption and Formation with the Physical Behavior of Loaded Bone. J Dent Res 1965;**44**:33-41.

6. Ilvesaro J, Tuukkanen J. Gapjunctional regulation of osteoclast function. Crit Rev Eukaryot Gene Expr 2003;**13**:133-146.

7. Heymann D, Guicheux J, Gouin F, Passuti N, Daculsi G. Cytokines, growth factors and osteoclasts. Cytokine 1998;**10**:155-168.

8. 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**:457-475.

9. Asagiri M, Takayanagi H. The molecular understanding of osteoclast differentiation. Bone 2007;**40**:251-264.

10. Bruzzaniti A, Baron R. Molecular regulation of osteoclast activity. Rev Endocr Metab Disord 2006;**7**:123-139.

11. Baud'huin M, Lamoureux F, Duplomb L, Redini F, Heymann D. RANKL, RANK, osteoprotegerin: key partners of osteoimmunology and vascular diseases. Cell Mol Life Sci 2007;**29**:29.

12. Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C *et al*. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. Nature 1999;**397**:315-323.

13. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T *et al.* Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. Cell 1998;**93**:165-176.

14. Takahashi N, Udagawa N, Suda T. A new member of tumor necrosis factor ligand family, ODF/OPGL/TRANCE/RANKL, regulates osteoclast differentiation and function. Biochem Biophys Res Commun

1999;**256**:449-455. 15. Wong BR, Rho J, Arron J, Robinson E, Orlinick J, Chao M *et al.* TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. J Biol Chem 1997;**272**:25190-25194.

16. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S *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**:3597-3602.

17. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. Nature 2003;**423**:337-342.

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

19. Wiktor-Jedrzejczak W, Bartocci A, Ferrante AW, Jr., Ahmed-Ansari A, Sell KW, Pollard JW *et al.* Total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (op/op) mouse. Proc Natl Acad Sci U S A 1990;**87**:4828-4832.

20. Felix R, Cecchini MG, Fleisch H. Macrophage colony stimulating factor restores in vivo bone resorption in the op/op osteopetrotic mouse. Endocrinology 1990;**127**:2592-2594.

21. Biskobing DM, Fan X, Rubin J. Characterization of MCSF-induced proliferation and subsequent osteoclast formation in murine marrow culture. J Bone Miner Res 1995;**10**:1025-1032.

22. Nishimura M, Yuasa K, Mori K, Miyamoto N, Ito M, Tsurudome M *et al.* Cytological properties of stromal cells derived from giant cell tumor of bone (GCTSC) which can induce osteoclast formation of human blood monocytes without cell to cell contact. J Orthop Res 2005;**23**:979-987.

23. Grimaud E, Soubigou L, Couillaud S, Coipeau P, Moreau A, Passuti N *et al.* Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL)/osteoprotegerin (OPG) ratio is increased in severe osteolysis. Am J Pathol 2003;**163**:2021-2031.

24. Lin H, Lee E, Hestir K, Leo C, Huang M, Bosch E *et al.* Discovery of a cytokine and its receptor by functional screening of the extracellular proteome. Science 2008;**320**:807-811.

25. Duplomb L, Baud'huin M, Charrier C, Berreur M, Trichet V, Blanchard F *et al.*

Interleukin-6 inhibits receptor activator of nuclear factor kappaB ligand-induced osteoclastogenesis by diverting cells into the macrophage lineage: key role of Serine727 phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 3. Endocrinology 2008;**149**:3688-3697.

26. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A *et al.* Accurate normalization of realtime quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol 2002;**3**:RESEARCH0034.

27. Aldridge SE. Lennard TW. Williams JR, Birch MA. Vascular endothelial growth factor acts as an osteolytic factor in breast cancer metastases to bone. Br J Cancer 2005;**92**:1531-1537.

28. Islam S, Hassan F, Tumurkhuu G, Dagvadorj J, Koide N, Naiki Y *et al.* Receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand induces osteoclast formation in RAW 264.7 macrophage cells via augmented production of macrophagecolony-stimulating factor. Microbiol Immunol 2008;**52**:585-590.

29. Grimaud E, Redini F, Heymann D. Osteoprotegerin: a new therapeutic agent for the treatment of bone disease. Drug Discov Today 2001;**6**:1241-1242.

30. Hodge JM, Kirkland MA, Nicholson GC. Multiple roles of M-CSF in human osteoclastogenesis. J Cell Biochem 2007;**102**:759-768.

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

32. Knowles HJ, Athanasou NA. Canonical and non-canonical pathways of osteoclast formation. Histol Histopathol 2009;**24**:337-346.

33. Ross FP, Teitelbaum SL. alphavbeta3 and macrophage colony-

stimulating factor: partners in osteoclast biology. Immunol Rev 2005;**208**:88-105.

34. Dai XM, Ryan GR, Hapel AJ, Dominguez MG, Russell RG, Kapp S *et al.* Targeted disruption of the mouse colonystimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. Blood 2002;**99**:111-120.

35. Wei S, Dai XM, Stanley ER. Transgenic expression of CSF-1 in CSF-1 receptor-expressing cells leads to macrophage activation, osteoporosis, and early death. J Leukoc Biol 2006;**80**:1445-1453.

36. Turcotte RE. Giant cell tumor of bone. Orthop Clin North Am 2006;**37**:35-51.

37. Gouin F, Couillaud S, Cottrel M, Godard A, Passuti N, Heymann D. Presence of leukaemia inhibitory factor (LIF) and LIF-receptor chain (gp190) in osteoclast-like cells cultured from human giant cell tumour of bone. Ultrastructural distribution. Cytokine 1999;**11**:282-289.

38. James IE, Dodds RA, Lee-Rykaczewski E, Eichman CF, Connor JR, Hart TK *et al.* Purification and characterization of fully functional human osteoclast precursors. J Bone Miner Res 1996;**11**:1608-1618.

39. Lee SK, Gardner AE, Kalinowski JF, Jastrzebski SL, Lorenzo JA. RANKLstimulated osteoclast-like cell formation in vitro is partially dependent on endogenous interleukin-1 production. Bone 2006;**38**:678-685.

40. da Costa CE, Annels NE, Faaij CM, Forsyth RG, Hogendoorn PC, Egeler RM. Presence of osteoclast-like multinucleated giant cells in the bone and nonostotic lesions of Langerhans cell histiocytosis. J Exp Med 2005;**201**:687-693.





Figure 1: Giant cell tumours of bone expressed IL-34, M-CSF and c-fms. Assessment of IL-34, M-CSF (**A**) and c-fms (**B**) expression by quantitative PCR was performed in 14 patients were treated at the Department of Orthopaedic Surgery (University Hospital of Nantes, France) between November 2000 and May 2006.





Figure 2: IL-34 is mainly expressed by osteoclast-like cells. Immunolocalization of IL-34 (panels b-e), M-CSF (panels f, g) and c-fms (panels h, i) in GCT. Representative non-immune negative control is represented in "a". Most of multinucleated osteoclast-like giant cells (arrow) exhibited positive immunostaining for IL-34 (b), some multinucleated cells (arrow) were negative (c). In contrast to osteoblasts, bone-resorbing osteoclasts (arrow head) expressed IL-34 staining (d). GCT were also positive for M-CSF and c-fms (f-i). In contrast to IL-34, M-CSF was expressed simultaneously by osteoclast-like cells (f, arrow) and by the stromal component (f, asterix). c-fms staining appeared positive for osteoclast-like cells (arrow) and monocytic cell type (i, arrow head). Similarly to IL-34, bone-resorbing osteoclasts were positive for M-CSF (g) and c-fms (i). Endothelial cells and smooth muscle cells presented similar strong positive immunoreactivity in contrast to adipocytes which are negative (data not shown). Original magnification: X 200 (a, b, h); x 400 (c-e, f, g, i).

Figure 3: IL-34 supports RANKL-induced osteoclastogenesis from murine RAW 264.7 cells and CD11b⁺ cells



Figure 3: IL-34 supports RANKL-induced osteoclastogenesis from murine RAW 264.7 cells and CD11b⁺ cells. (A) After 5 days of culture in the presence of hRANKL (100 ng/ml), mM-CSF (100 ng/ml) or mIL-34 (100 ng/ml), RAW 264.7 cells were stained with MGG (original magnification: x 40) and (B) multinucleated cells (more than 3 nuclei) were counted under a light microscope (*, p<0.05 as compared to RANKL alone). (C) mRNA expression (by Real-Time PCR) of specific osteoclastic markers after 5 days in culture with RANKL, M-CSF and IL-34 (*, p<0.05 as compared to the corresponding control without RANKL). (D) Mouse CD11b⁺ cells were cultures in the presence of hRANKL (100 ng/ml), mM-CSF or mIL-34. After 15 days of culture, multinucleated cells (more than 3 nuclei) were counted under a light microscope after a TRAP staining. All experiments were performed three times in triplicate. * p<0.05, ** p<0.01 as compared to the control.

Figure 4: IL-34 can substitute M-CSF in RANKL-induced osteoclastogenesis of human CD14⁺ monocytes



Figure 4: IL-34 can substitute M-CSF in RANKL-induced osteoclastogenesis of human CD14⁺ monocytes. (A) Human CD14⁺ monocytes were cultured for 15 days in the presence of hRANKL (100 ng/ml), hM-CSF or hIL-34 (original magnification: x 400) and (B) count of multinucleated TRAP⁺ cells (more than 3 nuclei) under a light microscope. (C) mRNA expression (by Real-time PCR) of specific osteoclastic markers after culture of CD14⁺ cells for 15 days. (D) Resorption lacunae obtained by osteoclasts (from CD14⁺) cultured on dentine slices (original magnification: x 2.5). All experiments were performed three times in triplicate. * p<0.05, ** p<0.01 as compared to the control.

Figure 5: IL-34 stimulates the MAP-Kinase, PI3-Kinase pathways through c-fms



Figure 5: IL-34 stimulates the MAP-Kinase, PI3-Kinase pathways through c-fms. Undifferentiated murine RAW 264.7 cells and human $CD14^+$ monocytes were stimulated for 15 min at 37°C with 100 ng/ml of M-CSF or IL-34, and with or without 20 μ M of GW2580, a specific inhibitor of c-fms. Protein lysates were prepared and expression of Phospho-AKT, total-AKT, Phospho-ERK1/2 and total-ERK1/2 was analyzed by western blotting. All experiments were repeated three times, and a representative blot is shown.

Figure 6: IL-34 promotes adhesion and proliferation of osteoclast progenitors but does not affect osteoclast survival



Figure 6: IL-34 promotes adhesion and proliferation of osteoclast progenitors but does not affect osteoclast survival. Human CD14⁺ monocytes were cultured for 3 days (adhesion assay) (A) or 10 days (proliferation assay) (B) in the presence of hM-CSF or hIL-34 or absence of these factors (control condition: CT). (C) Human osteoclasts were formed from CD14⁺ monocytes cultured for 14 days in the presence of hRANKL (100 ng/ml), hM-CSF or hIL-34. After this differentiation period, hRANKL, hM-CSF or hIL-34 were removed for 3 days and osteoclast survival/apoptosis were visualized under a light microscope. Original magnification: X 40. Arrows: apoptotic osteoclasts. * p<0.05, ** p<0.01 as compared to the control.

Table I: Characteristics of patients suffering from giant cell

tumours who were included in the study

Patient	Age/Sex	Localization of tumour	Follow-up	
1	62/M	Proximal tibia	>5 years*	
2	74/F	Distal radius	> 5 years*	
3	35/F	Distal radius	> 5 years*	
4	49/M	Humerus	Death not related to the tumour	
5	33/F	Femur: inferior extremity	Local recurrence, 15 months	
6	25/M	Distal femur	>4 years*	
7	24/F	Proximal tibia	> 1 year*	
8	38/F	Patella	Local recurrence, 12 months	
9	23/M	Femur: inferior extremity	>4 years*	
10	49/F	Radius	Local recurrence	
11	61/F	Proximal tibia	>4 years*	
12	37/F	Distal femur	>4 years*	
13	45/F	Proximal tibia	>4 years*	
14	22/F	Distal femur	Two successive local recurrences	

*: follow-up without local recurrence

Table II: Oligonucleotide primers used for real-time PCR

Gene	Accession number	Primer sequences (from 5' to 3')
hHprt	NM_000194.1	TGACCTTGATTTATTTTGCATACC CGAGCAAGACGTTCAGTCCT
hCyc1	NM_001916	GCATGGTGGTGAGGACTACG GGCCAGGAAAGTAGGGGTTG
hTRAP (Acp5)	NM_001611	AAGACTCACTGGGTGGCTTTG GGCAGTCATGGGAGTTCAGG
hCtsk	NM_000396.2	GCCAGACAACAGATTTCCATC CAGAGCAAAGCTCACCACAG
hNFATc1	NM_006162	GGTCTTCGGGAGAGAGAAA TGACGTTGGAGGATGCATAG
hIL-34	NM_152456	GTGCTTAGGCCTCTGTGGAC GCCAAGGAAGATCCCAAGATA
hM-CSF	NM_172212.2	GTTTGTAGACCAGGAACAGTTGAA CGCATGGTGTCCTCCATTAT
hc-fms	NM_005211.3	CTGCATTTGCCCAAAGA CTCCTGAAGGAAGGAGCAGAT
mHprt	NM_013556.2	TCCTCCTCAGACCGCTTTT CCTGGTTCATCATCGCTAATC
mCyc1	NM_025567.1	TGTGCTACACGGAGGAAGAA CATCATCATTAGGGCCATCC
mTRAP (Acp5)	NM_007388	CGTCTCTGCACAGATTGCAT AAGCGCAAACGGTAGTAAGG
mCtsk	NM_007802.2	GGAGGCGGCTATATGACCA GGCGTTATACATACAACTTTCATCC

Interleukin-6 Inhibits Receptor Activator of Nuclear Factor *k*B Ligand-Induced Osteoclastogenesis by Diverting Cells into the Macrophage Lineage: Key Role of Serine⁷²⁷ Phosphorylation of Signal Transducer and Activator of Transcription 3

Laurence Duplomb,* Marc Baud'huin,* Céline Charrier, Martine Berreur, Valérie Trichet, Frédéric Blanchard, and Dominique Heymann

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (L.D., M.Ba., C.C., M.Be., V.T., F.B., D.H.), ERI 7, and Université de Nantes (L.D., M.Ba., C.C., M.Be., V.T., F.B., D.H.), Nantes atlantique universités, Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, EA3822, Nantes F-44035, France; and Centre Hospitalier Universitaire (D.H.), Hôtel Dieu, Nantes 86021, France

Osteoclasts are bone-resorptive cells that differentiate from hematopoietic precursors upon receptor activator of nuclear factor κB ligand (RANKL) activation. Previous studies demonstrated that IL-6 indirectly stimulates osteoclastogenesis through the production of RANKL by osteoblasts. However, few data described the direct effect of IL-6 on osteoclasts. To investigate this effect, we used several models: murine RAW264.7 cells, mouse bone marrow, and human blood monocytes. In the three models used, the addition of IL-6 inhibited RANKL-induced osteoclastogenesis. Furthermore, IL-6 decreased the expression of osteoclast markers and up-modulated macrophage markers. To elucidate this inhibition, signal transducer and activator of transcription (STAT) 3, the main signaling molecule activated by IL-6, was analyzed. Ad-

BONE REMODELING depends on osteoblast and osteoclast cells. Osteoblasts are responsible for bone apposition, whereas osteoclasts are specialized in bone resorption. Osteoclasts are multinucleated cells that differentiate from hematopoietic precursors localized in bone marrow and are closely related to macrophages (1, 2). Osteoclastic precursors differentiate into mature osteoclasts thanks to a tight interaction with osteoblastic/stromal cells: cell to cell interactions are necessary as well as the production of factors by osteoblasts (3–6). The receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL), also called osteoprotegerin ligand, TNFrelated activation-induced cytokine, or differentiation factor, is a key factor during osteoclastogenesis (7–12). RANKL dition of two STAT3 inhibitors completely abolished RANKLinduced osteoclastogenesis, revealing a key role of STAT3. We demonstrated that a basal level of phosphorylated-STAT3 on Serine⁷²⁷ associated with an absence of phosphorylation on Tyrosine⁷⁰⁵ is essential for osteoclastogenesis. Furthermore, a decrease of Serine⁷²⁷ phosphorylation led to an inhibition of osteoclast differentiation, whereas an increase of Tyrosine⁷⁰⁵ phosphorylation upon IL-6 stimulation led to the formation of macrophages instead of osteoclasts. In conclusion, we showed for the first time that IL-6 inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis by diverting cells into the macrophage lineage, and demonstrated the functional role of activated-STAT3 and its form of phosphorylation in the control of osteoclastogenesis. (*Endocrinology* 149: 3688–3697, 2008)

binds to its receptor, receptor activator of nuclear factor κB (RANK) present at the cell surface of osteoclast precursors and consequently activates different signal transduction pathways, leading to the formation and maturation of osteoclasts (13, 14). The binding of RANKL to RANK activates TNF receptor-associated factor adaptator proteins, particularly TNF receptor-associated factor 6, which in turn targets different proteins such as MAPKs, including ERK, p38, and c-Jun N-terminal kinase, and transcription factors such as nuclear factor- κB (NF- κB) or nuclear factor of activated T cells (6, 13, 15, 16). The phosphatidylinositol 3-kinase is also involved in osteoclastogenesis (17) as well as in the function of bone resorption of mature osteoclasts (18, 19).

IL-6 belongs to the gp130 family, which is composed of IL-6, IL-11, oncostatin M, leukemia inhibitory factor, cardiotrophin-1, and novel neurotrophin-1/B-cell stimulatory factor-3 (20, 21). They are pleiotropic cytokines, sharing the glycoprotein chain gp130 as a common signal transducer (20, 22, 23). The binding of IL-6 to its receptor leads to the activation of two main signal transduction pathways: the Janus kinase/signal transducer and activator of transcription (STAT) and the MAPK pathways. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase after IL-6 stimulation has also been demonstrated in multiple myeloma cells for example (24). In

First Published Online April 10, 2008

^{*} L.D. and M.B. contributed equally to this work.

Abbreviations: CTR, Calcitonin receptor; Ctsk, cathepsin K; FCS, fetal calf serum; hIL, human IL; hRANKL, human receptor activator of nuclear factor κ B ligand; M-CSF, macrophage colony-stimulating factor; MGG, May Grünwald/Giemsa; NF- κ B, nuclear factor- κ B; RANK, receptor activator of nuclear factor κ B ligand; STAT, signal transducer and activator of transcription; TRAP, tartrate-resistant acid phosphatase.

Endocrinology is published monthly by The Endocrine Society (http:// www.endo-society.org), the foremost professional society serving the endocrine community.

pathologies associated with bone loss, such as postmenopausal osteoporosis (25, 26), Paget's disease (27), multiple myeloma (28), rheumatoid arthritis (29), and hyperparathyroidism (30), elevation of IL-6 expression and secretion has been demonstrated (31). In bone microenvironment, IL-6 produced by stromal cells and osteoblasts but not by osteoclasts (32) has stimulated osteoclastogenesis. Indeed, IL-6 in association with its soluble receptor (soluble receptor IL-6) has been a good stimulator of bone resorption in a model of neonatal mouse calvaria (33) or in a model of mouse bone marrow cells in coculture with osteoblastic or stromal cells (34). However, this activity appears mainly due to the production of RANKL by osteoblastic cells, which in turn stimulates the differentiation of osteoclast precursors into osteoclasts, and, thus, induces their maturation and functions (33). Therefore, the effect of IL-6 on osteoclastogenesis can be defined as indirect through the production of RANKL by osteoblasts. However, the direct effect of IL-6 on osteoclastogenesis has never been described. The present study provides strong evidence that IL-6 directly inhibits RANKLinduced osteoclastogenesis in three models using only preosteoclastic cells in the absence of osteoblastic or stromal cells: the murine cell line RAW 264.7, mouse bone marrow cells, and human CD14⁺ monocytes isolated from peripheral blood. Furthermore, we demonstrate the implication of STAT3 and its various phosphorylation forms during osteoclastogenesis.

Materials and Methods

Cell culture and osteoclast differentiation assays

Murine RAW 264.7 monocytic cells (American Type Culture Collection, Promochem, Molsheim, France) were cultured in phenol red-free α -MEM (Invitrogen, Eragny, France) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (Perbio, Logan, UT), and 1% nonessential amino acids (Invitrogen). To induce osteoclast formation, RAW 264.7 cells were scraped and put back at 37 C for 2 min to allow adherence of the more differentiated cells. Nonadherent cells were then seeded in fresh medium at 3×10^3 or 10×10^3 cells in 96- or 24-well plates. After 2 h, recombinant human RANKL, kindly provided by Amgen Inc. (Thousand Oaks, CA), and recombinant human IL (hIL)-6 (R&D Systems, Abington, UK) were added at the concentration of 100 ng/ml (otherwise as noted in the figure legends). In some experiments, specific inhibitors of STAT3 (AG490 and STAT3 inhibitor peptide) or of the MAPK ERK1/2 (UO126) (Calbiochem, Fontenay sous Bois, France) were added at 5 and 100 µM, respectively. In some experiments, RAW 264.7 cells were pretreated with 100 ng/ml hIL-6 before induction of osteoclast differentiation. Multinucleated cells were counted under a light microscope [Leica DM IRB (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany), Olympus D70 camera (Hamburg, Germany), and Olympus DP controller/manager analysis software] after May Grünwald/Giemsa (MGG) staining (Sigma, Saint Quentin-Fallavier, France) or tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining (Leukocyte Acid Phosphatase Assay kit; Sigma). All experiments were performed in triplicate at least three times.

