

Entre ostéoporose et ostéopétrose, l'ostéoclaste est un des maîtres du jeu

La conservation de la structure osseuse résulte d'un équilibre entre une activité de dégradation de la matrice osseuse assurée par les ostéoclastes, et une activité de formation assurée par les ostéoblastes. Ostéoblastes et ostéoclastes sont issus de précurseurs différents puisque les ostéoblastes sont d'origine mésenchymateuse alors que les ostéoclastes sont d'origine hématopoïétique. Il est maintenant admis que les précurseurs ostéoclastiques appartiennent au lignage monocytaire conduisant aux macrophages [1]. Les ostéoclastes sont des cellules multinucléées, postmitotiques, mais l'exploration de leur métabolisme est freinée par l'absence de lignées cellulaires immortalisées. C'est indirectement l'analyse, chez la souris, des conséquences de l'inactivation, par recombinaison homologue, de gènes dont les produits sont essentiels à leur développement ou à leur fonction, qui a révélé les ostéoclastes à la communauté des biologistes. Ainsi, les souris *op/op*, déficientes en M-CSF (*macrophage-colony stimulating factor*), sont ostéopérotiques, révélant l'importance de cette cytokine pour la survie des ostéoclastes et des macrophages [2-4]. L'invalidation des gènes codant pour c-src [5], c-fos [6, 7], PU-1 [8] ou les sous-unités p50 et p52 de NF-κB [9] entraîne aussi une ostéopétrose, par altération de la formation ou de la fonction des ostéoclastes.

Cependant, le principal obstacle à l'étude de la biologie de l'ostéoclaste réside dans la difficulté d'obtenir des ostéoclastes fonctionnels *in vitro*. Les ostéoclastes isolés directement par dissociation de fragments osseux ou de moelle osseuse sont fonctionnels, puisque capables de résorber des lamelles osseuses *in vitro*, mais ils ne prolifèrent pas et

ont une durée de vie très courte. Certains modèles de différenciation *in vitro* dérivés de cultures de moelle osseuse permettent d'obtenir des cellules géantes polycaryoniques, qui expriment les marqueurs des ostéoclastes, mais n'ont aucune fonction de résorption osseuse. Le groupe japonais de T. Suda (Tokyo) a permis un progrès substantiel en observant que les ostéoclastes isolés de broyats d'os étaient toujours enchâssés dans des amas de cellules stromales. Exploitant cette donnée, ils ont eu l'idée de cultiver des précurseurs d'ostéoclastes de souris en présence d'une sous-couche de cellules stromales et/ou d'ostéoblastes.

Production d'ostéoclastes *in vitro*

Des cellules hématopoïétiques isolées de moelle osseuse ou de rate de souris, mais aussi des monocytes circulants ou des macrophages tissulaires, sont cultivés avec des cellules stromales ou des ostéoblastes [10]. Pour obtenir, dans ces conditions, la formation d'ostéoclastes fonctionnels, résorbant des lamelles osseuses, il est nécessaire d'ajouter au milieu des facteurs « inducteurs », classés en trois catégories : la 1,25 (OH)₂ vitamine D₃, qui agit *via* un récepteur nucléaire ; l'hormone parathyroïde (PTH), la prostaglandine E₂ (PGE₂), qui utilisent la voie de la PK-A ; les interleukines-6 et -11 (IL-6, IL-11) qui transmettent un signal par l'intermédiaire de la gp130, partie intégrante du récepteur.

Cependant, ces molécules, seules, sont incapables de stimuler la production d'ostéoclastes mûrs, et la présence de cellules stromales est indispensable à la différenciation des précurseurs ostéoclastiques. Un contact entre les deux populations, hématopoïétique et stromale, est

nécessaire puisque l'interposition d'une membrane filtrante supprime la différenciation ostéoclastique, même si on ajoute de la vitamine 1,25 (OH)₂D₃ [10]. Ces données ont conduit T. Suda à proposer l'existence d'un facteur membranaire, qu'il a appelé ODF (*osteoclast differentiation factor*) [11], exprimé par les cellules stromales et les ostéoblastes, et responsable de la différenciation ostéoclastique. C'est ce travail « princeps » qui est à l'origine de la formidable explosion des connaissances en 1998, et d'une compétition effrénée entre le groupe de T. Suda et la compagnie Snow Brand Milk Products (Japon) et la société Amgen (États-Unis).

