

Nouveaux concepts sur l'origine des ostéoclastes : relation avec les macrophages normaux et inflammatoires

**Florence Solari
Pierre Jurdic**

Les ostéoclastes sont des cellules géantes multinucléées, responsables de la résorption osseuse. Selon des travaux récents, ils proviendraient de la fusion de précurseurs mononucléés d'origine hématopoïétique aux stades tardifs de la voie de différenciation monocytaire, voire directement des macrophages avec lesquels ils partagent de nombreux antigènes. En effet, on peut obtenir des ostéoclastes résorbant l'os à partir de macrophages tissulaires; en outre, l'analyse de souris ayant un phénotype ostéopétrotique montre que ces deux types cellulaires ont une relation très étroite. Par conséquent, les ostéoclastes pourraient être des macrophages polycaryoniques, tels qu'on les trouve dans les réactions inflammatoires, spécialisés dans la résorption de l'os. Ces deux types cellulaires seraient donc issus d'une même voie de différenciation dont l'ultime étape serait la spécialisation de leur fonction.

Le métabolisme osseux dépend de l'action coordonnée de deux types cellulaires: les ostéoblastes et les ostéoclastes [1]. Les ostéoblastes, d'origine mésenchymateuse, sont responsables de la synthèse de la matrice osseuse et les ostéoclastes, d'origine hématopoïétique, sont responsables de sa dégradation. L'intégration de la fonction de ces deux types cellulaires est nécessaire: (1) lors du modelage osseux qui a lieu pendant la croissance de l'os; (2) pour le maintien qualitatif et quanti-

tatif du squelette durant la vie adulte; (3) pour réparer l'os après un traumatisme ou une fracture; et enfin (4) pour assurer l'homéostasie du calcium sérique.

Les ostéoclastes sont des cellules multinucléées (*figure 1*) postmitotiques; la régulation de leur différenciation représente donc un mécanisme important pour leur renouvellement et le maintien du processus de résorption.

La caractérisation des ostéoclastes a été particulièrement difficile car ce sont des cellules relativement rares

ADRESSE

F. Solari: étudiante en thèse. P. Jurdic: directeur de recherche à l'Inserm. Laboratoire de biologie moléculaire et cellulaire, UMR 49 Cnrs/Ens, équipe Inra 913, École normale supérieure de Lyon, 46, allée d'Italie, 69364 Lyon Cedex 07, France.

qui couvrent moins de 1 % de la surface osseuse chez le jeune adulte et qui sont étroitement associées à la matrice minéralisée; aucune population totalement pure n'a pu être isolée à ce jour. Compte tenu de leur durée de vie très courte, environ 48 heures en culture, il est difficile d'en obtenir en nombre suffisant pour des analyses biochimiques et moléculaires. Néanmoins, des progrès considérables dans la connaissance des ostéoclastes ont été faits ces dernières années grâce au développement de systèmes de différenciation *in vitro*; toutefois, leur ontogénie précise reste un sujet de controverse. Il est établi que les ostéoclastes multinucléés dérivent de la fusion de précurseurs mononucléés d'origine hématopoïétique [2, 3]. Cependant, selon les modèles proposés, les précurseurs divergeraient plus ou moins tardivement au cours de la voie de différenciation myéloïde.

Rappels sur la différenciation hématopoïétique

L'hématopoïèse regroupe un ensemble d'étapes permettant de distinguer, à partir d'une cellule souche commune multipotente, plusieurs précurseurs qui donneront ultérieurement les différents lignages hématopoïétiques (figure 2). Chacune des étapes de leur programme de différenciation fait l'objet d'un contrôle précis, relayé par des facteurs de croissance spécifiques du lignage et du stade de différenciation.