Differentiation of mouse bone marrow cells into osteoclasts

Bone marrow cells were obtained by flushing femur and tibiae from 4-wk-old C57BL6 male mice. Total bone marrow cells were seeded in a 150-mm culture-treated petri dish in α -MEM containing 10% fetal calf serum and 1% penicillin/streptomycin. After 2 h, nonadherent cells were transferred in a new 150-mm petri dish for 18 h. After this second adherence, nonadherent cells were transferred in a nontreated petri dish in α -MEM containing 10% fetal calf serum, 1% penicillin/streptomycin, and 30 ng/ml mouse macrophage colony-stimulating factor (M-CSF). After 3 d, cells were detached by trypsin-EDTA treatment for 10 min, and then seeded at 350 × 10³ cells per well in 24-well plates in the presence

of 10 ng/ml mouse M-CSF, with or without 100 ng/ml human RANKL (hRANKL) and 100 ng/ml hIL-6. Medium was changed every 4 d. TRAP staining was performed after 20-d culture. All experiments were performed in triplicate at least three times.

Differentiation of human CD14⁺ cells into osteoclasts

Human peripheral blood mononuclear cells were isolated by centrifugation over Ficoll gradient (Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO). CD14⁺ cells were magnetically labeled with CD14 Microbeads and positively selected by MACS technology (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). CD14⁺ cells were seeded in 24-well plates (250×10^3 cells per well) in α -MEM containing 10% FCS and 25 ng/ml human M-CSF. After 3-d culture, medium was changed with fresh medium containing 10% FCS, 25 ng/ml human M-CSF, with or without 100 ng/ml hRANKL, and with or without 100 ng/ml hIL-6. Thereafter, medium was changed every 4 d. The formation of osteoclasts occurred around 12-d culture and was observed by TRAP staining.

RNA isolation and real-time PCR

Total RNA was extracted using TRIZOL reagent (Invitrogen). Firststrand cDNA was synthesized at 37 C for 1 h from 5 μ g total RNA in a 50 μ l mixture containing RT buffer, 0.5 μ g Random Primers, 0.5 mM deoxynucleotide triphosphate mix, 20 U Rnasout, and 400 U Moloney murine leukemia virus-reverse transcriptase (all from Invitrogen). Sequences of primers used for real-time PCR are listed in Table 1. The real-time PCR contained, in a final volume of 10 μ l, 10 ng reversetranscribed total RNA, 300 nM of the forward and reverse primers, and 5 μ l 2× SYBR green buffer (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). PCRs were performed in triplicate in 96-well plates, using the Chromo4 System (Bio-Rad). *Mus musculus* hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1 and cytochrome c-1 were used as an invariant control. Analysis was performed using the Vandesompele method (35).

Western blot analysis

RAW 264.7 and CD14⁺ cells were cultured in the presence or not of 100 μ M AG490 for 4 h at 37 C, and then stimulated with 25 ng/ml hIL-6 for 15 min. Extractions of cytoplasmic and nuclear proteins were performed with the NE-PER nuclear and cytoplasmic extraction kit from Pierce (Rockford, IL) according to the manufacturer's instructions. Protein concentrations were determined with the BCA protein assay (Sigma). Proteins were run on 10% SDS-PAGE and transferred to Immobilon-P membrane (Millipore, Bedford, MA). The membrane was blotted with antibodies to actin, phospho-STAT3 Tyr⁷⁰⁵ and phospho-STAT3 Ser⁷²⁷ (Cell Signaling Technologies, Beverly, MA), in PBS, 0.05% Tween 20, 3% BSA, washed, and probed with the secondary antibody coupled to horseradish peroxidase. The labeled proteins were detected using ECL reagent (Roche, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's recommendations. Bands on Western blots were visualized using a CCD camera (Syngene G-Box; Syngene, Cambridge, UK), and

FABLE	1.	Oligonucleotide	primers	used for	real-time	PCR

Gene	Accession no.	Primers sequence $(5'-3')$
Hprt	NM_013556.2	TCCTCCTCAGACCGCTTTT
		CCTGGTTCATCATCGCTAATC
Cyc1	NM_025567.1	TGTGCTACACGGAGGAAGAA
		CATCATCATTAGGGCCATCC
TRAP (Acp5)	NM_007388	CGTCTCTGCACAGATTGCAT
		AAGCGCAAACGGTAGTAAGG
CTR	NM_{007588}	GAAGATGAGGTTCCTTCTCGTG
		GATCAAGGCCGGAGTCAGTG
Ctsk	$NM_{007802.2}$	GGAGGCGGCTATATGACCA
		GGCGTTATACATACAACTTTCATCC
RANK	NM_057149.1	AGACACAGAAGCACTACCTGACTC
		GGCCCCACAATGTGTTGTA
Emr1	NM_010130	TCCTCCTTGCCTGGACACT
		GCCTTGAAGGTCAGCAACC
CD11b	NM_008401	GGCACGCAGACAGGAAGT
		CCCAGCAAGGGACCATTA

3690 Endocrinology, July 2008, 149(7):3688-3697

quantification of band densities was obtained using the Syngene Gene-Tool software. Experiments were performed four times for RAW 264.7 cells and twice for CD14⁺ cells.

Luciferase activity

RAW 264.7 cells were cotransfected using lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) with pSiemLuc vectors expressing a Firefly luciferase reporter gene containing three copies of a STAT3 consensus binding site linked to a minimal thymidine kinase promoter (kindly provided by Dr. H. Gascan, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité Mixte de Recherche 564, Angers, France) (36) and pRL-CMV as an internal control of transfection. pSiemLuc is a plasmid demonstrating STAT3 activity, and pZTK plasmid is the corresponding empty control vector. Luciferase activity was determined using the Dual Luciferase Reporter Assay system kit from Promega (Charbonnières, France) according to the manufacturer's recommendations. Experiments were performed three times.

Flow cytometry

At the end of the differentiation culture, RAW 264.7 cells were harvested with 0.02% EDTA, incubated with mouse seroblock to eliminate nonspecific binding, then incubated at 4 C for 30 min with different antibodies against macrophage specific markers [PE-CD1b (Mac-1), PE-F4/80, and mouse seroblock all from Serotec Ltd., Oxford, UK] in PBS containing 1% BSA, and then washed and fixed in PBS 1% formaldehyde. Irrelevant isotype-matched antibodies were used to determine levels of nonspecific binding. Flow cytometry analysis was performed on a FACScan using CELLQuest software (both from BD, Franklin Lakes, NJ). The experiment was performed at least three times.

Statistical analysis

The mean \pm sp was calculated for all conditions and compared by ANOVA, with the Bonferroni multiple comparisons test as a *post hoc* test. Differences relative to a probability of two-tailed *P* < 0.05 were considered significant.

Results

IL-6 inhibits osteoclastogenesis on RAW 264.7 cells

To investigate the direct role of IL-6 on osteoclast differentiation, we examined the effect of IL-6 on RANKL-induced osteoclast formation from murine RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were cultured for 5 d in the presence of 100 $\rm ng/ml$ hRANKL with or without 100 ng/ml hIL-6. After 4-d culture in the presence of hRANKL, a large number of multinucleated osteoclast-like cells (more than three nuclei) can be observed (Fig. 1A). Interestingly, although IL-6 alone had no effect on osteoclast differentiation of RAW 264.7 cells, 100 ng/ml hIL-6 added during the culture strongly inhibited the hRANKL-dependent osteoclast formation, and only a few and very small multinucleated cells persisted. Thus, the addition of IL-6 inhibited RANKL-induced osteoclast differentiation of RAW 264.7 cells in a dose-dependent manner (no inhibition at 1 ng/ml, 38% inhibition at 10 ng/ml and 81% inhibition at 100 ng/ml compared with the control without cytokine, P < 0.05) (Fig. 1B). Furthermore, IL-6 acted during the earliest steps of osteoclastic differentiation. Indeed, when IL-6 was added at d 1 of the experiment, RANKL-induced osteoclastogenesis was totally abolished, but if IL-6 was added at d 2 or 3, IL-6 had no effect on RANKL-induced osteoclastogenesis (Fig. 2A). To determine whether the inhibition of osteoclastogenesis induced by IL-6 was reversible or not, RAW 264.7 cells were cultured during 3 d with or without 100 ng/ml hIL-6 before adding hRANKL for 5 d with



FIG. 1. IL-6 inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis on RAW 264.7 cells. A, MGG staining of RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were cultured for 5 d in the presence or not of 100 ng/ml hRANKL with or without 100 ng/ml hIL-6 (original magnification, \times 100). B, Dose response of hIL-6 activity (0–100 ng/ml) in the presence of 100 ng/ml hRANKL to induce osteoclastogenesis. RAW 264.7 cells were stained with MGG, and multinucleated cells (more than three nuclei) were counted under a light microscope. Results are expressed as the number of multinucleated cells per well. Each value represents the mean (\pm SD) of multinucleated cells per well of a triplicate. All experiments were performed independently three times in triplicate. ***, *P* < 0.001 compared with hRANKL conditions.

or without hIL-6. As shown in Fig. 2B, the effect induced by hIL-6 was irreversible. Indeed, after being exposed for 3 d to hIL-6, RAW 264.7 cells were unable to differentiate into osteoclasts upon hRANKL activation. Interestingly, a new cell morphology appeared when RAW 264.7 cells were cultured for 5 d with hIL-6, and this became evident after 3 more days of culture (Fig. 2B). Indeed, the new large cells (*black arrows*) are characterized by a dense central zone containing nucleus and a poorly stained peripheral cytoplasm possessing numerous vacuoles. These cells also possessed numerous fine and dense filopodia. The cytological aspect of these cells is totally different from the multinucleated osteoclasts, and their size is smaller than osteoclasts. Thus, we hypothesized that these cells are macrophages, and we investigated this possibility.

IL-6 differentially modulates osteoclast and macrophage markers on RAW 264.7 cells

We next investigated the mRNA expression profile of some osteoclast and macrophage markers in RAW 264.7 cells cultured in the presence of 100 ng/ml hRANKL with or without 100 ng/ml hIL-6. Four specific osteoclast markers [TRAP, RANK, calcitonin receptor (CTR), and cathepsin K (Ctsk)] and two macrophage markers (Emr1 and CD11b) were analyzed by real-time PCR (Fig. 3A). As expected, hRANKL significantly increased osteoclastic markers: 11 times for TRAP, 24 times for CTR, and seven times for Ctsk.

FIG. 2. IL-6 acts during the earliest stages of differentiation, and its effect is irreversible. A, hIL-6 (100 ng/ml) was added to the hRANKL (100 ng/ml)-containing culture medium at d 1, 2, or 3 of the experiment. At d 5 of the culture, MGG staining was performed, and multinucleated cells (more than three nuclei) were counted under a light microscope. Results are expressed as the number of multinucleated cells per well. Each value represents the mean $(\pm SD)$ of multinucleated cells per well of a triplicate experiment. The experiment was performed independently at least three times in triplicate. B. RAW 264.7 cells were pretreated with or without hIL-6 (100 ng/ml) for 3 d. Thereafter, cells were scrapped and put back in culture with the usual protocol of differentiation [*i.e.* 5 d in the presence or not of hRANKL (100 ng/ml) \pm hIL6 (100 ng/ml)]. Cells were then stained with MGG. In the presence of IL-6, new cell morphologies appeared and are shown with black arrows. The experiment was performed at least four times in triplicate (original magnifications, ×100 and ×200). ***, *P* < 0.001.



Moreover, the results clearly showed that hIL-6, even in the presence of hRANKL, strongly abolished the mRNA expression of the four osteoclastic markers studied. We next evaluated the mRNA expression of macrophagic markers such as CD11b and Emr1. RAW 264.7 cells expressed a basal level of these two markers, which were decreased during hRANKL-induced osteoclast differentiation. When hIL-6 was present in the culture medium, the mRNA expression of both macrophagic markers increased, even in the presence of hRANKL, confirming the hypothesis that hIL-6 induced a macrophage phenotype instead of an osteoclastic one.

Flow cytometry analysis was performed to confirm the phenotype of the RAW 264.7 cells cultured in the presence of hIL-6 and/or hRANKL (Fig. 3B). First experiments showed, after treatment with hIL-6, a very strong non-specific background with the IgG2-PE isotype control. We observed that this high background was due to the presence of Fc-receptors CD16:CD32, induced at the RAW 264.7 cell surface by hIL-6 (data not shown). High expression of Fc-receptors is well known on macrophages, which is thus a first argument in favor of a macrophage differentiation induced by IL-6. To abolish the background as-

FIG. 3. IL-6 diverts RAW 264.7 cells into macrophages. A, RAW 264.7 cells were cultured in the presence or not of 100 ng/ml hRANKL with or without 100 ng/ml hIL-6. After 5 d in culture, mRNA expression of osteoclastic and macrophagic markers was analyzed by real-time PCR. Results are expressed as fold increase compared with the control. B, RAW 264.7 cells were cultured for 5 or 11 d in the presence or not of 100 ng/ml hRANKL with or without 100 ng/ml hIL-6. Cells were then analyzed for their expression of macrophagic markers by flow cytometry (faint curve = control unstimulated cells; bold curve = stimulated cells). Experiments were performed at least three times in triplicate. FL2-H, Fluorescence-2 height.


3692 Endocrinology, July 2008, 149(7):3688-3697

sociated with Fc-receptor expression, next experiments were performed with mouse seroblock reagent (anti-CD16:CD32 antibody) before incubation with specific antibodies. As shown in Fig. 3B, after 5-d culture, CD11b was increased with hIL-6 (with or without hRANKL), confirming our hypothesis. Because no significant effect was observed on F4/80 antigen (encoded by Emr1) after 5 d, we continued the culture of RAW 264.7 cells for 6 more days. At the end of this longer culture period, F4/80 expression was significantly increased at the cell surface of RAW 264.7 cells cultured in the presence of hIL-6 (with or without hRANKL). On the contrary, RANKL strongly down modulated F4/80 expression. Furthermore, TRAP staining performed at the end of these 11-d cultures showed that these cells remained in a TRAP negative state (data not shown). The up-regulation of CD16:CD32 and CD11b, and a bit later of F4/80 by hIL-6 confirmed the commitment of RAW 264.7 cells into the macrophage lineage. These results demonstrated that the inhibitory effect of hIL-6 on RANKLinduced osteoclastogenesis was due to the differentiation of RAW 264.7 into macrophages and not to a blockade into osteoclast precursors.

Recently, it has been shown that MafB, a protein of the Maf family selectively expressed in monocytes and macrophages, negatively regulates RANKL-induced osteoclastogenesis by down-regulation of nuclear factor of activated T-cell c1 and osteoclast-associated receptor, and induces macrophage differentiation (37). Thus, we hypothesized that IL-6 could upregulate MafB in RAW 264.7 cells and then could divert cells to the macrophage lineage instead of the osteoclast one. However, no modulation of MafB was detected in our study (data not shown). Duplomb et al. • IL-6 and STAT3 during Osteoclastogenesis

Serine⁷²⁷-phosphorylated STAT3 is mandatory for osteoclastogenesis

To understand further the mechanism of action of hIL-6, we focused our investigations on the STAT-3 transcription factor and MAPK, the two main signal transduction pathways induced by IL-6. UO126, a specific inhibitor of MAPK ERK1/2, did not reverse the inhibitory effect of IL-6 on hRANKL-induced osteoclastogenesis, but, as previously shown by Hotokezaka et al. (38), UO126 significantly increased RANKL-induced osteoclastogenesis (data not shown). Two specific inhibitors of STAT3, AG490 and a STAT3-inhibitor peptide, were used to determine the involvement of the STAT3 signaling pathway in the IL-6 effects on osteoclastogenesis. At the concentrations used, cells grew normally, and no toxicity was observed with these inhibitors (data not shown). As shown in Fig. 4, A and B, STAT3 inhibitors did not reverse the inhibitory effect of hIL6 on hRANKL-induced osteoclastogenesis of RAW 264.7 cells. However, an unexpected result showed that in the presence of hRANKL and STAT3 inhibitors, the osteoclastogenesis was completely blocked, indicating for the first time the essential role played by STAT3 during osteoclastogenesis induced by RANKL. Because STAT3 is not activated by hRANKL (data not shown), the constitutively activated phosphorylated forms of STAT3 were analyzed by Western blots. Even if nuclear import is independent of phosphorylation, Tyrosine⁷⁰⁵ phosphorylation is necessary for STAT3 activation, inducing STAT3 to dimerize, translocate to the nucleus, bind to DNA, and induce specific gene transcription (39, 40). Constitutive phosphorylation of Tyrosine⁷⁰⁵ STAT3 was not detected in RAW 264.7 cells in cytoplasmic or nuclear fractions, but as expected, hIL-6 treatment of RAW 264.7

FIG. 4. STAT3 and its phosphorylation tightly control osteoclastogenesis. RAW 264.7 cells were cultured in the presence of two STAT3 inhibitors. AG490 (5 $\mu\text{M})$ (Å) and STAT 3 inhibitor peptide (100 μ M)(B), with or without 100 ng/ml hRANKL and with or without 25 ng/ml hIL-6. After 5-d culture, MGG staining was performed, and multinucleated cells (more than three nuclei) were counted under a light microscope. C, RAW 264.7 cells were cultured for 4 h in the presence or not of 100 μ M AG490 and then stimulated or not with IL-6 for 15 min. Western blot analysis was performed on cell lysate to determine the level of STAT3 phosphorylated on Tyrosine 705 or Serine⁷²⁷. Actin informed about equal loading charge. Below the Western blot, histograms showed the band intensities quantified using GeneTool software and represented as a ratio to actin signals. Experiments were performed four times. D, Luciferase activity in RAW 264.7 cells was measured 48 h after transfection with pSiemLuc, which is a plasmid demonstrating STAT3 activity, or its corresponding control empty vector (pZTK plasmid). Ct, Control medium.



cells for 15 min induced a strong activation of phospho-Tyrosine⁷⁰⁵ STAT3 in both cytoplasmic and nuclear fractions (Fig. 4C). In contrast, phospho-Serine⁷²⁷ was detected at a basal level in unstimulated cells, and the up-regulation after IL-6 treatment was mainly observed in the nuclear fraction of these cells. Furthermore, we estimated the level of endogenous active STAT3 using a luciferase reporter gene containing three copies of a STAT3 consensus binding site linked to a minimal thymidine kinase promoter. In these conditions, luciferase activity correlated with active STAT3. As shown in Fig. 4C, RAW 264.7 cells expressed a basal level of endogenous active STAT3. Although this experiment could not reveal which form of STAT3 was active, it evidenced that this activity was associated with phospho-Serine⁷²⁷ STAT3. The addition of 100 µM AG490 for 4 h inhibited the IL-6 induced STAT3-Tyrosine⁷⁰⁵ and Serine⁷²⁷ phosphorylations, as well as the basal level of phospho-Serine⁷²⁷ in the control condition without hIL-6 (Fig. 4C). These observations evidenced that a sufficient level of constitutive activation of STAT3 by phosphorylation on Serine⁷²⁷ is mandatory to generate osteoclasts because the presence of AG490 inhibited osteoclastogenesis (Fig. 4A) by reducing the level of Serine⁷²⁷ phosphorylated STAT3 (Fig. 4C).

Furthermore, we checked NF- κ B signaling in cells pretreated with IL-6: cells were treated or not with hIL-6 for 3 d before hRANKL stimulation (100 ng/ml, 20 min). As expected, hRANKL induced the phosphorylation of p65 and p105 in control conditions. When hIL-6 was present for 3 d before hRANKL stimulation, the induction of phosphorylation of p105 and p65 still remained, with the same intensity observed upon hRANKL stimulation. Therefore, hIL-6 does not modulate hRANKL induced-NF- κ B signaling (data not shown).