Identification de l'OPG/OCIF, versions japonaise et américaine d'un inhibiteur de l'ostéoclastogénèse

Au cours des années 1997-1998, ces deux groupes identifieront par des stratégies différentes la même molécule, *osteoprotegerin* (OPG) pour Amgen [12] et OCIF (*osteoclast inhibitory factor*) pour T. Suda [13].

L'OPG [12], un nouveau membre de la superfamille des récepteurs du TNF (TNFR), a été identifiée en criblant une banque d'ADNc d'intestin de rat fœtal. Il s'agit d'une glycoprotéine de 401 acides aminés qui est sécrétée sous forme dimérique, après clivage des 21 premiers acides aminés de chaque monomère. Pour déterminer la fonction biologique de cette protéine, Simonet *et al.* ont construit un modèle de souris transgéniques dans lequel le gène *opg* est placé sous contrôle du promoteur du gène de l'apolipoprotéine E associé à un *enhancer* spécifique du tissu hépatique, ce qui assure la sécrétion de quantités importantes d'OPG dans la circulation sanguine. Ces souris développent une ostéopétrose sévère,

conséquence d'une réduction importante du nombre des ostéoclastes, contrastant avec une population normale de macrophages. *In vitro*, l'addition d'OPG à des co-cultures de cellules hématopoïétiques et stromales permet d'inhiber totalement la formation des ostéoclastes. *In vivo*, son administration à des souris sauvages permet d'accroître leur densité osseuse. C'est cette action de « protection » de l'os qui justifie le nom d'ostéoprotégérine (OPG).

Dans le même temps, Yasuda *et al.* [13] identifiaient, dans le surnageant de cultures de fibroblastes humains, une molécule qui se révéla être identique à OPG, et qu'ils nommèrent OCIF (*osteoclast inhibitory factor*) en raison de sa capacité d'inhiber la différenciation ostéoclastique. Il est intéressant de noter que les OPG/OCIF murin et humain ont respectivement 84 % et 94 % d'homologie avec la protéine de rat, indiquant que le gène est très conservé au moins chez les mammifères.

L'inactivation, par recombinaison homologue, du gène codant pour l'OPG/OCIF a confirmé que la fonction de ce facteur sécrété est de bloquer l'ostéoclastogénèse et la résorption osseuse [14, 15]. Les souris *OPG/OCIF*^{-/-} développent en effet une ostéoporose rapide et sévère des os corticaux et spongieux qui s'accompagne d'une incidence élevée de fractures. Le groupe d'Amgen rapporte également que les souris *OPG/OCIF*^{-/-} meurent à 6 mois de complications associées aux anomalies massives du squelette, notamment une calcification des parois vasculaires.

Identification du ligand de OPG/OCIF, promoteur essentiel de l'ostéoclastogénèse

Comme OPG/OCIF est une molécule soluble, inhibant la production d'ostéoclastes en présence de cellules stromales, une hypothèse logique était qu'elle devait se lier à un récepteur/ligand transmembranaire, exprimé à la surface des cellules stromales et responsable de l'induction de la différenciation des ostéoclastes. A nouveau, Japonais et Américains ont identifié, indépendamment et

par des stratégies différentes, ODF (*osteoclastic differentiating factor*) et OPG-L (*OPG-ligand*). Partant de l'observation que l'OPG/OCIF se liait aux cellules stromales (lignée ST2) uniquement si celles-ci étaient traitées par la 1,25(OH)2D3, Yasuda *et al.* [13] ont criblé une banque de cellules stromales traitées par la 1,25(OH)2D3 et ont identifié un ADNc codant pour une protéine correspondant à un facteur de différenciation ostéoclastique (ODF). De son côté, le groupe d'Amgen, à l'aide d'une protéine de fusion Fc-OPG partait à la recherche des protéines transmembranaires capables de se lier à l'OPG, et présentes à la surface de cellules stromales, ce qui leur a permis d'identifier un ligand de l'OPG (OPG-L) [16].

La comparaison des séquences de l'ODF et de l'OPG-L a établi l'identité des deux molécules, et révélé leur identité à deux autres molécules préalablement clonées dans d'autres systèmes cellulaires, RANK-L (*receptor activator of NF-κB ligand*) [17] et le TRANCE (*TNF-related activation-induced cytokine*) [18].