La caractérisation des précurseurs hématopoïétiques a initialement été réalisée chez la souris, à l'aide de techniques de cultures *in vitro* en milieu semi-solide. Dans ce type de culture de tissu hématopoïétique, les précurseurs développent des colonies de cellules différenciées dont la composition indique la potentialité du précurseur dont elles dérivent. Différents précurseurs ont été identifiés selon le type de cellules qu'ils produisent en culture. Des colonies de macrophages dérivent de précurseurs unipotents, CFU-M (*colony forming unit-macrophage*), alors que des colonies de granulocytes dérivent de CFU-G (*colony forming unit-granulocyte*). Celles composées de granulocytes et de macrophages dérivent du

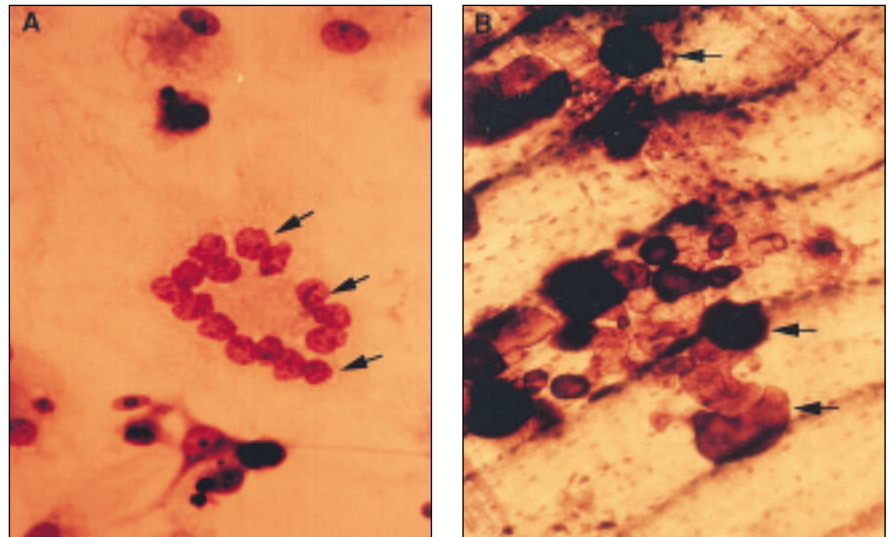


Figure 1. **A. Photographie d'un ostéoclaste multinucléé** (les flèches indiquent des noyaux) $\times 700$. **B. Trous de résorption** (indiqués par des flèches), formés par des ostéoclastes, à la surface d'une lamelle d'os colorée au bleu de toluidine. $\times 150$.

précurseur commun aux deux lignées, appelé CFU-GM (figure 2). Ces précurseurs n'ont pu être caractérisés que par l'identification de facteurs de croissance (CSF ou *colony stimulating factor*) qui favorisent leur développement en culture, comme respectivement le G-CSF (granulocyte), le M-CSF (macrophage) et le GM-CSF (granulocyte-macrophage). La voie de différenciation du lignage monocyttaire est bien caractérisée *in vitro* (figure 2). Parmi les précurseurs, la première cellule identifiée dans cette voie est la CFU-GEMM (*colony forming unit-granulocyte, erythrocyte, macrophage,*

megacaryocyte), qui est le précurseur multipotent des érythrocytes, mégacaryocytes, monocytes et granulocytes. Cette cellule donnera la CFU-GM bipotente dont dérive la CFU-M, le premier précurseur restreint à la voie monocyttaire [4]. Le facteur de croissance M-CSF stimule la différenciation de la CFU-M vers le monocyte puis le macrophage. *In vivo*, les monocytes quittent la moelle osseuse et migrent, *via* la circulation sanguine, dans différents tissus où ils donnent les différents macrophages tissulaires [5]. Nous examinerons les différentes hypothèses proposées quant à l'ori-