IL-6 inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis of mouse bone marrow cells and human ${\rm CD14^+}$ monocytes

To confirm the inhibitory effect of IL-6 on osteoclastogenesis, similar experiments were performed using two other models of osteoclast generation: mouse bone marrow cells and human CD14⁺ monocytes isolated from peripheral blood cultured in the presence of M-CSF and RANKL. Indeed, after 20 d, 234 ± 59 TRAP-positive multinucleated cells were generated from mouse bone marrow cells cultured in the presence of M-CSF and hRANKL, whereas only 40 ± 8 TRAP-positive multinucleated cells were formed in the presence of hIL-6 (Fig. 5). This result is in agreement with the results obtained on the RAW 264.7 cell model and confirms the inhibitory effect of hIL6 on RANKL-induced osteoclastogenesis. Similar results were obtained using purified human CD14⁺ monocytes (Fig. 6). Indeed, in the presence of hRANKL, 275 \pm 20 osteoclasts were counted, whereas the number of TRAP positive multinucleated cells was reduced by 87% in the presence of hIL-6 (Fig. 6, A and B). The involvement of Serine⁷²⁷-phosphorylated STAT3 in osteoclastogenesis was confirmed in these models. Indeed, in control condition, a basal level of STAT3 phosphorylated on Serine⁷²⁷ can be observed in human CD14⁺ monocytes, whereas no phosphorylation on Tyrosine⁷⁰⁵ was detected. IL-6 stimulated both Serine⁷²⁷ and Tyrosine⁷⁰⁵ phosphory-



FIG. 5. IL-6 inhibits hRANKL-induced osteoclastogenesis from mouse bone marrow cells. Mouse bone marrow cells were cultured for 20 d in the presence or the absence of 100 ng/ml hRANKL with or without 100 ng/ml IL-6. TRAP staining was performed (A), and TRAP⁺ multinucleated cells were counted (B) under a light microscope. Results are expressed as number of TRAP⁺ multinucleated cells (more than three nuclei) per well. Each value represents the mean (\pm SD) of osteoclast per well of a triplicate experiment. Experiments were performed independently at least three times (original magnification, \times 100).

lations, and this effect was decreased in the presence of AG490 (Fig. 6C).

Discussion

IL-6 is enhanced in pathological situations of bone loss, such as multiple myeloma (41), Paget's disease (27), periodontal disease (42), hyperparathyroidism (30), and rheumatoid arthritis (29). For this reason the role of IL-6 has often been studied in vitro using different models of coculture of osteoblast and osteoclast progenitors. These studies have reported a pro-osteoclastic activity of IL-6 (33, 34) with a direct effect of this cytokine on osteoblasts inducing the production of RANKL, which in turn activates the differentiation of osteoclast progenitors into osteoclasts. However, the influence of IL-6 on osteoclastogenesis remains disputed (43). Indeed, Kudo et al. (44) showed that IL-6 alone induced osteoclastogenesis from human CD14⁺ monocytes in the absence of RANKL, results in favor of a pro-resorption activity of IL-6. Their results are in accordance with those of Gao et al. (45), who revealed the expression of IL-6 receptors on osteoclast progenitors and mature osteoclasts. Similarly, De Benedetti et al. (46) reported that IL-6 overexpression in prepubertal mice causes an increased osteoclastogenesis, leading to an accelerated bone resorption. On the contrary, Kitamura et al. (47) generated transgenic mice overexpressing hIL-6, which presented a decrease in osteoclast number and bone resorption measured by histomorphometry. The difference observed in these two studies had already been dis-

FIG. 6. IL-6 inhibits hRANKL-induced osteoclastogenesis from purified human CD14⁺ cells. Purified human CD14+ monocytes isolated from peripheral blood were cultured for 12 d in the presence or not of 100 ng/ml hRANKL with or without 100 ng/ml IL-6. TRAP staining was then performed (A), and TRAP multinucleated cells (more than three nuclei) were counted (B) under a light microscope (original magnification, $\times 100$). Experiments were performed independently more than three times. C, Human CD14⁺ monocytes were cultured 4 h in the presence or absence of 100 μ M AG490 and then stimulated or not with 100 ng/ml hIL-6 for 15 min. We stern blot analysis was performed on cell lysates to determine the level of phospho-Tyrosine 705 and -Serine 727 STAT3. Actin informed about equal loading charge. Below the Western blot, histograms showed the band intensities quantified using GeneTool software and represented as a ratio to actin signals. Experiments were performed three times independently. Ct, Control medium.



cussed by De Benedetti et al. (46), who suggested that the impact of IL-6 on osteoclasts may depend on the age of the animal. Indeed, De Benedetti et al. (46) studied prepubertal mice, whereas Kitamura et al. (47) studied adult mice. This phenomenon relative to the development of the animal had been observed by Hoshino et al. (48) in a model of collageninduced arthritis in rats. Adult rats showed a decrease in bone resorption due to a decrease in osteoclastogenesis, whereas prepubertal rats displayed an increase of bone resorption and an increased number of osteoclasts. In the present study, we have explored the direct effect of IL-6 on osteoclast progenitors obtained from three different models (RAW 264.7 cell line, mouse bone marrow cells, and human CD14⁺ monocytes), and demonstrated in these three models that IL-6 targeted osteoclast precursors and inhibited RANKL-induced osteoclastogenesis, diverting them into the macrophage lineage. Similarly, Flanagan et al. (49) demonstrated that IL-6 failed to induce bone resorption in contrast to vitamin D3. These apparent discrepancies could be explained by the model of osteoclastogenesis and especially the experimental conditions used (serum, medium, etc.), and by the potential interaction of IL-6 signaling with Ca²⁺ sensing (50). Indeed, Ca²⁺ levels strongly affect osteoclastogenesis, and modulate the expression of IL-6 and IL6 receptors. Such an autocrine-paracrine loop may affect osteoclastic activity in the face of Ca²⁺ level generated locally during resorption and present in the serum and culture medium. A dual function of IL-6 cannot be excluded depending on the biological microenvironment (ions, cytokines, etc.). IL-6 may be considered as a pro-resorption factor as well as a protector of bone. Indeed, high IL-6 concentration produced during osteolytic pathologies may reflect a protective mechanism of the skeleton to compensate increased bone resorption especially induced by RANKL. IL-6 may then be produced to counterbalance the high RANKL concentrations produced in bone

microenvironment. Such a protective mechanism has been envisaged for osteoprotegerin in osteoporosis (51).

The transcription factor STAT3 and the SHP2/ras/MAPK pathway are the two main signaling pathways activated by IL-6. Their implications during osteoclastogenesis have been proven directly in osteoclasts and indirectly through the production of RANKL by osteoblast cells. Indeed, STAT3 is activated in osteoblasts or stromal cells upon IL-6 stimulation, and it leads to the production of RANKL for induction of osteoclastogenesis (52). In osteoclasts, the role of STAT3 is controversial. Kim et al. (53) demonstrated that an inhibitor of STAT3 (PIAS3) completely abolished osteoclastogenesis, whereas other studies showed an increased number of osteoclasts generated from STAT3 deficient osteoclast precursors (54). Furthermore, Sims et al. (55) used knock-in gp130 mutant mice unable to elicit either gp130-dependent STAT1/3 or SHP2/ras/MAPK activation and suggested that MAPK activation in osteoclasts inhibits osteoclastogenesis, whereas STAT3 in osteoblasts increases osteoclastogenesis through the production of RANKL. Some recent studies indirectly demonstrated the importance of STAT3 in bone physiology. Indeed, STAT3 mutations in its DNA-binding domain cause hyper-IgE syndrome, which is associated with skeletal/dental abnormalities, bone fragility due to increased bone resorption and decreased mineralization (56-58).

In the present study, we confirm the inhibitory role of the MAPK ERK1/2 during hRANKL-induced osteoclastogenesis (38), but we did not confirm the implication of the gp130-SHP2/ras/MAPK pathway in the inhibitory role of IL-6 in osteoclast differentiation. In contrast, the key role of STAT3 and its various forms of phosphorylation were evidenced in osteoclast precursors. Indeed, inhibition of STAT3 by AG490 or STAT3 inhibitor peptide totally prevented hRANKL-induced osteoclastogenesis. Osteoclast precursors express a basal level of Serine⁷²⁷-phosphorylated STAT3 at both cyto-

plasmic and nuclear localization, this form being active as revealed by luciferase assay. This result is in agreement with the work of Liu et al. (59), which demonstrated in a macrophage cell line a basal level of Serine⁷²⁷ phosphorylation without any detection of Tyrosine⁷⁰⁵ phosphorylation. Furthermore, we showed that Tyrosine⁷⁰⁵ phosphorylation, which is undetectable at the basal level but enhanced after IL-6 stimulation, prevailed over the activation of Serine⁷²⁷ phosphorylation, inducing differentiation of RAW 264.7 cells into macrophages and, thus, inhibiting RANKL-induced osteoclastogenesis. Thus, our study indicates that Tyrosine⁷⁰⁵phosphorylated STAT3 is involved in the inhibition of osteoclastogenesis by IL-6, whereas a basal level of Serine⁷²⁷-STAT3 is mandatory to support phosphorylated osteoclastogenesis (Fig. 7).

The role of Serine⁷²⁷ phosphorylation remains unclear. It is generally suggested that Serine⁷²⁷ phosphorylation of STAT3, and even other STATs such as STAT1, is required to achieve a complete and maximal transcriptional activity of STATs (60, 61). However, some transcriptional activity of STAT3 only phosphorylated on Serine⁷²⁷ has also been demonstrated (62, 63). Chung et al. (64) had suggested that phosphorylation of STAT3 on Tyrosine⁷⁰⁵ or Serine⁷²⁷ can be two independent phenomena, which can be induced and regulated independently. This group and others proposed an inhibitory effect of Serine⁷²⁷ phosphorylation on Tyrosine⁷⁰⁵ phosphorylation (64, 65). Thus, even if Tyrosine⁷⁰⁵ phosphorylation of STAT3 has always been suggested as required for STAT3 activation, some studies agree to give more importance to Serine⁷²⁷ phosphorylation. For example, Serine⁷²⁷ phosphorylation mediates the expression of Mcl1 in macrophages (59) or induces transcriptional activity upon nerve growth factor stimulation on PC12 cells (66).

Interconnections between NF- κ B, usually activated by the TNF superfamily cytokines, including RANKL, and STAT3 mostly activated by the gp130 cytokine family have been recently evidenced (67). These authors demonstrated the

constitution of a novel transcription factor complex, formed by the unphosphorylated form of STAT3 bound to unphosphorylated NF- κ B, a complex able to compete with inhibitor κ B. The complex unphosphorylated STAT3-NF-kB accumulates in the nucleus and activates specific genes. Furthermore, they evidenced a feedback loop in which IL-6 induces the phosphorylation of STAT3 leading, in a second step, to an increase of unphosphorylated STAT3 interacting with NF- κ B. A similar mechanism may be hypothesized to explain the cross talk between IL-6 and RANKL (68), especially the inhibitory effect of IL-6 on RANKL-induced osteoclastogenesis. In our present data, IL-6 inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis, revealing a functional cross talk between IL-6 and RANKL.

In conclusion, the present work reveals a key role of STAT3 Serine⁷²⁷ phosphorylation during osteoclastogenesis, and allows clarifying the balance between MAPK ERK1/2 and STAT3 in the bone biology. Thus, our data suggest a dual role of STAT3 depending on the cells (osteoblast or osteoclast) and its phosphorylation form. Indeed, STAT3 in osteoblasts is a pro-osteoclastic molecule inducing the production of RANKL (55). In osteoclasts, STAT3 phosphorylated on Serine⁷²⁷ is also a pro-osteoclastic molecule, but as soon as STAT3 phosphorylated on Tyrosine⁷⁰⁵ becomes in excess of STAT3 phosphorylated on Serine⁷²⁷ (*e.g.* after IL-6 stimulation), STAT3 becomes an antiosteoclastic molecule. Here, we also evidenced a dual role of IL-6 depending on its target cell. On osteoblast, IL-6 is a pro-resorptive cytokine, whereas on osteoclast, IL-6 is an antiresorptive cytokine. Further investigations are needed to clarify the involvement of STAT3, NF-κB, and MAPK ERK1/2 interrelations in osteoclast differentiation to better define novel therapeutic strategies of osteolytic disorders. In pathologies associated with bone loss, such as postmenopausal osteoporosis, Paget's disease, multiple myeloma, rheumatoid arthritis, and hyperparathyroidism, elevation of IL-6 expression and secretion has been demonstrated, and clinical trials using neutralizing IL-6 an-

FIG. 7. Schematic representation of the implication of STAT3 during osteoclast or macrophage differentiation. In undifferentiated pre-osteoclast cells, a pool of Serine (Ser)⁷²⁷-phosphorylated STAT3 is present at a sufficient level and is mandatory for the formation of osteoclast upon RANKL stimulation. In the presence of AG490, Serine⁷²⁷-phosphorylated STAT3 is decreased and is not sufficient to support osteoclast progenitors. Upon IL-6 stimulation, both Serine⁷²⁷ and Tyrosine (Tyr)⁷⁰⁵ are phosphorylated, but Tyrosine⁷⁰⁵ phosphorylation prevailed against Serine⁷²⁷ phosphorylation and leads to inhibition of osteoclastogenesis and induction of macrophage differentiation.



Duplomb et al. • IL-6 and STAT3 during Osteoclastogenesis

tibodies are in progress. In this context a better comprehension of IL-6 activities on bone cells and its molecular mode of action are necessary to develop new and more effective therapies. Our results suggest that better antiresorption treatments could be achieved by targeting more specifically the deleterious effects of IL-6 on osteoblasts and leaving the beneficial antiresorptive effects on osteoclasts. This could be obtained by a specific inhibition of STAT3 in osteoblast, and not in osteoclast.

Acknowledgments

Received December 11, 2007. Accepted April 2, 2008.

Address all correspondence and requests for reprints to: Drs. L. Duplomb and D. Heymann, EA3822-Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale ERI 7 Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, 1 rue Gaston Veil 44035 Nantes Cedex 1, France. E-mails: laurence. duplomb@univ-nantes.fr and dominique.heymann@univ-nantes.fr, respectively.

respectively. This work was supported by the Région des Pays de la Loire (Program entitled "Ciblage Moléculaire et Applications Thérapeutique") and the Agence Nationale de la Recherche 2007 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Pathophysiology of Human Deseases Project No. R07196NS. L.D. has been supported by an Association pour la Recherche sur le Cancer postdoctoral fellowship.

Disclosure Statement: The authors have nothing to disclose.

References

- 1. Chambers TJ 2000 Regulation of the differentiation and function of osteoclasts. J Pathol 192:4–13
- Roodman GD 2006 Regulation of osteoclast differentiation. Ann NY Acad Sci 1068:100–109
- 3. Epker BN, Frost HM 1965 Correlation of bone resorption and formation with the physical behavior of loaded bone. J Dent Res 44:33–41
- Ilvesaro J, Tuukkanen J 2003 Gap-junctional regulation of osteoclast function. Crit Rev Eukaryot Gene Expr 13:133–146
- Heymann D, Guicheux J, Gouin F, Passuti N, Daculsi G 1998 Cytokines, growth factors and osteoclasts. Cytokine 10:155–168
- Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK, Fortun Y, Redini F, Heymann D 2004 The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. Cytokine Growth Factor Rev 15:457–475
- pathophysiological bone remodeling. Cytokine Growth Factor Rev 15:457–475
 7. Takahashi N, Udagawa N, Suda T 1999 A new member of tumor necrosis factor ligand family, ODF/OPGL/TRANCE/RANKL, regulates osteoclast differentiation and function. Biochem Biophys Res Commun 256:449–455
- Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T 1998 Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. Proc Natl Acad Sci USA 95:3597–3602
- Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ 1998 Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. Cell 93:165–176
- regulates osteoclast differentiation and activation. Cell 93:165–176 10. Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, Morony S, Oliveira-dos-Santos AJ, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR, Lacey DL, Mak TW, Boyle WJ, Penninger JM 1999 OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. Nature 397:315–323
- Wong BR, Rho J, Arron J, Robinson E, Orlinick J, Chao M, Kalachikov S, Cayani E, Bartlett 3rd FS, Frankel WN, Lee SY, Choi Y 1997 TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. J Biol Chem 272:25190–25194
- Baud'huin M, Duplomb L, Ruiz Velasco C, Fortun Y, Heymann D, Padrines M 2007 Key roles of the OPG-RANK-RANKL system in bone oncology. Expert Rev Anticancer Ther 7:221–232
- Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL 2003 Osteoclast differentiation and activation. Nature 423:337–342
- Wittrant Y, Theoleyre S, Couillaud S, Dunstan C, Heymann D, Redini F 2004 Relevance of an in vitro osteoclastogenesis system to study receptor activator of NF-kB ligand and osteoprotegerin biological activities. Exp Cell Res 293: 292–301

- Blair HC, Robinson LJ, Zaidi M 2005 Osteoclast signalling pathways. Biochem Biophys Res Commun 328:728–738
- Matsumoto M, Sudo T, Saito T, Osada H, Tsujimoto M 2000 Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway in osteoclastogenesis mediated by receptor activator of NF-κB ligand (RANKL). J Biol Chem 275: 31155–31161
- 17. Lee SE, Woo KM, Kim SY, Kim HM, Kwack K, Lee ZH, Kim HH 2002 The phosphatidylinositol 3-kinase, p38, and extracellular signal-regulated kinase pathways are involved in osteoclast differentiation. Bone 30:71–77
- Hall TJ, Jeker H, Schaueblin M 1995 Wortmannin, a potent inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, inhibits osteoclastic bone resorption in vitro. Calcif Tissue Int 56:336–338
- Nakamura I, Takahashi N, Sasaki T, Tanaka S, Udagawa N, Murakami H, Kimura K, Kabuyama Y, Kurokawa T, Suda T, Fukui Y 1995 Wortmannin, a specific inhibitor of phosphatidylinositol-3 kinase, blocks osteoclastic bone resorption. FEBS Lett 361:79–84
- Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F, Graeve L 1998 Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. Biochem J 334(Pt 2):297–314
- Senaldi G, Varnum BC, Sarmiento U, Starnes C, Lile J, Scully S, Guo J, Elliott G, McNinch J, Shaklee CL, Freeman D, Manu F, Simonet WS, Boone T, Chang MS 1999 Novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3: a cytokine of the IL-6 family. Proc Natl Acad Sci USA 96:11458–11463
- 22. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F 2003 Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. Biochem J 374(Pt 1):1–20
- Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T 1995 Interleukin-6 family of cytokines and gp130. Blood 86:1243–1254
- Hideshima T, Nakamura N, Chauhan D, Anderson KC 2001 Biologic sequelae of interleukin-6 induced PI3-K/Akt signaling in multiple myeloma. Oncogene 20:5991–6000
- Manolagas SC, Jilka RL 1995 Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. N Engl J Med 332:305–311
- 26. Girasole G, Jilka RL, Passeri G, Boswell S, Boder G, Williams DC, Manolagas SC 1992 17β-Estradiol inhibits interleukin-6 production by bone marrowderived stromal cells and osteoblasts in vitro: a potential mechanism for the antiosteoporotic effect of estrogens. J Clin Invest 89:883–891
- Roodman GD 2001 Studies in Paget's disease and their relevance to oncology. Semin Oncol 28(Suppl 11):15–21
- Klein B, Zhang XG, Jourdan M, Boiron JM, Portier M, Lu ZY, Wijdenes J, Brochier J, Bataille R 1990 Interleukin-6 is the central tumor growth factor in vitro and in vivo in multiple myeloma. Eur Cytokine Net 1:193–201
- Kotake S, Sato K, Kim KJ, Takahashi N, Udagawa N, Nakamura I, Yamaguchi A, Kishimoto T, Suda T, Kashiwazaki S 1996 Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptors in the synovial fluids from rheumatoid arthritis patients are responsible for osteoclast-like cell formation. J Bone Miner Res 11:88–95
- 30. Grey A, Mitnick MA, Shapses S, Ellison A, Gundberg C, Insogna K 1996 Circulating levels of interleukin-6 and tumor necrosis factor-α are elevated in primary hyperparathyroidism and correlate with markers of bone resorption–a clinical research center study. J Clin Endocrinol Metab 81:3450–3454
- Heymann D, Rousselle AV 2000 gp130 cytokine family and bone cells. Cytokine 12:1455–1468
- Holt J, Davie MW, Marshall MJ 1996 Osteoclasts are not the major source of interleukin-6 in mouse parietal bones. Bone 18:221–226
 Palmqvist P, Persson E, Conaway HH, Lerner UH 2002 IL-6, leukemia in-
- 33. Palmqvist P, Persson E, Conaway HH, Lerner UH 2002 IL-6, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M stimulate bone resorption and regulate the expression of receptor activator of NF-κB ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF-κB in mouse calvariae. J Immunol 169:3353–3362
- 34. Tamura T, Udagawa N, Takahashi N, Miyaura C, Tanaka S, Yamada Y, Koishihara Y, Ohsugi Y, Kumaki K, Taga T, Kishimoto T, Suda T 1993 Soluble interleukin-6 receptor triggers osteoclast formation by interleukin 6. Proc Natl Acad Sci USA 90:11924–11928
- 35. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F 2002 Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol 3:RESEARCH0034
- Coqueret O, Gascan H 2000 Functional interaction of STAT3 transcription factor with the cell cycle inhibitor p21WAF1/CIP1/SDI1. J Biol Chem 275: 18794–18800
- Kim K, Kim JH, Lee J, Jin HM, Kook H, Kim KK, Lee SY, Kim N 2007 MafB negatively regulates RANKL-mediated osteoclast differentiation. Blood 109: 3253–3259
- Hotokezaka H, Sakai E, Kanaoka K, Saito K, Matsuo K, Kitaura H, Yoshida N, Nakayama K 2002 U0126 and PD98059, specific inhibitors of MEK, accelerate differentiation of RAW264.7 cells into osteoclast-like cells. J Biol Chem 277:47366–47372
- Reich NC, Liu L 2006 Tracking STAT nuclear traffic. Nat Rev Immunol 6:602– 612
- 40. Darnell Jr JE 1997 STATs and gene regulation. Science 277:1630–1635
- 41. Klein B, Wijdenes J, Zhang XG, Jourdan M, Boiron JM, Brochier J, Liautard