OPG-L/ODF/TRANCE/RANK-L* est un polypeptide de 317 acides aminés chez l'homme et de 316 acides aminés chez la souris, remarquablement bien conservé puisqu'il y a 87 % d'homologie entre les séquences humaine et murine. C'est une protéine transmembranaire de type II avec un court domaine amino-terminal intracellulaire et un long domaine carboxy-terminal extracellulaire. L'homologie la plus significative avec les autres protéines de la famille TNF se trouve dans le domaine formé par les 159 derniers acides aminés. Le peptide recombinant contenant les acides aminés 158 à 316 est une protéine soluble active. OPG-L représente bien un – sinon le seul – des facteurs essentiels à la différenciation ostéoclastique comme l'ont montré les résultats des tests *in vitro* publiés en 1998 [16, 19-21], l'analyse des souris dont le gène a été invalidé [22]. La forme soluble d'OPG-L, associée au M-CSF, entraîne la différenciation en ostéo-

clastes de précurseurs hématopoïétiques de rate, de monocytes/macrophages mûrs de souris, et de monocytes circulants humains, et ce en l'absence de cellules stromales stimulées par la 1,25(OH)2D3, ou des autres facteurs de résorption mentionnés plus haut. L'expression du gène *OPG-L* est induite dans les cellules stromales stimulées par ces mêmes facteurs de résorption, ce qui confirme que la protéine est un facteur-clé de la différenciation ostéoclastique *in vitro*.

Autres fonctions de l'OPG-L

Les transcrits d'OPG-L sont détectés préférentiellement dans les ganglions lymphatiques, plus faiblement dans la rate, le thymus, la moelle osseuse, le cœur, le placenta, les muscles, l'estomac, la thyroïde et, bien sûr, dans le tissu osseux [16, 17].

TRANCE, équivalent d'OPG-L, a d'abord été impliqué dans la régulation de la réponse immunitaire dépendante des lymphocytes T. Le gène est activé très précocement après stimulation du TCR (*T cell receptor*) [18]. RANK-L, un autre équivalent, a, lui, été initialement impliqué dans le contrôle de la différenciation des monocytes en cellules dendritiques mais surtout il permet aux cellules dendritiques de stimuler la prolifération des lymphocytes T naïfs [17].

L'inactivation du gène nous en apprend plus [22]: les souris *opg-t*^{-/-} présentent une ostéopétrose puisque les précurseurs ostéoclastiques ne peuvent se différencier en ostéoclastes mûrs, les cellules stromales de l'environnement de la moelle osseuse ne produisant pas la cytokine OPG-L. L'administration de la molécule soluble corrige l'absence d'ostéoclastes, puisqu'il n'y a pas d'altération intrinsèque de cette voie de différenciation.

En revanche, le retentissement de l'absence d'OPG-L sur le développement des lymphocytes T et B était plus inattendu. On observe une diminution de la taille du thymus, une splénomégalie et une altération du développement des lymphocytes T et B. Pour les thymocytes, il s'agit d'un blocage de la transition du stade

* Que nous désignerons par OPG-L par souci de clarté.

CD4⁻/CD8⁻/CD44⁻/CD25⁺ au stade CD44⁻/CD25⁻, et pour les lymphocytes B d'un défaut de maturation des cellules pro-B B220⁺ CD43⁺ CD25⁻ en lymphocytes B220⁺ CD43⁻ CD25⁺. Dans ces deux cas, et contrairement à ce qui se passe pour la différenciation ostéoclastique, le défaut est intrinsèque aux précurseurs T et B et n'est corrigé ni par l'apport de la cytokine ni par la greffe de cellules stromales de moelle osseuse. En revanche, les macrophages et les cellules dendritiques des souris *opg*^{-/-} sont épargnés, et ces dernières sont capables de stimuler la production de cytokines de lymphocytes T allogéniques normaux. L'inverse n'est pas vrai, et des lymphocytes T de souris *opg*^{-/-} stimulés par des cellules dendritiques de souris sauvages ne produisent pas de cytokines, soulignant la gravité de la perturbation du développement des lymphocytes T en l'absence d'OPG-L. Enfin, les souris *opg*^{-/-} n'ont pas de ganglions lymphatiques, mais l'architecture splénique est normale et les

plaques de Peyer présentes dans la muqueuse de l'intestin.

RANK, récepteur de l'OPG-L sur les précurseurs ostéoclastiques

Bien qu'aucun résultat n'ait encore été publié, il y a un consensus entre Amgen et le groupe japonais pour considérer que le récepteur d'OPG-L, à la surface des précurseurs ostéoclastiques, est la protéine transmembranaire RANK – un autre membre de la famille des récepteurs du TNF – décrit par Anderson *et al.* [17]. Le groupe d'Amgen a proposé le terme ODAR pour désigner ce facteur mais c'est RANK qui devrait être utilisé*.