Duplomb et al. • IL-6 and STAT3 during Osteoclastogenesis

Endocrinology, July 2008, 149(7):3688-3697 3697

J, **Merlin M**, **Clement C**, **Morel-Fournier B** 1991 Murine anti-interleukin-6 monoclonal antibody therapy for a patient with plasma cell leukemia. Blood 78:1198–1204

- Loos BG, Craandijk J, Hoek FJ, Wertheim-van Dillen PM, van der Velden U 2000 Elevation of systemic markers related to cardiovascular diseases in the peripheral blood of periodontitis patients. J Periodontol 71:1528–1534
- peripheral blood of periodontitis patients. J Periodontol 71:1528–1534
 43. Rousselle AV, Heymann D 2002 Osteoclastic acidification pathways during bone resorption. Bone 30:533–540
- 44. Kudo O, Sabokbar A, Pocock A, Itonaga I, Fujikawa Y, Athanasou NA 2003 Interleukin-6 and interleukin-11 support human osteoclast formation by a RANKL-independent mechanism. Bone 32:1–7
- Gao Y, Morita I, Maruo N, Kubota T, Murota S, Aso T 1998 Expression of IL-6 receptor and GP130 in mouse bone marrow cells during osteoclast differentiation. Bone 22:487–493
- 46. De Benedetti F, Rucci N, Del Fattore A, Peruzzi B, Paro R, Longo M, Vivarelli M, Muratori F, Berni S, Ballanti P, Ferrari S, Teti A 2006 Impaired skeletal development in interleukin-6-transgenic mice: a model for the impact of chronic inflammation on the growing skeletal system. Arthritis Rheum 54: 3551–3563
- 47. Kitamura H, Kawata H, Takahashi F, Higuchi Y, Furuichi T, Ohkawa H 1995 Bone marrow neutrophilia and suppressed bone turnover in human interleukin-6 transgenic mice. A cellular relationship among hematopoietic cells, osteoblasts, and osteoclasts mediated by stromal cells in bone marrow. Am J Pathol 147:1682–1692
- 48. Hoshino K, Hanyu T, Arai K, Takahashi HE 2001 Mineral density and histomorphometric assessment of bone changes in the proximal tibia early after induction of type II collagen-induced arthritis in growing and mature rats. J Bone Miner Metab 19:76–83
- 49. Flanagan AM, Stow MD, Williams R 1995 The effect of interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor protein on the bone resorptive activity of human osteoclasts generated in vitro. J Pathol 176:289–297
- Adebanjo OA, Moonga BS, Yamate T, Sun L, Minkin C, Abe E, Zaidi M 1998 Mode of action of interleukin-6 on mature osteoclasts. Novel interactions with extracellular Ca2+ sensing in the regulation of osteoclastic bone resorption. J Cell Biol 142:1347–1356
- 51. Ueland T, Brixen K, Mosekilde L, Mosekilde L, Flyvbjerg A, Bollerslev J 2003 Age-related changes in cortical bone content of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-3, IGFBP-5, osteoprotegerin, and calcium in postmenopausal osteoporosis: a cross-sectional study. J Clin Endocrinol Metab 88:1014–1018
- 52. O'Brien CA, Gubrij I, Lin SC, Saylors RL, Manolagas SC 1999 STAT3 activation in stromal/osteoblastic cells is required for induction of the receptor activator of NF-κB ligand and stimulation of osteoclastogenesis by gp130-utilizing cytokines or interleukin-1 but not 1,25-dihydroxyvitamin D3 or para-thyroid hormone. J Biol Chem 274:19301–19308
- Kim K, Lee J, Kim JH, Jin HM, Zhou B, Lee SY, Kim N 2007 Protein inhibitor of activated STAT 3 modulates osteoclastogenesis by down-regulation of NFATc1 and osteoclast-associated receptor. J Immunol 178:5588–5594

- Zhang Z, Welte T, Troiano N, Maher SE, Fu XY, Bothwell AL 2005 Osteoporosis with increased osteoclastogenesis in hematopoietic cell-specific STAT3-deficient mice. Biochem Biophys Res Commun 328:800–807
- Sims NA, Jenkins BJ, Quinn JM, Nakamura A, Glatt M, Gillespie MT, Ernst M, Martin TJ 2004 Glycoprotein 130 regulates bone turnover and bone size by distinct downstream signaling pathways. J Clin Invest 113:379–389
- Minegishi Y, Saito M, Tsuchiya S, Tsuge I, Takada H, Hara T, Kawamura N, Ariga T, Pasic S, Stojkovic O, Metin A, Karasuyama H 2007 Dominantnegative mutations in the DNA-binding domain of STAT3 cause hyper-IgE syndrome. Nature 448:1058–1062
- 57. Holland SM, DeLeo FR, Elloumi HZ, Hsu AP, Uzel G, Brodsky N, Freeman AF, Demidowich A, Davis J, Turner ML, Anderson VL, Darnell DN, Welch PA, Kuhns DB, Frucht DM, Malech HL, Gallin JI, Kobayashi SD, Whitney AR, Voyich JM, Musser JM, Woellner C, Schaffer AA, Puck JM, Grimbacher B 2007 STAT3 mutations in the hyper-IgE syndrome. N Engl J Med 357:1608–1619
- Grimbacher B, Holland SM, Gallin JI, Greenberg F, Hill SC, Malech HL, Miller JA, O'Connell AC, Puck JM 1999 Hyper-IgE syndrome with recurrent infections—an autosomal dominant multisystem disorder. N Engl J Med 340: 692–702
- Liu H, Ma Y, Cole SM, Zander C, Chen KH, Karras J, Pope RM 2003 Serine phosphorylation of STAT3 is essential for Mcl-1 expression and macrophage survival. Blood 102:344–352
- Schuringa JJ, Schepers H, Vellenga E, Kruijer W 2001 Ser727-dependent transcriptional activation by association of p300 with STAT3 upon IL-6 stimulation. FEBS Lett 495:71–76
- Wen Z, Zhong Z, Darnell Jr JE 1995 Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. Cell 82: 241–250
- Ceresa BP, Pessin JE 1996 Insulin stimulates the serine phosphorylation of the signal transducer and activator of transcription (STAT3) isoform. J Biol Chem 271:12121–12124
- Lim CP, Cao X 1999 Serine phosphorylation and negative regulation of Stat3 by JNK. J Biol Chem 274:31055–31061
- 64. Chung J, Uchida E, Grammer TC, Blenis J 1997 STAT3 serine phosphorylation by ERK-dependent and -independent pathways negatively modulates its tyrosine phosphorylation. Mol Cell Biol 17:6508–6516
- Jain N, Zhang T, Fong SL, Lim CP, Cao X 1998 Repression of Stat3 activity by activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK). Oncogene 17:3157– 3167
- Ng YP, Cheung ZH, Ip NY 2006 STAT3 as a downstream mediator of Trk signaling and functions. J Biol Chem 281:15636–15644
- 67. Yang J, Liao X, Agarwal MK, Barnes L, Auron PE, Stark GR 2007 Unphosphorylated STAT3 accumulates in response to IL-6 and activates transcription by binding to NFκB. Genes Dev 21:1396–1408
- Kwan Tat S, Padrines M, Theoleyre S, Heymann D, Fortun Y 2004 IL-6, RANKL, TNF-α/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. Cytokine Growth Factor Rev 15:49–60

Endocrinology is published monthly by The Endocrine Society (http://www.endo-society.org), the foremost professional society serving the endocrine community.

Review

RANKL, RANK, osteoprotegerin: key partners of osteoimmunology and vascular diseases

M. Baud'huin^{a, b}, F. Lamoureux^{a, b}, L. Duplomb^{a, b}, F. Rédini^{a, b} and D. Heymann^{a, b, c, *}

^a Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, EA3822, F-44035 Nantes (France), Fax: +33 240 412 845, e-mail: dominique.heymann@univ-nantes.fr

^b INSERM, ERI 7, F-44035 Nantes (France)

[°] CHU de Nantes, F-44035 Nantes (France)

Received 27 February 2007; accepted 4 April 2007 Online First 29 May 2007

Abstract. 1997 saw the identification of a novel set of proteins within the tumor necrosis factor (TNF)/TNF receptor families that are required for the control of bone remodeling. Therefore, these receptors, receptor activator of nuclear factor kappa B (RANK), osteoprotegerin (OPG) and their ligand RANK ligand (RANKL) became the critical molecular triad controlling osteoclastogenesis and pathophysiologic bone remodeling. However, the establishment of the corresponding knock-out and transgenic mice revealed unexpected results, most particularly, the involvement of these factors in the vascular system and immunity.

Thus, the OPG/RANK/RANKL molecular triad appears to be associated with vascular calcifications and plays a pivotal function in the development of the immune system through dendritic cells. OPG/RANK/ RANKL thus constitute a molecular bridge spanning bone metabolism, vascular biology and immunity. This review summarizes recent knowledge of OPG/ RANK/RANKL interactions and activities as well as the current evidence for their participation in osteoimmunology and vascular diseases. *In fine*, the targeting of the OPG/RANK/RANKL axis as novel therapeutic approaches will be discussed.

Keywords. RANKL, osteoprotegerin, bone remodeling, osteoclast, osteolysis, osteoimmunology, cardiovascular disease.

Introduction

Genomic and proteomic research over the past decade has identified a large number of cytokines, growth factors, transcriptional factors and enzymes controlling cell metabolism and/or participating in the establishment of the molecular network in each cell, into all tissues and between all organs. Such systems allow the coordination of cell differentiation during embryogenesis and coordinated cell activities throughout life [1], and a molecular cross-talk in bone between osteoblasts and osteoclasts to maintain bone mass. Thus, osteoclasts originating from hematopoietic multinucleated cells are specialized in calcified matrix resorption [2, 3], whereas osteoblasts derived from bone marrow mesenchymal stem cells are responsible for new bone formation [4]. It has been estimated that around 10% of total bone mass is renewed per year, participating in calcium and phosphorus homeostasis [5]. The communication networks between osteoclasts and osteoblasts are mainly com-

^{*} Corresponding author.

prised of soluble cytokines and growth factors which modulate the expression of a wide range of genes through specific receptors and numerous transcription factors. However, it has been established that osteoblast-osteoclast contacts are required for the differentiation of osteoclast progenitors, thus demonstrating the pivotal role played by the membrane form of growth factors [6, 7]. These observations led the international scientific community to identify the soluble and membrane factors involved in osteoblast-osteoclast interactions.

Parathyroid hormone (PTH) [8], vitamin D3 $[1,\alpha(OH)_2D_3]$ [9] and calcitonin [10] have been considered for a long time as the principal regulators of calcium homeostasis in terrestrial vertebrates. Similarly, macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) is a critical cytokine involved in osteoclastogenesis. M-CSF participates in the proliferation of osteoclast progenitors, maintaining a pool of progenitors in bone marrow, and it cooperates with receptor activator of nuclear factor kappa B (RANK) ligand (RANKL) to induce the fusion of osteoclast progenitors (pre-osteoclasts) into osteoclasts which will be secondarily activated into mature osteoclasts by RANKL (see below) [11, 12]. In contrast, interferons (IFNs), which play crucial roles in the regulation of a wide variety of innate and adaptive immune responses, interfere with RANKL-induced osteoclastogenesis and thus represent a critical mechanism for the suppression of pathological bone resorption associated with inflammation [13]. However, recent investigations in bone biology clearly identified a novel set of cytokines/cytokine receptors within the tumor necrosis factor (TNF) family that are required for the control of bone remodeling [14-18]. These molecules - RANKL and its receptors RANK and osteprotegerin (OPG) - appear as the final effectors of most of the osteotropic factors already identified [19]. RANKL is considered to be a powerful stimulator of bone resorption, while OPG is a soluble bone protector. In this context, pathologies characterized by deregulated bone remodeling are often associated with an imbalance between OPG and RANKL [18–21]. Furthermore, recent studies demonstrated that the OPG/RANK/RANKL molecular triad is also strongly implicated in the control of immune [22] and vascular [23] systems. Thus these three molecules constitute a molecular cross-talk between bone, vessels and immune cells, providing new strategies for the prevention and/or treatment of corresponding diseases.

The present review summarizes recent knowledge of OPG, RANK and RANKL interactions and roles in the pathophysiology of bone, vessels and immunity.

RANKL and its receptors OPG and RANK regulate bone metabolism: prognostic markers and therapeutic agents

Cytokines and growth factors can exist as different forms: expressed at the cell membrane, associated with the extracellular matrix, or in soluble forms, interacting with their membrane and soluble receptor to modulate cellular activities. *In fine*, the effects of a cytokine result in the balance between its own activities and the biological influence of its soluble receptors which act as agonist or antagonist agents. As the molecular partners OPG/RANK/RANKL thus include the RANKL cytokine, its membrane or soluble receptors, respectively RANK and OPG, it is necessary to take into consideration the potential duality of both receptors to determine RANKL activities.

OPG/RANK/RANKL: molecular and functional characteristics

Osteoclast activities are related to the bone resorption process in physiological as well as in pathological conditions. For many years, mesenchymal-derived stem cells including osteoblasts have been well known to modulate osteoclast differentiation and bone degradation [24-26]. However, the major inhibitor of osteoclastogenesis was only identified in 1997-1998 simultaneously by Tsudas group [27, 28] and Amgen Company [29]. They respectively named this novel negative regulator of osteoclast differentiation 'osteoclatogenesis inhibitory factor' (OCIF) and 'osteoprotegerin.' Its international name according to the TNF nomenclature is TNFRSF11B. The role of OPG has been clearly demonstrated by the development of transgenic and knock-out mice. Indeed, OPG knockout mice exhibit a strong decrease in total bone density and bone volume and suffer from osteoporosis associated with a high incidence of fractures and vertebral deformities [30, 31]. Furthermore, this induced osteoporosis was totally reversed by intravenous injection of recombinant OPG [32]. In contrast, OPG transgenic mice suffer from a marked osteopetrosis characterized by a high bone turnover and an inhibition of osteoclastogenesis [29]. These data demonstrated that the presence of OPG is absolutely required to maintain bone mass in physiological situations. In vitro experiments confirmed the observations in the animal models and provided an explanation for the phenotype exhibited by the mice. Immediately after the identification of OPG, both laboratories identified within the TNF cytokine family, the ligand which bound OPG with high affinity, and called this molecular effector OPG ligand (OPGL) [33, 34]. OPGL was RANKL or the TNF ligand superfamily member 11, TNFSF11, already known for its activity on the immune system. Indeed, RANKL is considered to be a dendritic cell-stimulating agent and acts as a survival factor for dendritic cells and for mature T cells, therefore regulating their proliferation [35–37]. These activities are associated with the activation of the nuclear factor kappa B (NF- κ B) transcription factor after the binding of RANKL to its membrane receptor RANK (TNFRSF11A) [38, 39].

To determine the involvement of RANKL in bone metabolism, similar approaches based on genetically modified mice have been used by both research groups. In contrast to OPG-modified mice, RANKL transgenic mice exhibit a marked osteoporosis [33] and mice disrupted for RANKL are strongly osteopetrotic with a total absence of mature osteoclasts [40, 41]. Furthermore, severe bone loss and hypercalcemia are the main phenotypic characteristics of mice treated with recombinant RANKL. Overall, these data demonstrated that RANKL is a pro-resorptive factor while OPG is a powerful osteoprotective agent. In vitro experiments supported in vivo observations. Indeed, using a primary culture of osteoclast progenitors from bone marrow or a precursor cell line such as the murine monocytic cell line RAW264.7, RANKL induces osteoclast differentiation whereas OPG abolishes this phenomenon [16, 32-44]. Figure 1a illustrates RANKL/OPG activities in the RAW264.7 cells. After 4 days of culture in the presence of RANKL, RAW264.7 cells differentiate into large and multinucleated cells expressing osteoclastic markers (calcitonin receptor, cathepsin K, TRAP). When the cells are treated simultaneously with OPG and RANKL, osteoclast formation is abolished. RANKL is also able to activate mature osteoclasts, as determined by the stimulation of MMP and cathepsin K activities and the bone resorption capability of these cells [43, 44].

RANKL and OPG activities/functions were demonstrated in the years after their identification (Fig. 1b). In normal bone, RANKL is preferentially expressed on committed pre-osteoblastic cells, whereas its specific receptor RANK is expressed on osteoclast progenitors. In this system, RANKL is required for osteoclast differentiation and acts as a survival factor for osteoclast precursors [15–17]. OPG is a soluble factor produced by osteoblastic cells, and thus is considered as a decoy receptor for RANKL as confirmed by molecular binding experiments [45]. Indeed, OPG blocks the interaction between RANKL and RANK, inhibits the terminal stage of osteoclastic differentiation and then inhibits bone resorption (Figs. 1b, 2a) [15–18]. Furthermore, the inhibitory effect of OPG on bone resorption can be explained not only as a decoy receptor function but also as a modulator of the RANKL half-life [46]. Studies of OPG/RANKL in the serum of RANKL-/- and OPG-/- mice are in agreement with a potential role for OPG in the shedding of RANKL [47]. In turn, RANKL controls the bioavailability of OPG and its internalization and degradation [46]. In pathophysiological situations, OPG and RANKL must be considered as a molecular balance and be evaluated separately. OPG and RANKL expression are not restricted to bone tissue, as both factors can be produced by numerous cell types. OPG is a soluble factor, produced by a large number of cells, including immune cells, endothelial cells and osteoblasts [see review in ref. 18]. RANKL is expressed on the cell membrane and is also produced as a soluble factor by the same cells [40] (Fig. 2a). Three isoforms of RANKL have been identified in human and rodent, the first encoding a transmembrane form, the second, a soluble cytokine and the third, a cytoplasmic molecule [48, 49]. The soluble form of RANKL can also be produced by enzymatic shedding by the metalloprotease-disintegrin TNF-alpha convertase (TACE, also named a disintegrin and metalloproteinase, ADAM17) [50, 51], ADAM10 [52], ADAM19 [53], MMP-3 [54], MMP7 [54] and MMP-14 [52]. The exact function of each RANKL isoform must be clarified, but the literature clearly revealed the major relevance of the balance in RANKL-expressing cells between these three RANKL forms in osteoclastogenesis [55]. The third protagonist of the molecular triad is RANK. Like OPG and RANKL, transmembrane RANK is ubiquitously expressed, but in contrast to OPG/ RANKL, it is considered to be an osteoclastic marker in physiological bone tissue [56] (Fig. 2a). Like the other members of the TNF receptor superfamily, RANK assembles into functional trimeric receptors after binding with RANKL [57]. This trimerization appears to be required to generate mature and functional osteoclasts. Indeed, RANK dimerization allows the formation of multinuclear TRAP-positive cells but without any osteoclastic markers and unable to induce pit resorption [57]. Similarly, using X-ray crystallographic analysis, Ito et al. [58] showed the ability of the RANKL ectodomain to constitute a trimer complex [58] and then confirmed that the formation of a 3:3 RANK-RANKL binary complex is necessary to generate optimal osteoclastogenesis (Fig. 1b). Although RANKL binding to RANK induced RANK trimerization, RANK is also able to self-assemble [59], similarly to other TNF receptors [60]. Thus, Kanazawa and Kudo [59] demonstrated that RANK is self-assembled through a restricted cytoplasmic domain (amino acid residues 534-539). Interestingly, overexpression of full-length RANK results in activation of NF-kB and osteoclastogenesis,



Figure 1. Characteristics of OPG/RANK/RANKL interactions. (*a*) After 96 h in the presence of 100 ng/ml human RANKL, the murine RAW264.7 monocytic cell line differentiates into osteoclasts while 100 ng/ml human OPG totally abolishes RANKL effects. (*b*) RANK is expressed on the osteoclast membrane and binds RANKL produced by osteoblast/bone marrow stromal cells. OPG acts as a decoy receptor and blocks the interaction between RANKL and RANK. (*c*) OPG possesses a heparin binding domain and interacts with two other ligands, TRAIL and syndecan-1; (*d*) RANKL binding to RANK transduces specific signals in osteoclasts corresponding to novel therapeutic targets of bone diseases; CN, calcineurin.

even in the absence of RANKL. It was earlier demonstrated that TNF receptor (TNFR)-I and II also selfassembled through a specific extracellular domain named the pre-ligand binding assembly domain (PLAD), thus avoiding the formation of mixed receptors TNFR-I and TNFR-II [60]. Overall, these data indicate that such a RANK domain could also be useful to allow the formation of specific receptoractivating signal transduction pathways (see below) and to avoid the formation of hybrid receptors.

OPG, belonging to the TNFR superfamily, is able to self-dimerize through a disulfide bond using Cys⁴⁰⁰ at the C-terminal portions [61, 62]. Indeed, the most active form of OPG is a homodimer that possesses higher affinity for the RANKL ectodomain compared to OPG monomer [63]. OPG contains seven domains:

four cysteine-rich N-terminal domains (domains 1-4), two death domain-homologous regions (domains 5 and 6) and a C-terminal heparin-binding domain (domain 7) (Fig. 1c). Domains 1-4 are structurally related to the TNF receptor family and are sufficient to abolish osteoclast differentiation. Domains 5 and 6 can mediate a cytotoxic signal when they are included in a chimeric protein OPG-Fas [61], but their physiological functions remain to be elucidated. Domain 7 is composed of a heparin-binding domain and a Cys⁴⁰⁰ at its C-terminal portion (Fig. 1c). Although the affinity for heparin does not correlate with OPG inhibitory potential, this domain plays numerous key functions not all of which have been determined. Thus, OPG through its binding to syndecan-1 exerts a chemotaxis activity in human peripheral blood monocytes [64]. In



Figure 2. OPG/RANK/

RĀNKL: key partners in osteoimmunology and vascular diseases. (a) OPG/RANK/RANKL participation in pathophysiological bone remodeling, their roles involving costimulatory molecules such as DAP12, TREM2, FcR and proteoglycans. (b) OPG/RANK/RANKL modulate the immune system via a pivotal activity in dendritic cells. (c) The third system affected by OPG/ RANK/RANKL is the vascular compartment.

turn, syndecan-1 controls OPG bio-availability and is associated with an increase in local RANKL concentration and osteolysis in myeloma cells which overexpress this proteoglycan [65]. Furthermore, shedding of TNF- α proteoglycans and glycosaminoglycans strongly modulates OPG/RANK/RANKL interactions. Indeed, recent data demonstrated that RANK, RANKL, OPG and proteoglycans could form a very large complex 3:3:2:1 related to specific activities in osteoclasts such as MMP9 activities [66]. Such a very large complex involving protegoclycans can be compared to the cooperative dimerization of fibroblast growth factor (FGF)-1 upon a single heparin saccharide that may drive the formation of a 2:2:1 FGF1-FGFR2c-heparin ternary complex [67]. In this case, proteoglycans act as coreceptors for growth factors. Furthermore, depending on the bone remodeling step, OPG could be released from the bone matrix and thus modulate bone remodeling in a fashion similar to TGF- β [68]. In bone tissue, proteoglycans thus appear critical for maintaining an appropriate number of osteoblasts and osteoclasts by modulating their proliferation and/or differentiation. OPG activities could involve the ras/MAPK pathways [45] but also PKC and PI3K/Akt [64].

Similarly to OPG/ RANK/RANKL, heparan sulfate proteoglycans appear crucial for other members of the TNF/TNFR superfamilies. While glycosaminoglycans mainly modulate OPG-RANKL interactions, dermatan sulfate also interacts with RANKL [69]. Indeed, Shinmyouzu et al. [69] showed that dermatan sulfate reduced the RANKL-induced levels of phosphorylation of p38 and ERK in osteoclast progenitors, thus abolishing osteoclastogenesis. Very recently, Bishof et al. [70] identified syndecan-2 as a new binding partner of the transactivator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor (TACI), a member of the TNFR family [71]. Similarly, heparin sulfate proteoglycan serves as a receptor for A proliferation-inducing ligand (APRIL), a member of the TNF family, promoting tumor cell proliferation [72]. OPG also has a third ligand, TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL; Fig. 1c) [73]. OPG binding to TRAIL results in the abolition of TRAIL apoptotic activity [74-82]. This cross-regulation has a strong impact in cancer biology. Indeed, these observations suggest that OPG is deleterious, acting as a survival factor in several cancer pathologies by the inhibition of TRAIL, a natural inducer of tumor cell apoptosis [76-82].

Recent data reveal that several membrane proteins cooperate with the RANK/RANKL complex to control bone remodeling. The signaling adapter protein DNAX-activating protein-12 (DAP12) is a homodimeric transmembrane molecule modulating cellular activation and maturation in myeloid lineage cells in association with the DAP12-associated receptors (DARs) which include triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM), DAP12-associated lectin (MDL)-1 and NKG2D. In 2003, Kaifu et al. [83] showed that mice deficient for DAP12 exhibit a marked osteopetrosis owing to impaired osteoclastogenesis through a blockade of progenitor multinucleation. They also determined the molecular motif associated with this bone phenotype and provided evidence for the function of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) in the regulation of osteoclastogenesis [84]: mice lacking ITAMharboring adaptors such as Fc receptor common gamma subunit (FcR γ) and DAP12 are osteopetrotic [84, 85]. Similarly, Humphrey et al. [86] recently demonstrated the involvement of TREM2 in the regulation of osteoclast multinucleation, resorption and migration. In fact, DARs such as TREM2 associate with DAP12 or FcRy and transduce costimulatory signals (especially calcium signaling through phospholipase $C\gamma$) which cooperate with RANKL signaling during osteoclast differentiation (Fig. 2a) [87, 88]. In this context, any disturbance in the DAR-DAP12 signaling complex contributes to the development of bone diseases.

This section has described the main molecular and functional characteristics of OPG/RANK/RANKL. Overall, the abundant literature demonstrates that RANKL and OPG appear as final effectors of osteoclastogenesis and bone resorption.

OPG/RANK/RANKL and bone pathologies

Osteolytic processes are the main skeletal-related events in patients suffering from bone metastases and are associated with major sequelae and high levels of individual incapacity. In this context and according to the pivotal role of the OPG/RANK/ RANKL triad in osteoclastogenesis, blocking osteoclastogenesis and osteoclast activities via RANKL pathway inhibition constitutes a potential novel approach to maintain skeletal integrity. It has been suggested that high levels of bone degradation could enhance cancer cell establishment and growth in bone tissue through biological factors such as growth factors sequestrated in bone extracellular matrix. Indeed, cancer cells express soluble or membrane factors promoting osteoclastogenesis and accentuating bone resorption. Thus, a vicious cycle is generated between bone and cancer cells [89]. The expression of RANKL has been demonstrated in a wide range of benign and malignant tumor cells [18, 20, 75, 89, 90] (Fig. 2a). Although RANKL released in the bone microenvironnement affects osteoclast activities, RANKL can also directly modulate the behavior of cancer cells. Indeed, very recently, several papers have reported the expression of functional RANK in human breast cancer cells, human prostate cancer and mouse melanoma cell lines [91-93]. These studies show that RANKL triggers RANK-positive cancer cell migration and growth in bone tissue. However, the development of bone metastases is probably not limited to the action of RANKL on cancer cells and cannot exclude the pivotal role of osteoclasts [94, 95]. We indicated above that several proteases produced in the bone microenvironment modulate the shedding of RANKL and then bone resorption. The following theory has been proposed: osteoclastogenesis and activation of immature osteoclasts could be mediated by a direct interaction with RANKL-expressing osteoblasts or/and by the protease-solubilized RANKL which can also participate in the recruitment of osteoclast progenitors [54]. Although the expression of RANKL by cancer cells is controversial (especially for breast carcinoma cells), it is now hypothesized that the metastatic cells might express RANKL in an osseous context in contrast to the primary tumors [96]. Their migration to bone tissue is linked to the expression of membrane RANK and the chemoattractive function of RANKL. Based on these observations, current studies have disclosed that blocking RANKL-RANK interaction prevents the progression of prostate cancer in bone [97–100]. However, RANK expression is not restricted to nonbone cancer cells, because we recently showed that functional RANK is expressed at the surface of mouse [101] and human [102] osteosarcoma cell lines without modulation of cancer migration. RANK is also detected in more than 50% of human osteosarcoma specimens studied, with a preferential expression on osteosarcoma developed in pathological bone and bad responders to chemotherapy [102] (Fig. 2a). Thus RANKL may act as a 'soil' factor in primary and secondary bone cancer development dependently or independently of its direct effects on cancer cells. This fact is supported by several groups that have shown that inhibition of bone resorption using RANK-Fc or OPG-Fc blocks growth of tumor cells such as myeloma cells that do not express RANK [103, 104]. However, a wide range of benign and malignant tumor cells express OPG simultaneously with RANKL [18, 20, 75, 89, 90, 105] (Fig. 2a). Such an observation has led to evaluation of the clinical interest in measuring the RANKL/OPG ratio in bone pathologies. Thus, the RANKL/OPG balance is disturbed in severe osteolytic pathologies in favor of RANKL [106-108]. In such cases, the tumor microenvironment releases high levels of OPG to counterbalance the high concentration of RANKL. OPG may reflect a protective mechanism of the skeleton to compensate for increased bone resorption. This hypothesis is strengthened by the effect of bisphosphonate treatment which results in a decrease in the OPG level in contrast to RANKL which is not modified [109, 110]. In fine, as the RANKL/ OPG ratio is significantly higher in patients with severe malignant osteolytic pathologies [106, 111-113], it could predict survival as demonstrated in multiple myeloma [114]. Moreover, the RANKL/ OPG ratio may be used as a prognostic biological marker in non-malignant pathologies such as osteoporosis [108, 115], ankylosing spondylitis [116], rheumatoid arthritis [117], benign bone tumors, osteolysis associated with hip prosthetic loosening [106, 118, 119] or bone fractures [120]. For example, elderly women with hip fractures exhibit an increased RANKL/OPG mRNA content in iliac bone which is associated with increased fracture susceptibility. This ratio can also be considered as an important index for the evaluation of new drugs against bone diseases or as therapies for bone pathologies [121–129].

OPG/RANK/RANKL: the crossroads of immunity and bone metabolism

The immune phenotype of OPG transgenic mice demonstrated for the first time the relationship between the OPG/RANK/RANKL triad and the immune system [30]. OPG transgenic mice exhibit impaired thymocyte development. Consistent with these findings, mice with a disrupted RANKL gene show a lack of all lymph node organogenesis, normal splenic and Peyer's patches organization, and impaired thymocyte development [40, 41]. Moreover, RANK knock-out mice also lacked lymph nodes and produced defective B and T lymphocyte maturation while they exhibited normal thymic development [130]. RANKL expressed by thymic epithelial cells may be responsible for the development and maturation of RANK-positive lymphocytes [131]. In this context, the OPG/RANK/RANKL molecular triad constitutes a cross-talk between bone metabolism and the immune response, which has been labeled osteoimmunology [18, 132]. The OPG/RANK/RANKL triad exerts its activities on the different cell types involved in immunity. Thus, RANKL behaves as a chemotactic factor for monocytic cells through its binding to membrane RANK [133, 134], similar to its effect observed on osteoclasts [135], emphasizing the cross-talk between bone and immune systems (Fig. 2b). The RANKL-induced migration involved phosphatidylinositol 3-kinase, phosphodiesterase, and Src kinase signaling pathways. OPG also modulates the migration of monocytes via its binding to syndecan-1 and signaling involving protein kinase C, phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and tyrosine kinase [64]. However, further experiments are needed to define the functional importance of the OPG/ RANKL balance in the monocyte migration.

Complementary to their role in cell migration described above, recent data implicate the OPG/RANK/ RANKL triad in inflammatory processes. A large number of cytokines are known to regulate many of the bone responses in inflammatory conditions [136]. Several cytokines are modulated by RANKL, thus affecting cell behavior [18, 137]. Thus, RANKL induced CCL22 (macrophage-derived chemokine) [138], monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) [139] and interleukin-8 [140]. In turn, the chemokine increased RANKL expression [18] leading to the establishment of a vicious cycle exacerbating the inflammatory process and the associated pathologies [141, 142]. Similarly, RANKL has been found to upregulate RANK expression on monocytes, to activate their capacity for antigen presentation through upregulation of costimulatory molecule expression and to promote cell survival [143, 144]. Thus, RANKL enhanced the survival of macrophages and up-regulated the expression of CD86, and RANKL-treated macrophages show increased allogeneic T cell activation and phagocytic activity compared to control cells [144]. In a model of lipopolysaccharide (LPS)-induced endotoxic shock, administration of soluble RANK-Fc protects mice from death induced by sepsis, and in a model of inflammation-mediated arthritis, RANK-Fc ameliorates disease development and attenuates bone destruction [143]. Although lymphocytes are probably the major source of RANKL in inflammatory processes, mast cells [145], endothelial cells and platelets [146] also represent a potential origin of RANKL. Blockade of RANKL may allow treatment of human inflammatory disorders in which RANKL is overexpressed, such as periodontal diseases, rheumatoid arthritis or wear debris prosthesis [147–150]. However, very recently Maruyama et al. [151] found that a RANKL pre-treatment suppressed production of inflammatory cytokines in macrophages in response to LPS. In this model, prior administration of RANKL protects mice from LPS-induced death [151]. These data and those published by Seshasayee et al. [143] appear contradictory. In fact, RANKL may be produced to counterbalance the inflammatory process maintained by inflammatory cytokines. Unfortunately, when the inflammation is initiated, RANKL appears unable to block this process and may even contribute to maintain the pathology.

The RANKL/OPG molecular duo is also strongly associated with the biology of dendritic cells expressing RANK. Indeed, RANKL dramatically inhibits the apoptosis of dendritic cells via increased Bcl-xL expression [35] and induces T lymphocyte proliferation [36] (Fig. 2b). However, the core function of RANKL in dendritic cell biology is still not well understood. RANKL has been reported to activate intestinal dendritic cells, increase their survival in vivo, and inhibition of the RANK/RANKL axis by OPG-Fc results in reduced colitis [152]. On the other hand, in an inflammation-mediated transgenic mice model for type I diabetes, RANK-Fc treatment decreases the numbers of CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes in pancreas-associated tissue that can exacerbate disease [153]. More recently, Loser et al. [154] reported that RANKL is expressed in keratinocytes of the inflamed skin and that RANKL can modify dendritic cell functions to maintain the number of peripheral CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes. OPG might contribute to this control since it is expressed in dendritic cells and its expression is increased with their maturation [155]. Moreover, dendritic cells from homozygous OPG-deficient mice potentiate the mixed leukocyte reaction despite CD86, MHCII, and antigen presentation levels which are similar to heterozygous OPG-deficient mice [156]. Overall, these data demonstrated that RANKL is a key regulator of T lymphocyte-dendritic cell communication, modulating immunity and bone remodeling through dendritic cells [157].

OPG/RANKL and endothelial cells: a close functional relationship in vascular biology

The first clue that the OPG/RANK/RANKL triad might be the molecular system linking bone metabolism and vessel biology was provided by the vascular phenotype of OPG-deficient mice [30]. OPG-deficient mice exhibited medial calcification of the aorta and renal arteries but not of smaller vessels, suggesting that OPG and its molecular partners may play a role in the long-term observed association between osteoporosis and vascular calcification [30]. The lesions observed resemble human atherosclerotic lesions (RANKL and RANK expression, presence of osteoclast-like cells adjacent to the RANKL-expressing cells). OPG administration prevents calcification induced by warfarin or high doses of vitamin D in rat [158] but could not reverse this phenomenon once the mineralization process had occurred [32]. Moreover, OPG physically associated with the von Willebrand factor is localized in the Weibel-Palade bodies of endothelial cells and is rapidly secreted in response to inflammatory stimuli [158]. This observation definitively supports the notion that OPG/RANK/RANKL constitute a molecular bridge spanning skeletal disorders, vascular injury, inflammation and hemostasis [159, 160].

RANKL and OPG are differentially expressed in calcific aortic stenosis [161]. Indeed, while RANKL was not expressed at relevant levels in controls but detectable in aortic stenosis, OPG expression was marked in controls but significantly lower in this pathology. Furthermore, RANKL promotes matrix calcification and induces the expression of osteoblastassociated genes in cultured human aortic valve myofibroblasts, revealing a transition towards an osteogenic phenotype [161]. Microvascular endothelial cells produce an adapted microenvironment favorable to calcified tissue formation and thus stimulate the adhesion and transendothelial migration of monocytes that can differentiate into osteoclasts in the presence of RANKL [162]. These results suggest that the RANKL/OPG pathway may regulate valvular calcification in calcific aortic stenosis. Furthermore, Olesen et al. [163] suggested that OPG may play a special role in arterial disease in diabetes, since increased levels of OPG found in aortic tunica media

from diabetic patients are associated with calcification of human vascular smooth muscle cells [164]. In agreement with these findings, Anand *et al.* [165] revealed that among inflammatory biomarkers, only OPG predicted both subclinical disease and near-term cardiovascular events and may then be considered as a simple test for identifying high-risk type 2 diabetic patients. Similarly, Vik *et al.* [166] and Ziegler *et al.* [167] demonstrated the relationship between OPG serum levels and severity of artery disease.

The RANKL/OPG system exerts its activities simultaneously on endothelial cells and vascular smooth muscle-related cells. Thus, OPG promotes endothelial cell survival through neutralizing pro-apoptotic TRAIL [73, 168] and must be considered as an $\alpha v\beta$ 3-induced and NF- κ B-dependent survival factor for endothelial cells whose survival depends on OPG induction by NF-KB [169, 170] (Fig. 2c). The OPG survival effect has also been demonstrated in pathological conditions such as periodontitis [171]. Indeed, OPG produced by microvascular endothelial cells controls endothelial cell survival and bone remodeling during this pathology [172]. Cross et al. [173] also reported a pro-angiogenic effect of OPG and correlated OPG expression by tumor endothelial cells with clinical data in human tumors. However, while the role of OPG in vascular pathogenesis is not fully understood, OPG may reflect a protective mechanism of endothelial cells and bone during aggressive inflammation. RANKL has also been implicated in endothelial cell metabolism, as it induces angiogenesis in vitro and in vivo, acts as a chemotactic factor for endothelial cells and induces their migration [174, 175]. RANKL also promotes endothelial proliferation and survival [175, 176], suggesting a potential implication in tumor development and increased vascular permeability [177] (Fig. 2c). OPG and RANKL activities in endothelial cells are tightly regulated by cytokines and growth factors present in the microenvironment of endothelial cells [18, 178, 179].

RANK signal transduction pathway as a potential therapeutic target

RANKL has been named for its ability to activate NFkB which constitutes one of the early molecular events induced by the binding of RANKL to RANK [26, 180, 181] (Fig. 1d). Similar to the other TNFR family members, RANK activation first recruits the TNR receptor-associated factor (TRAF) adaptor proteins associated with the intracytoplasmic domain of RANK and implicated in its oligomerization. Furthermore, TRAF6 acts as a pivotal adaptor leading to specific gene expression regulating osteoclast differentiation and activation. The downstream targets of TRAF6 include transcription factors such NF- κ B, activator protein-1 (AP-1) and nuclear factor of activated T cells (NFAT), the cascades of mitogenactivated protein kinases (MAPKs) such as p38 stress kinase, c-Jun N-terminal kinase (JNK), ERK and the PI3K/AKT pathways which involve the mammalian target of rapamycin (mTOR) [18, 181].

The OPG/RANK/RANKL molecular triad constitutes a strategic therapeutic target for bone diseases and associated disorders. Thus, several approaches based on recombinant molecules (OPG-Fc, RANK-Fc) or specific antibodies against RANKL have been successfully reported in benign and malignant pathologies [89, 182-184] (Fig. 3). Recently, Cheng et al. [186] envisaged another strategy based on an OPGlike peptidomimetic. This peptide has been designed to avoid its binding to TRAIL and showed an effective activity in preventing myeloma bone disease [187]. Peptidomimetics selectively inhibiting RANKL but not TRAIL activity thus constitute novel therapeutic approaches to treat tumor-associated osteolysis. Similarly, TNFR loop peptides have been developed and abolish RANKL-induced signaling, bone resorption and bone loss [188]. Such peptidomimetics that mimic either cytokine receptors such as TNFR [188] or a 'decoy receptor' such as OPG [184, 187] may present various advantages, mainly a reduced immunogenicity, a more targeted effect and multiple applications in which these molecules are implicated (e.g. inhibition of bone resorption and inflammation) [189].



Figure 3. OPG/RANK/RANKL molecular pathway as a potential target for bone diseases. Sprague-Dawley rats with transplanted osteosarcoma [185] were treated or not with recombinant RANK-Fc (750 μ g, once a week during 3 weeks). Representative mean tumor volumes of rats treated by RANK-Fc compared to the untreated control.

As another strategy to treat osteolysis relates to the blockade of specific signaling pathways currently activated by bone resorption effectors, the RANK signaling pathway has been identified as one of the best approaches [190]. NF-kB plays a key role in RANK signaling and appears critical for osteoclastogenesis. This transcription factor is not necessary for the formation of osteoclast progenitors but is absolutely required for the differentiation steps of these progenitors [191, 192]. Furthermore, NF-κB bridges inflammation and bone homeostasis [193]. Indeed, NF-kB controls bone mass as demonstrated by the bone phenotype of knock-out mice [194] and contributes to the onset and progression of arthritis [195–198]. A role of NF-kB in osteolytic bone metastasis through granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) induction has also been very recently identified [199]. The authors identified the gene encoding GM-CSF as a target of NF-κB and showed that GM-CSF mediates osteolysis bone metastasis of breast cancer by stimulating osteoclastogenesis. In this respect, as NF-kB represents a potential target for the treatment of osteolysis of benign and malignant origin, therapeutic strategies based on inhibition of this transcription factor have recently emerged. Thus, Clohisy et al. [200] demonstrated that NF-kB signaling blockade abolished implant particle-induced osteoclastogenesis in vitro. They also demonstrated a significant decrease in bone erosion associated with inflammatory arthritis using dominant-negative IkB or mutated IkB proteins [201]. Similarly, synthetic double-stranded oligodeoxynucleotides demonstrated their efficacy in a mice model of intestinal carcinoma, acting as 'decoy' cis elements that block the binding of nuclear factors to promoter regions of targeted genes, resulting in the inhibition of gene transactivation in vivo as well as in vitro [202]. Penolazzi et al. [203, 204] developed peptide nucleic acid-DNA decoy chimeras targeting NF-kB which strongly induced osteoclast apoptosis and inhibited their differentiation. Umezawa's group chose the development of a synthetic NF- κ B inhibitor [205] which abolishes osteoclast differentiation through down-regulation of NFATc1 [206], thus suggesting cross-talk between NFATc1 and NF-kB in RANKL-dependent osteoclastogenesis (Fig. 1d). TRAF6 actively participates in the signal transduction induced by the TNFR superfamily [18, 39] (Fig. 1) and thus represents a strategic therapeutic target of osteolytic pathologies. In this context, therapeutic use of antagonist peptides of RANK-TRAF6 interactions has been also envisaged [207].