Conclusions et perspectives

La molécule OPG-L agit donc par le biais de deux récepteurs de la superfamille des récepteurs du TNF (*tumor necrosis factor*): l'un, OPG/OCIF, est soluble, l'autre, RANK est transmembranaire (*figure 1*). OPG-L/RANK-L/TRANCE/ODF, dans le cadre de

la différenciation ostéoclastique, est exprimé par les cellules stromales stimulées par diverses molécules activatrices de la résorption osseuse (1,25 [OH]2D3; PTH; PGE2; IL-11; IL-6). La liaison du ligand à son récepteur RANK à la surface des précurseurs ostéoclastiques stimule leur différenciation. Le récepteur dimérique soluble OPG/OCIF peut aussi se fixer sur l'OPG-L et bloquer ainsi son interaction avec RANK. OPG/OCIF, récepteur « leurre » (*decoy receptor*), semble donc être un régulateur de la différenciation ostéoclastique (*Tableau I*). Une forme soluble de OPG-L peut être engendrée *in vitro*, mais l'existence d'une forme équivalente *in vivo* n'a pas été prouvée. En effet, on peut imaginer que, selon les espèces considérées, la partie TNF de cette protéine soit clivée ou non. Cela permettrait d'expliquer pourquoi la différenciation ostéoclastique chez la souris ne peut se faire que par coculture avec des cellules stromales alors que, chez l'homme, certains laboratoires ont montré que des surnageants de culture suffisaient à stimuler la formation d'ostéoclastes à partir de monocytes [23]. Ces résultats de l'année 1998 ont totalement bouleversé notre approche de l'ostéoclastogenèse et ouvrent des perspectives multiples. Ils offrent la possibilité de produire à volonté des populations homogènes d'ostéoclastes fonctionnels, ce qui va permettre d'analyser les relations qui existent entre précurseurs ostéoclastiques, monocytes, macrophages et cellules dendritiques. Restent aussi à élucider le rôle de RANK et de OPG/OCIF dans d'autres fonctions physiologiques et en particulier immunitaires ■

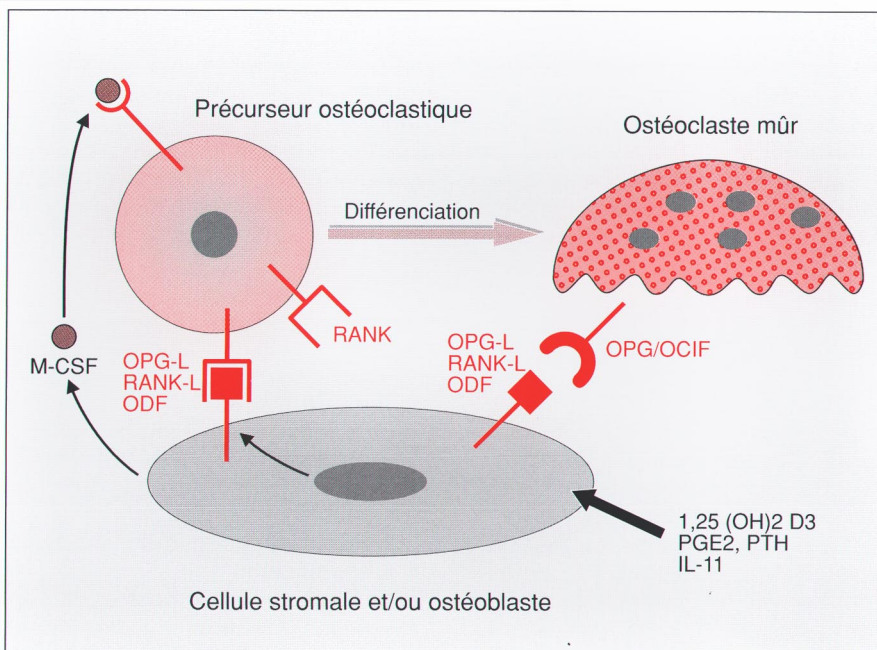


Figure 1. **Schéma représentant les différents acteurs intervenant dans le contrôle de la différenciation des précurseurs ostéoclastiques.** RANK-L: receptor activator of NF- κ B ligand; TRANCE: TNF-related activation-induced cytokine; ODF: osteoclast differentiation factor; OPG: osteoprotegerin; OCIF: osteoclast inhibitory factor; M-CSF: macrophage-colony stimulating factor.

* RANK est bien le récepteur d'OPG-L/RANK-L/TRANCE/ODF. [D'après Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, et al. *Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand.* Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96: 3540-5.]