Therapeutic targeting of OPG/RANK/RANKL interactions and signaling holds great promise for the treatment of malignant osteolysis (primary bone tumors, bone metastasis) and in inflammation-associated bone diseases (e.g. rheumatoid arthritis, prosthesis loosening). In the near future, additional studies are required to validate these therapies in pre-clinical models and to determine their clinical safety and efficacy.

Acknowledgements. This work was supported by the 'Comité des Pays de Loire de la Ligue Contre le Cancer'. M. Baud'huin received a fellowship from INSERM and The Région des Pays de la Loire. The authors wish to thank C. Bailly, M. N. Hervé and C. Le Corre from the Experimental Therapy Unit of IFR26 (Nantes, France) for their technical assistance.

- 1 Dempster, D. W. (2006) Anatomy and functions of the adult skeleton. In: Primer of the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism, edn 6 (Favus, M. J., Ed.), pp 7–11, American Society for Bone and Mineral Research, Durham.
- 2 Ross, F. P. (2006) Osteoclast biology and bone resorption. In: Primer of the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism, edn 6 (Favus, M. J., Ed.), pp. 30–35. American Society for Bone and Mineral Research, Durham.
- 3 Rousselle, A. V. and Heymann, D. (2002) Osteoclastic acidification during bone resorption. Bone 30, 533–540.
- 4 Aubin, J. E., Lian, J. B. and Stein, G. S. (2006) Bone formation maturation and functional activities of osteoblast lineage cells. In: Primer of the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism, edn 6 (Favus, M. J., Ed.), pp. 20–29, American Society for Bone and Mineral Research, Durham.
- 5 Favus, M. J., Bushinsky, D. A. and Lemann Jr, J. (2006) Regulation of calcium, magnesium, and phosphate metabolism. In: Primer of the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism, edn 6 (Favus, M. J., Ed.), pp. 76–83, American Society for Bone and Mineral Research, Durham.
- 6 Takahashi, N., Akatsu, T., Udagawa, N., Sasaki, T., Yamaguchi, A., Moseley, J. M., Martin, T. J. and Suda, T. (1988) Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. Endocrinology 123, 2600–2602.
- 7 Jimi, E., Nakamura, I., Amano, H., Taguchi, Y., Tsurukai, T., Tamura, M., Takahashi, N. and Suda, T. (1996) Osteoclast function is activated by osteoblastic cells through a mechanism involving cell-to-cell contact. Endocrinology 137, 2187– 2190.
- 8 Friedman, P. A. and Goodman, W. G. (2006) PTH(1-84)/ PTH(7-84): a balance of power. Am., J. Physiol. Renal Physiol. 290, F975-F984.
- 9 Holick, M. F. (2006) The role of vitamin D for bone health and fracture prevention. Curr. Osteoporos. Rep. 4, 96–102.
- 10 Findlay, D. M. and Sexton, P. M. (2004) Calcitonin. Growth Factors 22, 217–224.
- 11 Boyle, W. J., Simonet, W. S. and Lacey, D. L. (2003) Osteoclast differentiation and activation. Nature 423, 337–342.
- 12 Teitelbaum, S. L. (2007) Osteoclasts: what do they do and how do they do it? Am. J. Pathol. 170, 427–435.
- 13 Takayanagi, H., Sato, K., Takaoka, A. and Taniguchi, T. (2005) Interplay between interferon and other cytokine systems in bone metabolism. Immunol. Rev. 208, 181–193.
- 14 Tsuda, E., Goto, M., Michizuki, S., Yano, K., Kobayashi, F., Morinaga, T., Hisgashio, K. (1997) Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 234, 137–142.
- 15 Lacey, D. L., Timms, E., Tan, H. L., Kelley, M. J., Dunstan, C. R., Burgess, T., Elliott, R., Colombero, A., Elliott, G., Scully, S., Hsu, H., Sullivan, J., Hawkins, N., Davy, E., Capparelli, C., Eli, A., Qian, Y. X., Kaufman, S., Sarosi, I., Shalhoub, V., Senaldi, G., Guo, J., Delaney, J. and Boyle, W. J. (1998) Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. Cell 93, 165–176.

2344 M. Baud'huin et al.

- 16 Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Mochizuki, S. I., Yano, K., Fujise, N., Sato, Y., Goto, M., Yamaguchi, K., Kuriyama, M., Kanno, T., Murakami, A., Tsuda, E., Morinaga, T. and Higashio, K. (1998) Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis *in vitro*. Endocrinology 139, 1329–1237.
- 17 Blair, J. M., Zheng, Y., Dunstan, C. R. (in press) RANK ligand. Int. J. Biochem. Cell Biol.
- 18 Théoleyre, S., Wittrant, Y., Kwan Tat, S., Fortun, Y., Redini, F. and Heymann, D. (2004) The molecular triad OPG/RANK/ RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. Cytokine Growth Factor Rev. 15, 457–475.
- 19 Kwan Tat, S., Padrines, M., Théoleyre, S., Heymann, D. and Fortun, Y. (2004) IL6, RANKL, TNF-alpha/IL1: interrelations in bone resorption pathology. Cytokine Growth Factor Rev. 15, 49–60.
- 20 Blair, J. M., Zhou, H., Seibel, M. J. and Dunstan, C. (2006) Mechanisms of disease: roles of OPG, RANKL and RANK in the pathophysiology of skeletal metastasis. Nat. Clin. Pract. Oncol. 3, 41–49.
- 21 Rogers, A. and Eastell, R. (2005) Circulating osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor κB ligand: clinical utility in metabolic bone disease assessment. J. Clin. Endocr. Metab. 90, 6323–6331.
- 22 Walsh, M. C., Kim, N., Kadono, Y., Rho, J., Lee, S. Y., Lorenzo, J. and Choi, Y. (2006) Osteoimmunology: interplay between the immune system and bone metabolism. Annu. Rev. Immunol. 24, 33–63.
- 23 Kiechl, S., Werner, P., Knoflach, M., Willeit, J. and Schett, G. (2006) The osteoprotegerin/RANK/RANKL system: a bone key to vascular disease. Expert Rev. Cardiovasc. Ther. 4, 801– 811.
- 24 Roodman, G. D. (1996) Advances in bone biology: the osteoclast. Endocr. Rev. 17, 308–332.
- 25 Abu-Amer, Y. (2005) Advances in osteoclast differentiation and function. Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metab. Disord. 5, 347–355.
- 26 Roodman, G. D. (2006) Regulation of osteoclast differentiation. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1068, 100–109.
- 27 Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Mochizuki, S. I., Yano, K., Fujise, N., Sato, Y., Goto, M., Yamaguchi, K., Kuriyama, M., Kanno, T., Murakami, A., Tsuda, E., Morinaga, T. and Higashio, K. (1998) Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis *in vitro*. Endocrinology 139, 1329–1337.
- 28 Tsuda, E., Goto, M., Mochizuki, S., Yano, K., Kobayashi, F., Morinaga, T. and Higashio, K. (1997) Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 234, 137–142.
- 29 Simonet, W. S., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., Kelley, M., Chang, M. S., Luthy, R., Nguyen, H. Q., Wooden, S., Bennett, L., Boone, T., Shimamoto, G., DeRose, M., Elliott, R., Colombero, A., Tan, H. L., Trail, G., Sullivan, J., Davy, E., Bucay, N., Renshaw-Gegg, L., Hughes, T. M., Hill, D., Pattison, W., Campbell, P., Sander, S., Van, G., Tarpley, J., Derby, P., Lee, R., Amgen EST Program and Boyle, W. J. (1997) Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. Cell 89, 309–319.
- 30 Bucay, N., Sarosi, I., Dunstan, C. R., Morony, S., Tarpley, J., Capparelli, C., Scully, S., Tan, H. L., Xu, W., Lacey, D. L., Boyle, W. J. and Simonet, W. S. (1998) Osteoprotegerindeficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. Genes Dev. 12, 1260–1268.
- 31 Yun, T. J., Tallquist, M. D., Aicher, A., Rafferty, K. L., Marshall, A. J., Moon, J. J., Ewings, M. E., Mohaupt, M., Herring, S. W. and Clarck, E. A. (2001) Osteoprotegerin, a crucial regulator of bone metabolism, also regulates B cell development and function. J. Immunol. 166, 1482–1491.

- 32 Min, H., Morony, S., Sarosi, I., Dunstan, C. R., Capparelli, C., Scully, S., Van, G., Kaufman, S., Kostenuik, P. J., Lacey, D. L., Boyle, W. J. and Simonet, W. S. (2000) Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis. J. Exp. Med. 192, 463–464.
- 33 Lacey, D. L., Timms, E., Tan, H. L., Kelley, M. J., Dunstan, C. R., Burgess, T., Elliott, R., Colombero, A., Elliott, G., Scully, S., Hsu, H., Sullivan, J., Hawkins, N., Davy, E., Capparelli, C., Eli, A., Qian, Y. X., Kaufman, S., Sarosi, I., Shalhoub, V., Senaldi, G., Guo, J., Delaney, J. and Boyle, W. J. (1998) Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. Cell 93, 165–176.
- 34 Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K., Kinosaki, M., Mochizuki, S., Tomoyasu, A., Yano, K., Goto, M., Murakami, A., Tsuda, E., Morinaga, T., Higashio, K., Udagawa, N., Takahashi, N. and Suda, T. (1998) Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/ RANKL. Proc. Natl. Acad. Sci., USA 95, 3597–3602.
- 35 Wong, B. R., Josien, R., Lee, S. Y., Sauter, B., Li, H. L., Steinman, R. M. and Choi, Y. (1997) 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. 186, 2075–2080.
- 36 Anderson, D. M., Maraskovsky, E., Billingsley, W. L., Dougall, W. C., Tometsko, M. E., Roux, E. R., Teepe, M. C., DuRose, R. F., Cosman, D. and Galibert, L. (1997) A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance Tcell growth and dendritic-cell function. Nature 390, 175–179.
- 37 Wong, B. H., Rho, J., Arron, J., Robinson, E., Orlinick, J., Chao, M., Kalachikov, S., Cayani, E., Barlett, F. S.3rd, Frankel, W. N., Lee, S. Y. and Choi, Y. (1997) TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. J. Biol. Chem. 272, 25190–2514.
- 38 Damay, B. G., Haridas, V., Ni, J., Moore, P. A. and Aggarwal, B. B. (1998) Characterization of the intracellular domain of receptor activator of NF-kappaB (RANK): interaction with tumor necrosis factor receptor-associated factors and activation of NF-kappab and c-Jun N-terminal kinase. J. Biol. Chem. 273, 20551–20555.
- 39 Wong, B. R., Josien, R., Lee, S. Y., Vologodskaia, M., Steinman, R. M. and Choi, Y. (1998) The TRAF family of signal transducers mediates NF-kappaB activation by the TRANCE receptor. J. Biol. Chem. 273, 28355–28359.
- 40 Kong, Y. Y., Feige, U., Sarosi, I., Bolon, B., Tafuri, A., Morony, S., Capprelli, C., Li, J., Elliott, R., McCabe, S., Wong, T., Campagnuolo, G., Moran, E., Bogoch, E. R., Van, G., Nguyen, L. T., Ohashi, P. S., Lacey, D. L., Fish, E., Boyle, W. J. and Penninger, J. M. (1999) Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. Nature 402, 304–309.
- 41 Fata, J. E., Kong, Y. Y., Li, J., Sasaki, T., Irie-Sasaki, J., Moorehead, R. A., Elliott, R., Scully, S., Voura, E. B., Lacey, D. L., Boyle, W. J., Khokha, R. and Penninger, J. M. (2000) The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. Cell 103, 41–50.
- 42 Burgess, T. L., Qian, Y., Kaufman, Ring, B. D., Van, G., Capparelli, M., Kelley, M., Hsu, H., Boyle, W. J., Dunstan, C., Hsu, S. and Lacey, D. L. (1999) The ligang for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. J. Cell Biol. 145, 527–238.
- 43 Wittrant, Y., Théoleyre, S., Couillaud, S., Dunstan, C., Heymann, D. and Rédini, F. (2004) Relevance of *in vitro* osteoclastogenesis system to study receptor activator of NFκB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) biological activities? Exp. Cell Res. 293, 292–301.
- 44 Wittrant, Y., Théoleyre, S., Couillaud, S., Dunstan, C., Heymann, D. and Rédini, F. (2003) Regulation of osteoclast

protease expression by RANKL. Biochem. Biophys. Res. Commun. 310, 774–778.

- 45 Théoleyre, S., Wittrant, Y., Couillaud, S., Vusio, P., Berreur, M., Dunstan, C., Blanchard, F., Rédini, F. and Heymann, D. (2004) Cellular activity and signalling induced by osteoprotegerin in osteoclasts: involvement of receptor activator of NF-κB ligand and MAPK. Biochim. Biophys. Acta 1644, 1–7.
- 46 Kwan Tat, S., Padrines, M., Théoleyre, S., Bataglia, S., Heymann, D., Redini, F. and Fortun, Y. (2006) OPG/ membranous-RANKL complex is internalized via the clathrin pathway before a lysosomal and a proteasomal degradation. Bone 39, 706–715.
- 47 Nakamichi, Y., Udagawa, N., Kobayashi, Y., Nakamura, M., Yamamoto, Y., Yamashita, T., Mizoguchi, T., Sato, M., Mogi, M., Penninger, J. M. and Takahashi, N. (2007) Osteoprotegerin reduces the serum level of receptor activator of NF-KB ligand derived from osteoblasts. J. Immunol. 178, 192–200.
- 48 Ikeda, T., Kasai, M., Utsuyama, M. and Hirokawa, K. (2001) Determination of three isoforms of the receptor activator of nuclear factor-κB ligand and their differential expression in bone and thymus. Endocrinology 142, 1418–1426.
- 49 Suzuki, J., Ikeda, T., Kuroyama, H., Seki, S., Kasai, M., Utsuyama, M., Tatsumi, M., Uematsu, H. and Hirokawa, K. (2004) Regulation of osteoclastogenesis by the three human RANKL isoforms expressed in NIH3T3 cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 314, 1021–1027.
- 50 Lun, L., Wong, B. R., Josien, R., Becherer, J. D., Erdjument-Bromage, H., Schlondorff, J., Temps, P., Choi, Y. and Blodel, C. P. (1999) Evidence for a role of a tumor necrosis factoralpha (TNF-alpha)-converting enzyme-like protease in shedding of TRANCE, a TNF family member involved in osteoclastogenesis and dendritic cell survival. J. Biol. Chem. 274, 13613-13618.
- 51 Boissy, P., Lenhard, T. R., Kirgegaard, T., Peschon, J. J., Black, R. A., Delaisse, J. M. and del Carmen Ovejero, M. (2003) An assessment of ADAMs in bone cells: absence of TACE activity prevents osteoclast recruitment and the formation of the marrow cavity in developing long bone. FEBS Lett. 553, 257–261.
- 52 Hikita, A., Yana,, I., Wakeyama, H., Nakamura, M., Kadono, Y., Oshima, Y., Nakamura, K., Seiki, M. and Tanaka, S. (2006) Negative regulation of osteoclastogenesis by ectodomain shedding of receptor activator of NF-kappaB ligand. J. Biol. Chem. 281, 36846–36855.
- 53 Chesneau, V. (2001) Catalytic properties of ADAM19. J. Biol. Chem. 278, 22331–22340.
- 54 Lynch, C. C., Kikosaka, A., Acuff, H. B., Martin, M. D., Kawai, N., Singh, R. K., Varfo-Gogola, T. C., Begtrup, J. L., Peterson, T. E., Fingleton, B., Shirai, T., Matrisian, L. M. and Futakuchi, M. (2005) MMP-7 promotes prostate cancer-induced osteolysis via the solubilisation of RANKL. Cancer Cell 7, 485–496.
- 55 Ikeda, T., Kasai, M., Kuroyama, H., Seki, S., Utsuyama, M., Hirokawa, K. (2003) Multimerisation of the RANKL isoforms and regulation of osteoclastogenesis. J. Biol. Chem. 278, 47217–47222.
- 56 Nakagawa, N., Kinosaki, M., Yamaguchi, K., Shima, N., Yasuda, H., Yano, K., Morinaga, T. and Higashio, K. (1998) RANK is essential signalling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 253, 396–400.
- 57 Iwamoto, K., Miyamoto T., Sawatani, Y., Hosogane, N., Hamaguchi, I., Takami, M., Nomiyama, K., Takagi, K. and Suda, T. (2004) Dimer formation of receptor activator of nuclear factor κB induces incomplete osteoclast formation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 325, 229–234.
- 58 Ito, S., Wakabayashi, K., Ubukota, O., Hayashi, S., Okada, F. and Hata, T. (2002) Crystal structure of the extracellular domain of mouse RANK ligand at 2.2-A resolution. J. Biol. Chem. 277, 6631–6636.
- 59 Kanazawa, K. and Kudo, A. (2005) Self-assembled RANK induces osteoclastogenesis ligand-independently. J. Bone Miner. Res. 20, 2053–2060.

- 60 Chan, F. K., Chun, H. J., Zheng, L., Siegel, R. M., Bui, K. L. and Lenardo, M. J. (2000) A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. Science 288, 2351–2354.
- 61 Yamaguchi, K., Kinosaki, M., Goto, M., Tsuda, E., Morinaga, T. and Higashio, K. (1998) Characterization of structural domains of human osteoclastogenesis inhibitory factor. J. Biol. Chem. 273, 5117-5123.
- 62 Takahashi, N., Udagawa, N. and Suda, T. (1999) A new member of tumor necrosis factor ligand family, ODF/OPGL/ TRANCE/RANKL, regulates osteoclast differentiation and function. Biochem. Biophys. Res. Commun. 256, 449–455.
- 63 Schneeweis, L. A., Willard, D. and Milla, M. E. (2005) Functional dissection of osteoprotegerin and its interaction with RANKL. J. Biol. Chem. 280, 41155–41164.
- 64 Mosheimer, B. A., Kaneider, N. C., Feistritzer, C., Djanani, A. M., Sturn, D. H., Patsch, J. R. and Wiedermann, C. J. (2005) Syndecan-1 is involved in osteoprotegerin-induced chemotaxis in human peripheral blood monocytes. J. Clin. Endocrinol. Metab. 90, 2964–2971.
- 65 Standal, T., Seidel, C., Hjertner,, O., Plesner, T., Sanderson, R. D., Waage, A., Borset, M. and Sundan, A. (2002) Osteoprotegerin is bound, internalized, and degraded by multiple myeloma cells. Blood 100, 3002–3007.
- 66 Théoleyre, S., Kwan Tat, S., Vusio, P., Blanchard, F., Gallagher, J., Ricard-Blum, S., Fortun, Y., Padrines, M., Rédini, F. and Heymann, D. (2006) Characterization of osteoprotegerin binding to glycosaminoglycans by surface plasmon resonance: role in the interactions with receptor activator of nuclear factor κB ligand (RANKL) and RANK. Biochem. Biophys. Res. Commun. 347, 460–467
- 67 Stringer, S. E., Forster, M. J., Mulloy, B., Bishop, C. R., Graham, G. J. and Gallagher, J. T. (2002) Characterization of the binding site on heparan sulfate for macrophage inflammatory protein 1α. Blood 100, 1543–1550.
- 68 Fox, S. W. and Lovibond, A. C. (2005) Current insights into the role of transforming growth factor-beta in bone resorption. Mol. Cell Endocrinol. 243, 19–26.
- 69 Shinmyouzu, K., Takahashi, T., Ariyoshi, W., Ischimiya, H., Kanzaki, S. and Nishihara, T. (2007) Dermatan sulphate inhibits osteoclast formation by binding to receptor activator of NF-κB ligand. Biochem. Biophys. Res. Commun. 354, 447– 452.
- 70 Bishof, D., Elsawa, S. F., Mantchev, G., Yoon, J., Michels, G. E., Nilson, A., Sutor, S. L., Platt, J. L., Ansell, S. M., von Bulow, G. and Bram, R. J. (2006) Selective activation of TACI by syndecan-2. Blood 107, 3235–3242.
- 71 Sakurai, D., Hase, H., Kanno, Y., Kojima, H., Okumura, K. and Kobata, T. (2007) TACI regulates Ig1 production by APRIL in collaboration with HSPG. Blood 109, 2961–2967.
- 72 Hendriks, J., Planelles, L., de Jong-Odding, J., Hardenberg, G., Pals, S. T., Hahne, M., Spaargaren, M. and Medema, J. P. (2005) Heparan sulfate proteoglycan binding promotes APRIL-induced tumor cell proliferation. Cell Death Differ. 12: 637–648.
- 73 Emery, J. G., McDonnell, P., Burke, M. B., Deen, L. C., Lyn, S., Silverman, C., Dul, E., Appelbaum, E. R., Eicman, C., DiPrinzio, R., Dodds, R. A., James, I. E., Rosenberg, M., Lee, J. C. and YounG, P. R. (1998) Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. J. Biol. Chem. 273, 14363– 14367.
- 74 Cross, S. S., Harrison, R. F., Balasubramanian, S. P., Lippitt, J. M., Evans, C. A., Reed, M. W. and Holen, I. (2006) Expression of receptor activator of nuclear factor kappabeta ligand (RANKL) and tumour necrosis factor related, apoptosis inducing ligand (TRAIL) in breast cancer, and their relations with osteoprotegerin, oestrogen receptor, and clinicopathological variables. J. Clin. Pathol. 59, 716–720.
- 75 Holen, I. and Shipman, C. M. (2006) Role of osteoprotegerin (OPG) in cancer. Clin. Sci. 110, 279–291.

2346 M. Baud'huin et al.

- 76 Sandra, F., Hendarmin, L. and Nakamura, S. (2006) Osteoprotegerin (OPG) binds with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): suppression of TRAILinduced apoptosis in ameloblastomas. Oral Oncol. 42, 415– 420.
- 77 Van Poznak, C., Cross, S. S., Saggese, M., Hudis, C., Panageas, K. S., Norton, L., Coleman, R. E. and Holen, I. (2006) Expression of osteoprotegerin (OPG), TNF related apoptosis inducing ligand (TRAIL), and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) in human breast tumours. J. Clin. Pathol. 59, 56–63.
- 78 Neville-Webbe, H. L., Cross, N. A., Eaton, C. L., Nyambo, R., Evans, C. A., Coleman, R. E. and Holen, I. (2004) Osteoprotegerin (OPG) produced by bone marrow stromal cells protects breast cancer cells from TRAIL-induced apoptosis. Breast Cancer Res. Treat. 86, 269–279.
- 79 Nyambo, R., Cross, N., Lippitt, J., Holen, I., Bryden, G., Hamdy, F. C. and Eaton, C. L. (2004) Human bone marrow stromal cells protect prostate cancer cells from TRAILinduced apoptosis. J. Bone Miner. Res. 19, 1712–1721.
- 80 Miyashita, T., Kawakami, A., Nakashima, T., Yamasaki, S., Tamai, M., Tanaka, F., Kamachi, M., Ida, H., Migita, K., Origuchi, T., Nakao, K. and Eguchi, K. (2004) Osteoprotegerin (OPG) acts as an endogenous decoy receptor in tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)mediated apoptosis of fibroblast-like synovial cells. Clin. Exp. Immunol. 137, 430–436.
- 81 Atkins, G., J., Bouralexis, S., Evdokiou, A., Hays, S., Labrinidis, A., Zannettino, A. C., Haynes, D. R. and Findlay, D. M. (2002) Human osteoblasts are resistant to Apo2L/ TRAIL-mediated apoptosis. Bone 31, 448–456.
- 82 Holen, I., Croucher, P. I., Hamdy, F. C. and Eaton, C. L. (2002) Osteoprotegerin (OPG) is a survival factor for human prostate cancer cells. Cancer Res. 62, 1619–1623.
- 83 Kaifu, T., Nakahara, J., Inui, M., Mishima, K., Momiyama, T., Kaji, M., Sugahara, A., Koito, H., Ujike-Asai, A., Nakamura, A., Kanazawa, K., Tan-Takeuchi, K., Iwasaki, K., Yokoyama, W. M., Kudo, A., Fujiwara, M., Asou, H. and Takai, T. (2003) Osteopetrosis and thalamic hypomyelinosis with synaptic degeneration in DAP12-deficient mice. J. Clin. Invest. 111, 323–332.
- 84 Koga, T., Inui, M., Inoue, K., Kim, S., Suematsu, A., Kobayashi, E., Iwata, T., Ohnishi, H., Matozaki, T., Kodama, T., Taniguchi, T., Takayanagi, H. and Takai, T. (2004) Costimulatory signals mediated by the ITAM motif cooperate with RANKL for bone homeostasis. Nature 428, 758–763.
- 85 Mocsai, A., Humphrey, M. B., Van Ziffle, J. A., Hu, Y., Burghardt, A., Spusta, S. C., Majumdar, S., Lanier, L.L and Lowell, C. A. (2004) The immunomodulatory adapter proteins DAP12 and Fc receptor gamma-chain (FcRgamma) regulate development of functional osteoclasts through the Syk tyrosine kinase. Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. 101, 6158– 6163.
- 86 Humphrey, M. B., Lanier, L. L. and Nakamura, M. C. (2005) Role of ITAM-containing proteins and their receptors in the immune system and bone. Immunol. Rev. 208, 50–65.
- 87 Humphrey, M. B., Ogasawara, K., Yao, W., Spusta, S. C., Daws, M. R., Lane, N. E., Lanier, L. L. and Nakamura, M. C. (2004) The signalling adapter protein DAP12 regulates multinucleation during osteoclast development. J. Bone Miner. Res. 19, 224–234.
- 88 Humphrey, M. B., Daws, M. R., Spusta, S. C., Torchia, J. A., Lanier, L. L., Seaman, W. E. and Nakamura, M. C. (2006) TREM2, a DAP12-associated receptor, regulates osteoclast differentiation and function. J. Bone Miner. Res. 21, 237–245.
- 89 Wittrant, Y., Théoleyre, S., Chipoy, C., Padrines, M., Blanchard, F., Heymann, D. and Rédini, F. (2004) RANKL/ RANK/OPG: new therapeutic targets in bone tumors and associated osteolysis. Biochim. Biophys. Acta 1704, 49–57

- 90 Dougall, W. C. and Chaisson, M. (2006) The RANKL/ RANK/OPG triad in cancer-induced bone diseases. Cancer Metastasis Rev. 25, 541–549.
- 91 Jones, D. H., Nakashima T., Sanchez, O. H., Kozieradzki I., Komarova, S. V., Sarosi I., Morony S., Rubin E., Sarao R., Hojilla, C.V., Komnenovic V., Kong, Y.Y., Schreiber M., Dixon, S. J., Sims, S. M., Khokha R., Wada T. and Penninger, J. M. (2006) Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. Nature 440: 692–696.
- 92 Mori K, Le Goff, B., Charrier, C., Battaglia, S., Heymann, D. and Rédini, F. (2007) DU145 human prostate cancer cells express functional receptor activator of NF κ B: new insights in the prostate cancer bone metastasis process. Bone 40, 981– 990.
- 93 Tometsko, M., Armstrong, A., Miller, R., Jones, J., Chaisson, M., Branstetter, D. and Dougall, W. (2004) 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. 19: S25
- 94 Martin, T. J. and Mundy, G. R. (2007) Bone metastasis: can osteoclasts be excluded? Nature 445, E19.
- 95 Jones, D.H., Nakashima T., Sanchez, O.H., Kozieradzki I., Komarova, S.V., Sarosi I., Morony S., Rubin E., Sarao R., Hojilla, C.V., Komnenovic V., Kong, Y.Y., Schreiber M., Dixon, S.J., Sims, S.M., Khokha R., Wada T. and Penninger, J.M. (2007) Jones et al. reply. Nature 445, E19-E20.
- 96 Brown J. M., Corey, E., Lee, Z. D., True, L. D., Yun, T. J., Tondravi, M. and Vessella, R. L. (2001) Osteoprotegerin and RANK ligand expression in prostate cancer. Urology 57: 611–616.
- 97 Zhang J., Dai J., Qi Y., Lin, D.L., Smith P., Strayhorn C., Mizokami A., Fu Z., Westman J. and Keller, E.T. (2001) Osteoprotegerin inhibits prostate cancer-induced osteoclastogenesis and prevents prostate tumor growth in the bone. J. Clin. Invest. 107, 1235–1244.
- 98 Zhang, J., Dai, J., Yao, Z., Lu, Y., Dougall, W. and Keller, E. T. (2003) Soluble receptor activator of nuclear factor κB Fc diminishes prostate cancer progression in bone. Cancer Res. 63, 7883–7390.
- 99 Corey E., Brown, L.G., Kiefer, J.A., Quinn, J.E., Pitts, T.E., Blair, J.M. and Vessella, R.L. (2005) Osteoprotegerin in prostate cancer bone metastasis. Cancer Res. 65, 1710–1718.
- 100 Whang, P.G., Schwarz, E.M., Gamradt, S.C., Dougall, W.C. and Lieberman, J.R. (2005) The effects of RANK blockade and osteoclast depletion in a model of pure osteoblastic prostate cancer metastasis in bone. J. Orthop. Res. 23: 1475– 1483.
- 101 Wittrant, Y., Mori, K., Riet, A., Kamijo, A., Heymann, D. and Rédini F (2006) RANKL directly induces bone morphogenetic protein-2 expression in RANK-expression POS-1 osteosarcoma cells. Int. J. Oncol. 28, 261–269
- 102 Mori, K., Berreur, M., Le Goff, B., Riet, A., Moreau, A., Blanchard, F., Chevalier, C., Guisle-Marsollier, I., Léger, J., Gouin, F., Rédini, F. and Heymann, D. (2007) Human osteosarcoma cells express functional receptor activator of nuclear factor-kappa, B. J. Pathol. 211, 555–562.
- 103 Pearse, R. N., Sordillo, E. M., Yaccoby, S., Wong, B. R., Liau, D. F., Colman, N., Michaeli, J., Epstein, J. and Choi, Y. (2001) Multiple myeloma disrupts the TRANCE/osteoprotegerin cytokine axis to trigger bone destruction and promote tumor progression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 1581–1586.
- 104 Vanderkerken, K., De Leenheer, E., Shipman, C., Asosingh, K., Willems, A., Van Camp, B. and Croucher, P. (2003) Recombinant osteoprotegerin decreases tumor burden and increases survival in a murine model of multiple myeloma. Cancer Res. 63, 287–289.
- 105 Brown, J. M., Vessella, R. L., Kostenuik, P. J., Dunstan, C. R., Lange, P. H. and Corey, E. (2001) Serum osteoprotegerin levels are increased in patients with advanced prostate cancer. Clin. Cancer Res. 7, 2977–2983.
- 106 Grimaud, E., Soubigou, L., Couillaud, S., Coipeau, P., Moreau, A., Passuti, N., Gouin, F., Rédini, F. and Heymann,

D. (2003) Receptor activator of NF-kB ligand (RANKL)/ osteoprotegerin (OPG) ratio is increased in severe osteolysis. Am. J. Pathol. 163, 2021–2031.

- 107 Giuliani, N., Bataille, R., Mancini, C., Lazzaretti, M. and Barille, S. (2001) Myeloma cells induce imbalance in the osteoprotegerin/osteoprotegerin ligand system in the human bone marrow environment. Blood 98, 3527–3533.
- 108 Voskaridou, E. and Terpos E (2005) Osteoprotegerin to soluble receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand ratio is reduced in patients with thalassaemia-related osteoporosis who receive vitamin D3. Eur. J. Haematol. 74, 359– 361.
- 109 Alvarez, L., Peris, P., Guanabens, N., Vidal, S., Ros, I., Pons, F., Filella, X., Monegal, A., Munoz-Gomez, J. and Ballesta, A. M. (2003) Serum osteoprotegerin and its ligand in Paget's disease of bone: relationship to disease activity and effect of treatment with bisphosphonates. Arthritis Rheum. 48, 824– 828.
- 110 Dobnig, H., Hofbauer, L. C., Viereck, C., Obermayer-Pietsch, B. and Fahrleitner-Pammer A . (2006) Changes in the RANK ligand/osteoprotegerin system are correlated to changes in bone mineral density in bisphosphonate-treated osteoporotic patients. Osteoporosis Int. 17, 693–703.
- 111 Chen, G., Sircar, K., Aprikian, A., Potti, A., Goltzman, D. and Rabbani SA (2006) Expression of RANKL/RANK/OPG in primary and metastatic human prostate cancer as markers of disease stage and functional regulation. Cancer 107, 289–298.
- 112 Milkosch, P., Igerc, I., Kidlacek, S., Woloszczuk, W., Gallowithsch, H. J., Kresnik, E., Stettner, H., Grimm, G., Lind, P. and Pietschmann, P. (2006) Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin in men with thyroid cancer. Eur. J. Clin. Invest. 35, 566–573.
- 113 Granchi, D., Garaventa, A., Amato, I., Paolucci, P. and Baldini, N. (2006) Plasma levels of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in patients with neuroblastoma. Int. J. Cancer. 119, 146–151.
- 114 Terpos, E., Szydlo, R., Apperley, J. F., Hatjiharissi, E., Politou, M., Meletis, J., Viniou, N., Yataganas, X., Goldman, J. M. and Rahemtulla, A. (2003) Soluble receptor activator of nuclear factor kappaB ligand-osteoprotegerin ratio predicts survival in multiple myeloma: proposal for a novel prognostic index. Blood 102, 1064–1069.
- 115 D'Amore, M., Fanelli, M., D'Amore, S., Fontana, A. and Minenna, G. (2006) Receptor activator of NF(kappa)B ligand/osteoprotegerin (RANKL/OPG) system and osteopontin (OPN) serum levels in a population of Apulian postmenopausal women. Panminerva Med. 48, 215–221.
- 116 Kim, H. R., Kim, H. Y. and Lee, S. H. (2006) Elevated serum levels of soluble receptor activator of nuclear factors-kappaB ligand (sRANKL) and reduced bone mineral density in patients with ankylosing spondylitis (AS). Rheumatology 45, 1197–1200.
- 117 Vanderborght, A., Linsen, L., Thewissen, M., Geusens, P., Raus, J. and Stinissen, P. (2004) Osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand mRNA expression in patients with rheumatoid arthritis and healthy controls. J. Rheumatol. 31, 1483–1490.
- 118 Veigl, D., Niederlova, J. and Krystufkova, O. (in press). Periprosthetic osteolysis and its association with the molecule RANKL expression. Physiol. Res.
- 119 Granchi, D., Pellacani, A., Spina, M., Cenni, E., Savarino, L. M., Baldini, N. and Giunti, A. (2006) Serum levels of osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factorkappaB ligand as markers of periprosthetic osteolysis. J. Bone Joint Surg. Am. 88, 1501–1509.
- 120 Abdallah, B. M., Stilgren, L. S., Nissen, N., Kassem, M., Jorgensen, H. R. and Abrahamsen, B. (2005) Increased RANKL/OPG mRNA ratio in iliac bone biopsies from women with hip fractures. Calcif. Tissue Int. 76, 90–97.
- 121 Martini, G., Gennari, L., Merlotti , D., Salvadori, S., Franci, M. B., Campagna, S., Avanzati, A., De Paola, V., Vallegi, F. and Nuti R (2007). Serum OPG and RANKL levels before

and after intravenous bisphosphonate treatment in Paget's disease of bone. Bone 40, 457–463.

- 122 Terpos, E., Politou, M., Szydlo, R., Nadal, E., Avery, S., Olavarria, E., Kanfer, E., Goldman, J. M., Apperley, J. F. and Rahemtulla, A. (2004). Autologous stem cell transplantation normalizes abnormal bone remodeling and sRANKL/osteoprotegerin ratio in patients with multiple myeloma. Leukemia 18, 1420–1426.
- 123 Di Carlo, C., Tommaselli, G. A., Gargano, V., Sammartino, A., Bifulco, G., Tauchmanova, L., Colao, A. and Nappi, C. (2007) Effects of estrogen-progestin therapy on serum levels of RANKL, osteoprotegerin, osteocalcin, leptin, and ghrelin in postmenopausal women. Menopause 14, 38–44.
- 124 Dovio, A., Data, V. and Angeli, A. (2005) Circulating osteoprotegerin and soluble RANKL: do they have a future in clinical practice? J. Endocrinol. Invest. 28, 14–22.
- 125 Humphrey, E. L. Williams, J. H. H., Davie, M. W. J. and Marshall, M. J. (2006) Effects of dissociated glucocorticoids on OPG and RANKL in osteoblastic cells. Bone 38, 652–661.
- 126 Palmqvist, P., Lundberg, P., Persson, E., Johansson, A., Lundgren, I., Lie, A., Conaway, H. H. and Lerner, U. H. (2005) Inhibition of hormone and cytokine stimulated osteoclastogenesis and bone resorption by interleukin-4 and interleukin-13 is associated with increased OPG and decreased RANKL and RANK in a STAT6 dependent pathway. J. Biol. Chem. 281, 2414–2419.
- 127 Kaji, H., Kanatani, M., Sugimoto, T. and Chihara, K. (2005) Statins modulate the levels of osteoprotegerin/receptor activator activator of NFkappa B ligand mRNA in mouse bone-cell cultures. Horm. Metab. Res. 37, 589–592.
- 128 Li, Y., Kucuk, O., Hussain, M., Abrams, J., Cher, M. L. and Sarkar, F. H. (2006) Antitumor and antimetastatic activities of docetaxel are enhanced by genistein through regulation of osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor kappaB (RANK)/RANK ligand/MMP-9 signaling in prostate cancer. Cancer Res. 66, 4816–4825.
- 129 Kiviranta, R., Morko, J., Alatalo, S. L., NicAmhlaoibh, R., Risteli, J., Laitala-Leinonen, T. and Vuorio, E. (2005) 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 36, 159–172.
- 130 Li, J., Sarosi, I., Yan, X. Q., Morony, S., Capparelli, C., Tan, H. L., McCabe, S., Elliott, R., Scully, S., Van, G., Kaufman, S., Juan, S. C., Sun, Y., Tarpley, J., Martin, L., Christensen, K., McCabe, J., Kostenuik, P., Hsu, H., Fletcher, F., Dunstan, C. R., Lacey, D. L. and Boyle, W. J. (2000) RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. Proc. Natl. Acad. Sci., USA 97, 1566–1571.
- 131 Lee, H. W., Kim, B. S., Kim, H. J., Lee, C. W., Yoo, H. J., Kim, J. B. and Yoon, S. (2005) Upregulation of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand expression in the thymic subcapsular, paraseptal, perivascular, and medullary epithelial cells during thymus regeneration. Histochem. Cell Biol. 123, 491–500.
- 132 Walsh, M. C., Kim, N., Kadono, Y., Rho, J., Lee, S. Y., Lorenzo, J. and Choi, Y. (2006) Osteoimmunology: interplay between the immune system and bone metabolism. Annu. Rev. Immunol. 24, 33–63.
- 133 Mosheimer, B. A., Kaneider, N. C., Feistritzer, C., Sturn, D. H. and Wiedermann, C. J. (2004) Expression and function of RANK in human monocyte chemotaxis. Arthritis Rheum. 50, 2309–2316.
- 134 Breuil, V., Schmid-Antomarchi, H., Schmid-Alliana, A., Rezzonico, R., Euller-Ziegler, L. and Rossi, B. (2003) The receptor activator of nuclear factor (NF)-kappaB ligand (RANKL) is a new chemotactic factor for human monocytes. FASEB J. 17, 1751–1753.
- 135 Henrisksen, K., Karsdal, M., Delaisse, J. M. and Engsig, M. T. (2003) RANKL and vascular endothelial growth factor

(VEGF) induce osteoclast chemotaxis through an ERK1/2dependent mechanism. J. Biol. Chem. 278, 48745–48753.