Tableau I

NOMENCLATURE ET PROPRIÉTÉS DES PARTENAIRES CONTRÔLANT LA DIFFÉRENCIATION OSTÉOCLASTIQUE

Nomenclature – pour Amgen – pour Snow Brand Milk Products – Autres	OPG OCIF	OPG-L ODF RANK-L TRANCE	ODAR-RANK RANK
Homologie	TNF-R	TNF	TNF-R
Forme moléculaire	Sécrété	Transmembranaire	Transmembranaire
Source cellulaire	??	Cellules stromales ostéoblastes	Ostéoclastes
Action biologique	Blocage de l'ostéoclastogénèse	Stimulation de l'ostéoclastogénèse	Récepteur d'OPG-L

Remerciements

Je remercie C. Domenget pour sa lecture critique de ce manuscrit. Les travaux de l'équipe sont financés par l'ARC, la Ligue Nationale contre le Cancer et le comité du Rhône, le Cnrs (contrat « biologie cellulaire »), et l'Inra (AIP tissus minéralisés).

Pierre Jurdic

Docteur d'État, directeur de recherche à l'Inserm.

Laboratoire de biologie moléculaire et cellulaire, UMR Cnrs/ENS, Inra 913, École normale supérieure, 46, allée d'Italie, 69364 Lyon Cedex, France.

RÉFÉRENCES

- Jurdic P, Solari F. Nouveaux concepts sur l'origine des ostéoclastes: relation avec les macrophages normaux et inflammatoires. *Med Sci* 1997; 13 : 1285-93.
- Yoshida H, Hayashi SI, Kunisada T, *et al.* The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature* 1990; 34: 442-4.
- Wiktor-Jedrzejczak W, Bartocci A, Ferrante Jr AW, *et al.* Total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage deficient osteopetrotic (op/op) mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 4828-32.
- Lagasse E, Weissman IL. Enforced expression of Bcl-2 in monocytes rescues macrophages and partially reverses osteopetrosis in op/op mice. *Cell* 1997; 89: 1021-31.
- Soriano P, Montgomery C, Geske R, Bradley A. Targeted disruption of the c-src

proto-oncogene leads to osteopetrosis in mice. *Cell* 1991; 64: 693-702.

6. Wang ZQ, Ovitt C, Grigoriadis AE, Möhle-Steinlein U, Rütter U, Wagner EF. Bone and haematopoietic defects in mice lacking c-fos. *Nature* 1992; 360: 741-5.

7. Grigoriadis AE, Wang ZQ, Cecchini MG, *et al.* c-Fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling. *Science* 1994; 266: 443-8.

8. Tondravi MM, McKercher SR, Anderson K, *et al.* Osteopetrosis in mice lacking hematopoietic transcription factor PU.1. *Nature* 1997; 386: 81-8.

10. Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, *et al.* Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 7260-4.

11. Suda T, Nakamura I, Jimi E, Takahashi N. Regulation of osteoclast function. *J Bone Min Res* 1997; 12: 869-79.

12. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, *et al.* Amgen EST Program. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997; 89: 309-19.

13. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, *et al.* Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 3597-602.

14. Mizuno A, Amizuka N, Irie K, *et al.* Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 247: 610-5.

15. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, *et al.* Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 1998; 12: 1260-8.

16. Lacey DL, Timms E, Tan HL, *et al.* Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998; 93: 165-76.

17. Anderson DM, Maraskivsky E, Billingsley WL, *et al.* A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 1997; 390: 175-9.

18. Wong BR, Rho J, Arron J, *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: 25190-4.

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

20. Quinn JMW, Elliott J, Gillespie MT, Martin TJ. A combination of osteoclast differentiation factor and macrophage-colony stimulating factor is sufficient for both human and mouse osteoclast formation *in vitro*. *Endocrinology* 1998; 139: 4424-7.

21. Tsukii K, Shima N, Mochizuki SI, *et al.* Osteoclast differentiation factor mediates an essential signal for bone resorption induced by 1,25-dihydroxyvitamin D₃, prostaglandin E₂, or parathyroid hormone in the microenvironment of bone. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 246: 337-41.

22. Kong Y, Yoshida H, Sarosi I, *et al.* OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 1999; 397: 315-23.

23. Mbalaviele G, Orsel P, Morieux C, Nijweide PJ, De Vernejoul MC. Osteoclast formation from human cord blood mononuclear cells co-cultured with mice embryonic metatarsals in the presence of M-CSF. *Bone* 1995; 16: 171-7.

TIRÉS À PART

P. Jurdic.