- 136 Lee, S. K. and Lorenzo, J. (2006) Cytokines regulating osteoclast formation and function. Curr. Opin. Rheumatol. 18, 411–418.
- 137 Kwak, H. B., Lee, S. W., Jin, H. M., Ha, H., Lee, S. H., Takeshita, S., Tanaka, S., Kim, H. M., Kim, H. H. and Lee, Z. H. (2005) Monokine induced by interferon-gamma is induced by receptor activator of nuclear factor kappa B ligand and is involved in osteoclast adhesion and migration. Blood 105, 2963–2969.
- 138 Nakamura, E. S., Koizumi, K., Kobayashi, M., Saitoh, Y., Arita, Y., Nakayama, Y., Sakurai, H., Yoshie, O. and Saiki, I. (2006) RANKL-induced CCL22/macrophage-derived chemokine produced from osteoclasts potentially promotes the bone metastasis of lung cancer expressing its receptor CCR4. Clin. Exp. Metastasis. 23, 9–18.
- 139 Kim, M. S., Day, C. J., and Morrison, N. A. (2005) MCP-1 is induced by receptor activator of nuclear factor-{kappa}B ligand, promotes human osteoclast fusion, and rescues granulocyte macrophage colony-stimulating factor suppression of osteoclast formation J. Biol. Chem. 280, 16163–16169.
- 140 Secchiero, P., Corallini, F., Barbarotto, E., Melloni, E., di Iasio, M. G., Tiribellu, M. and Zauli, G. (2006) Role of the RANKL/RANK system in the induction of interleukin-8 (IL-8) in B chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) cells. J. Cell Physiol. 207, 158–164.
- 141 Terpos, E., Politou, M., Viniou, N. and Rahemtulla, A. (2005) Significance of macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1alpha) in multiple myeloma. Leuk. Lymphoma 46, 1699–1707.
- 142 Bendre, M., Gaddy, D., Nicholas, R. W. and Suva, L. J. (2003) Breast cancer metastasis to bone: it is not all about PTHrP. Clin. Orthop. Relat. Res. 415 Suppl: S39–S45.
- 143 Seshasayee, D., Wang, H., Lee, W. P., Gribling, P., Ross, J., Wan Bruggen, N., Carano, R. and Grewal, I. S. (2004). A novel *in vivo* role for osteoprotegerin ligand in activation of monocyte effector function and inflammatory response. J. Biol. Chem. 279, 30202–30209.
- 144 Park, H. J., Park, O. J. and Shin, J. (2005) Receptor activator of NF-kappaB ligand enhances the activity of macrophages as antigen presenting cell. Exp. Mol. Med. 37, 524–532.
- 145 Ali, A. S., Lax, A.S, Lijestrom, M., Paakkari, I., Ashammakhi, N., Kovanen, P. T. and Konttinen, Y. T. (2006) Mast cells in atherosclerosis as a source of the cytokine RANKL. Clin. Chem. Lab. Med. 44, 672–674.
- 146 Maitz, P., Kandler, B., Fischer, M. B., Watzek, G. and Gruber, R. (2006) Activated platelets retain their potential to induce osteoclast-like cell formation in murine bone marrow cultures. Platelets 17, 477–483
- 147 Kawai, T., Matsuyama, T., Hosokawa, Y., Makihira, S., Ski, M., Karimbux, N. Y., Gooncalves, N. Y., Goncalves, R. B., Valcerde, P., Dibart, S., Li, Y. P., Miranda, L. A., Ernst, C. W., Izumi, Y. and Taubman, M. A. (2006) B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. Am. J. Pathol. 169, 987–998.
- 148 Kotake, S., Udagawa, N., Hakoda, M., Mogi, M., Yano, K., Tsuda, E., Takahashi, K., Furuya, T., Ishiyama, S., Kim, K. J., Saito, S., Nishikawa, N., Togari, A., Tomastsu, T., Suda, T. and Kamatani, N. (2001) Activated human T cells directly induce osteoclastogenesis from human monocytes: possible role of T cells in bone destruction in rheumatoid arthritis patients. Arthritis Rheum. 44, 1003–1012.
- 149 Schett, G., Hayer, S., Zwerina, J., Redlich, K., and Smolen, J. S. (2005) Mechanisms of disease: the link between RANKL and arthritic bone disease. Nat. Clin. Pract. Rheumatol. 1, 47– 54.
- 150 Masui, T., Sakano, S., Hasegawa, Y., Warashina, H. and Ishiguro, N. (2005) Expression of inflammatory cytokines, RANKL and OPG induced by titanium, cobalt-chromium and polyethylene particles. Biomaterials 26, 1695–1702.

- 151 Maruyama, K., Takada, Y., Ray, N., Kishimoto, Y., Penninger, J. M., Yasuda, H. and Matsuo, K. (2006) Receptor activator of NF-kappa B ligand and osteoprotegerin regulate proinflammatory cytokine production in mice. J. Immunol. 177, 3799–3805.
- 152 Ashcroft, A. J., Cruickshank, S. M., Croucher, P. I., Perry, M. J., Rollinson, S., Lippit, J. M., Child, J. A., Dunstan, C., Felsburg, P. J., Morgan, G. J. and Carding, S. R. (2003) Colonic dendritic cells, intestinal inflammation, and T cellmediated bone destruction are modulated by recombinant osteoprotegerin. Immunity19, 849–861.
- 153 Green, E. A., Choi, Y. and Flavell, R. A. (2002) Pancreatic lymph node-derived CD4(+)CD25(+) Treg cells: highly potent regulators of diabetes that require TRANCE-RANK signals. Immunity 16, 183–191.
- 154 Loser, K., Mehling, A., Loeser, S., Apelt, J., Kuhn, A., Grabbe, S., Schwarz, T., Penninger, J. M. and Beissert, S. (2006) Epidermal RANKL controls regulatory T-cell numbers via activation of dentritic cells. Nat. Med. 12, 1372–1379.
- 155 Schoppet, M., Henser, S., Ruppert, V., Stubig, T., Al-Fakhri, N., Maisch, B. and Hofbauer, L. C. (2007) Osteoprotegerin expression in dendritic cells increases with maturation and is NF-kappaB-dependent. J. Cell. Biochem. 100, 1430–1439.
- 156 Yun, T. J., Tallquist, M. D., Aicher, A., Rafferty, K. L., Marshall, A. J., Moon, J. J., Ewings, M. E., Mohaupt, M., Herring, S. W. and Clark, E. A. (2001) Osteoprotegerin, a crucial regulator of bone metabolism, also regulates B cell development and function. J. Immunol. 166, 1482–1491.
- 157 Grevic, D. V., Lukic, K., Kovacic, N., Ivcevic, S., Katavic, V. and Marusic, A. (2006) Activated T lymphocytes suppress osteoclastogenesis by diverting early monocyte/macrophage progenitor lineage commitment towards dendritic cell differentiation through down-regulation of receptor activator of nuclear factor-kappaB and c-Fos. Clin. Exp. Immunol. 146, 46–58.
- 158 Zannettino, A. C., Holding, C. A., Diamond, P., Atkins, G. J., Kostakis, P., Farrugia, A., Gamble, J., To, L. B., Findlay, D. M., Haynes, D. R. (2005) Osteoprotegerin (OPG) is localized to the Weibel-Palade bodies of human vascular endothelial cells and is physically associated with von Willebrand factor. J. Cell Physiol. 204, 714–723.
- 159 Collin-Osdoby, P. (2004) Regulation of vascular calcification by osteoclast regulatory factors RANKL and osteoprotegerin. Circ. Res. 95, 1046–1057.
- 160 Collin-Osdoby, P., Rothe, L., Anderson, F., Nelson, M., Maloney, W. and Osdoby, P. (2001) Receptor activator of NFkappa B and osteoprotegerin expression by human microvascular endothelial cells, regulation by inflammatory cytokines, and role in human osteoclastogenesis. J. Biol. Chem. 276, 20659–20672.
- 161 Kaden, J. J., Bickelhaupt, S., Grobholz, R., Haase, K. K., Sarikoc, A., Kilic, R., Brueckmann, M., Lang, S., Zahn, I., Vahl, C., Hagl, S., Dempfle, C. E. and Borggrefe, M. (2004) Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulate aortic valve calcification. J. Mol. Cell Cardiol. 36, 57–66.
- 162 Kindle, L., Rothe, L., Kriss, M., Osdoby, P. and Collin-Osdoby, P. (2006) Human microvascular endothelial cell activation by IL-1 and TNF-alpha stimulates the adhesion and transendothelial migration of circulating human CD14+ monocytes that develop with RANKL into functional osteoclasts. J. Bone Miner. Res. 21, 193–206.
- 163 Olesen, P., Ledet, T. and Rasmussen, L. M. (2005) Arterial osteoprotegerin: increased amounts in diabetes and modifiable synthesis from vascular smooth muscle cells by insulin and TNF-alpha. Diabetologia 48, 561–568.
- 164 Olesen, P., Nguyen, K., Wogensen, L., Ledet, T. and Rasmussen, L. M. (2007) Calcification of human vascular smooth muscle cells: associations with osteoprotegerin expression and acceleration by high-dose insulin. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 292, H1058-H1064.

- 165 Anand, D. V., Lahiri, A., Lim, E., Hopkins, D. and Corder, R. (2006) The relationship between plasma osteoprotegerin levels and coronary artery calcification in uncomplicated type 2 diabetic subjects. J. Am. Coll. Cardiol. 47, 1850–1857.
- 166 Vik, A., Mathiesen, E. B., Noto, A. T., Sveinbjornsson, B., Brox, J. and Hansen, J. B. (2007) Serum osteoprotegerin is inversely associated with carotid plaque echogenicity in humans. Atherosclerosis 191, 128–134.
- 167 Ziegler, S., Kudlacek, S., Luger, A. and Minar, E. (2005) Osteoprotegerin plasma concentrations correlate with severity of peripheral artery disease. Atherosclerosis 182, 175–180.
- 168 Pritzker, L. B., Scatena, M. and Giachelli, C. M. (2004) The role of osteoprotegerin and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in human microvascular endothelial cell survival. Mol. Biol. Cell. 15, 2834–2841.
- 169 Malyankar, U. M., Scatena, M., Suchland, K. L., Yun, T. J., Clark, E. A. and Giachelli, C. M. (2000) Osteoprotegerin is an alpha vbeta 3-induced, NF-kappa B-dependent survival factor for endothelial cells. J. Biol. Chem. 275, 20959–20962.
- 170 Scatena, M., Giachelli, C. (2002) The αvβ3 integrin, NF-κB, osteoprotegerin endothelial cell survival pathway. Trends Cardiovasc. Med. 12, 83–88.
- 171 Kobayashi-Sakamoto, M., Hirose, K., Nishikata, M., Isogai, E. and Chiba, I. (2006) Osteoprotegerin protects endothelial cells against apoptotic cell death induced by *Porphyromonas gingivalis* cysteine proteinases. FEMS Microbiol. Lett. 264, 238–245.
- 172 Kobayashi-Sakamoto, M., Hirose, K., Isogai, E. and Chiba, I. (2004) NF-kappaB-dependent induction of osteoprotegerin by *Porphyromonas gingivalis* in endothelial cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 315, 107–112.
- 173 Cross, S. S., Yang, Z., Brown, N. J., Balasubramanian, S. P., Evans, C. A., Woodward, J. K., Neville-Webbe, H. L., Lippitt, J. M., Reed, M. W., Coleman, R. E. and Holen, I. (2006) Osteoprotegerin (OPG) – a potential new role in the regulation of endothelial cell phenotype and tumour angiogenesis? Int. J. Cancer 118, 1901–1908.
- 174 Kim, Y. M., Kim, Y. M., Lee, Y. M., Kim, H. S., Kim, J. D., Choi, Y., Kim, K. W., Lee, S. Y. and Kwon, Y. G. (2002) TNFrelated activation-induced cytokine (TRANCE) induces angiogenesis through the activation of Src and phospholipase C (PLC) in human endothelial cells. J. Biol. Chem. 277, 6799– 6805.
- 175 Min, J. K., Kim, Y. M., Kim, Y. M., Kim, E. C., Gho, Y. S., Kang, I. J., Lee, S. Y., Kong, Y. Y. and Kwon, Y. G. (2003) Vascular endothelial growth factor up-regulates expression of receptor activator of NF-kappa B (RANK) in endothelial cells: concomitant increase of angiogenic responses to RANK ligand. J. Biol. Chem. 278, 39548–39557.
- 176 Kim, H. H., Shin, H. S., Kwak, H. J., Ahn, K. Y., Kim, J. H., Lee, H. J., Lee, M. S., Lee, Z. H. and Koh, G. Y. (2003) RANKL regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. FASEB J. 17, 2163–2165.
- 177 Min, J. K., Cho, Y. L., Choi, J. H., Kim, Y., Kim, J. H., Yu, Y. S., Rho, J., Mochizuki, N., Kim, Y. M., Oh, G. T. and Kwon, Y. G. (2007) Receptor activator of nuclear factor-kB ligand increases vascular permeability: impaired permeability and angiogenesis in eNOS-deficient mice. Blood 109, 1496–1502.
- 178 Zhang, J., Fu, M., Myles, D., Zhu, X., Du, J., Cao, X. and Chen, Y. E. (2002) PDGF induces osteoprotegerin expression in vascular smooth muscle cells by multiple signal pathways. FEBS Lett. 521, 180–184.
- 179 Yao, S., Liu, D., Pan, F. and Wise, G. E. (2006) Effect of vascular endothelial growth factor on RANK gene expression in osteoclast precursors and on osteoclastogenesis. Arch. Oral Biol. 51, 596–602.
- 180 Asagiri, M. and Takayanagi, H. (2007) The molecular understanding of osteoclast differentiation. Bone 40, 251–264.
- 181 Wada, T., Nakashima, T., Hiroshi, N. and Penninger, J. (2006) RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. Trends Mol. Med. 12, 17–25.

- 182 Body, J. J., Facon, T., Coleman, R. E., Lipton, A., Geurs, F., Fan, M., Holloway, D., Peterson, M. C. and Bekker, P. J. (2006) A study of the biological receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand inhibitor, Denosumab, in patients with multiple myeloma or bone metastases from breast cancer. Clin. Cancer Res. 12, 1221-1228.
- 183 Kim, H. K.W., Morgan-Bagley, S. and Kostenuik, P. (2006) RANKL inhibition: a novel strategy to decrease femoral head deformity after ischemic osteonecrosis. J. Bone Miner. Res. 21, 1946–1954.
- 184 Feeley, B. T., Liu, N. Q., Conduah, A. H., Krenek, L., Roth, K., Dougall, W. C., Huard, J., Dubinett, S. and Lieberman, J. R. (2006) Mixed metastatic lung cancer lesions in bone are inhibited by noggin overexpression and rank: Fc administration. J. Bone Miner. Res. 21, 1571–1580.
- 185 Heymann, D., Ory, B., Blanchard, F., Heymann, M. F., Coipeau, P., Charrier, C., Couillaud, S., Thièry, J. P., Gouin, F. and Rédini, F. (2005) Enhanced tumor regression and tissue repair when zoledronic acid is combined with ifosfamide in rat osteosarcoma. Bone 37, 74–86.
- 186 Cheng, X., Kinosaki, M., Takami, M., Choi, Y., Zhang, H. and Murali, R. (2004) Disabling of receptor activator of nuclear factor-kappaB (RANK) receptor complex by novel osteoprotegerin-like peptidomimetics restores bone loss in vivo. J. Biol. Chem. 279, 8269–8277.
- 187 Heath, D. J., Vanderkerken, K., Cheng, X., Gallagher, O., Prideaux, M., Murali, R. and Croucher, P. I. (2007) An osteoprotegerin-like peptidomimetic inhibits osteoclastic bone resorption and osteolytic bone disease in myeloma. Cancer Res. 67, 202–208.
- 188 Aoki, K., Saito, H., Itzstein, C., Ishiguro, M., Shibata, T., Blanque, R., Mian, A. H., Takahashi, M., Suzuki, Y., Yoshimatsu, M., Yamaguchi, A., Deprez, P., Mollat, P., Murali, R., Ohya, K., Horne, W. C. and Baron, R. (2006) A TNF receptor loop peptide mimic blocks RANK ligandinduced signaling, bone resorption, and bone loss. J. Clin. Invest. 116, 1525–1534.
- 189 Heymann, D., Fortun, Y., Rédini, F. and Padrines, M. (2005) Osteolytic bone diseases: physiological analogues of bone resorption effectors as alternative therapeutic tools to the standard bisphosphonates. Drug Discov. Today 10, 242–247.
- 190 Xing, L., Bushnell, T. P., Carlson, L., Tai, Z., Tondravi, M., Siebenlist, U., Young, F. and Boyce, B. F. (2002) NF-kappaB p50 and p52 expression is not required for RANK-expressing osteoclast progenitor formation but is essential for RANKand cytokine-mediated osteoclastogenesis. J. Bone Miner. Res. 17, 1200–10
- 191 Xing, L., Carlson, L., Story, B., Tai, Z., Keng, P., Siebenlist, U. and Boyce, B. F. (2003) Expression of either NF-kappaB p50 or p52 in osteoclast precursors is required for IL-1-induced bone resorption. J. Bone Miner. Res. 18, 260–269.
- 192 Chen, T. and Feng, X. (2006) Cell-based assay strategy for identification of motif-specific RANK signaling pathway inhibitors. Assay Drug Dev. Technol. 4, 473–492.
- 193 Jimi, E. and Ghish, S. (2005) Role of nuclear factor-kappa B in the immune system and bone. Immunol. Rev. 208, 80–87.
- 194 Iotsova, V., Caamano, J., Loy, J., Yang, Y., Lewin, A. and Bravo, R. (1997) Osteopetrosis in mice lacking NF-kappaB1 and NF-kappaB2. Nat. Med. 3, 1285–1289.
- 195 Eguchi, J., Koshino, T., Takagi, T., Hayashi, T. and Saito, T. (2002) NF-kappa B and I-kappa B overexpression in articular chondrocytes with progression of type II collagen-induced arthritis in DBA/1 mouse knees. Clin. Exp. Rheumatol. 20, 647–652.
- 196 Cho, M. L., Kang, J. W., Moon, Y. M., Nam, H. J., Jhun, J. Y., Heo, S. B., Jin, H. T., Min, S. Y., Ju, J. H., Park, K. S., Cho, Y. G., Yoon, C. H., Park, S. H., Sung, Y. C. and Kim, H. Y. (2006) STAT3 and NF-kappaB signal pathway is required for IL-23-mediated IL-17 production in spontaneous arthritis animal model IL-1 receptor antagonist-deficient mice. J. Immunol. 176, 5652–5661.

2350 M. Baud'huin et al.

- 197 Amos, N., Lauder, S., Evans, A., Feldmann, M. and Bondeson, J. (2006) Adenoviral gene transfer into osteoarthritis synovial cells using the endogenous inhibitor IkappaBalpha reveals that most, but not all, inflammatory and destructive mediators are NFkappaB dependent. Rheumatology 45, 1201–1209.
- 198 Okamoto, T. (2006) NF-kappaB and rheumatic diseases. Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets 6, 359–372.
- 199 Park, B. K., Zhang, H., Zeng, Q., Dai, J., Keller, E. T., Giordano, T., Gu, K., Shah, V., Zarbo, R. J., McCauley, L., Shi, S., Chen, S. and Wang, C. Y. (2007). NF-kB in breast cancer cells promotes osteolytic bone metastasis by inducing osteoclastogenesis via GM-CSF. Nat. Med. 13, 62–69.
- 200 Clohisy, J. C., Hirayama, T., Frazier, E., Han, S. K. and Abu-Amer, Y. (2004) NF-κB signaling blockade abolishes implant particle-induced osteoclastogenesis. J. Orthop. Res. 22, 13– 20.
- 201 Clohisy,, J. C., Roy, B. C., Biondo, C., Frazier, E., Willis, D., Teitelbaum, S. L. and Abu-Amer, Y. (2003) Direct inhibition of NF-kappa B blocks bone erosion associated with inflammatory arthritis J. Immunol. 171, 5547–5553
- 202 Kawamura, I., Morishita, R., Tomita, N., Lacey, E., Aketa, M., Tsujimoto, S., Manda, T., Tomoi, M., Kida, I., Higaki, J., Kaneda, Y., Shimomura, K. and Ogihara, T. (1999) Intratumoral injection of oligonucleotides to the NF kappa B binding site inhibits cachexia in a mouse tumor model. Gene Ther. 6, 91–97.

- 203 Penolazzi, L., Borgatti, M., Lambertini, E., Mischiati, C., Finotti, A., Romanelli, A., Saviano, M., Pedone, C., Piva, R. and Gambari, R. (2004) Peptide nucleic acid-DNA decoy chimeras targeting NF-kappaB transcription factors: induction of apoptosis in human primary osteoclasts. Int. J. Mol. Med. 14, 145–152.
- 204 Penolazzi, L., Lambertini, E., Borgatti, M., Piva, R., Cozzani, M., Giovannini, I., Naccari, R., Siciliani, G. and Gambari, R. (2003) Decoy oligodeoxynucleotides targeting NF-kappaB transcription factors: induction of apoptosis in human primary osteoclasts. Biochem. Pharmacol. 66, 1189–1198.
- 205 Suzuki, Y., Sgiyama C, Ohno, O. and Umezawa, K. (2004). Preparation and biological activities of optically active dehydroxymethylepoxyquinomycin, a novel NF-kB inhibitor. Tetrahedron 60, 7061–7066.
- 206 Takatsuna, H., Asgiri, M., Kubota, T., Oka, K., Osada, T., Sugiyama, C., Saito, H., Aoki, K., Ohya, K., Takayanagi, H. and Umezawa, K. (2005) Inhibition of RANKL-induced osteoclastogenesis by (-)-DHMEQ, a novel NF-kappaB inhibitor, through downregulation of NFATc1. J. Bone Miner. Res. 20, 653–662.
- 207 Ye, H., Arron, J. R., Lamothe, B., Cirilli, M., Kobayashi, T., Shevde, N. K., Segal, D., Dzivenu, O. K., Vologodskaia, M., Yim, M., Du, K., Singh, S., Pike, J. W., Darnay, B. G., Choi, Y. and Wu, H. (2002) Distinct molecular mechanism for initiating TRAF6 signalling. Nature 418, 443–447.

To access this journal online: http://www.birkhauser.ch/CMLS