Tableau I	
PRINCIPAUX MARQUEURS UTILISÉS POUR CARACTÉRISER LES OSTÉOCLASTES	
Marqueurs	Ostéoclastes
Morphologiques	<ul style="list-style-type: none"> • Multinucléation • Abondance de mitochondries périnucléaires • Membrane plissée
Enzymatiques	<ul style="list-style-type: none"> • Phosphatase acide résistante au tartrate (TRAP) • Anhydrase carbonique II (CAII)
De surface membranaire	<ul style="list-style-type: none"> • $\alpha V\beta 3$ (récepteur de la vitronectine) • Récepteur de la calcitonine (CTR)
Fonctionnel	Résorption osseuse

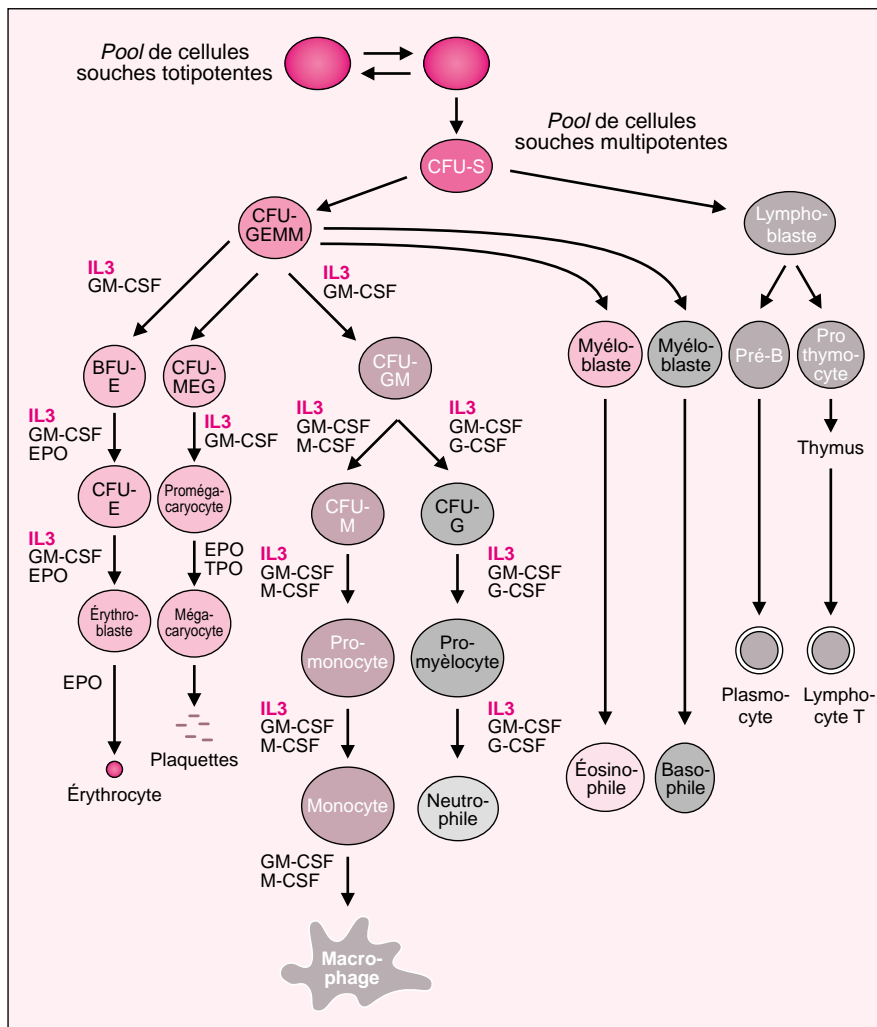


Figure 2. **Illustration des principales étapes de l'hématopoïèse chez les mammifères.** Les précurseurs hématopoïétiques se trouvent dans la moelle osseuse. Leur nom, CFU (colony forming unit), provient de leur aptitude à former des colonies in vivo chez des souris irradiées ou dans des milieux semi-solides in vitro. Le précurseur le plus immature (CFU-S) est à l'origine de toutes les cellules hématopoïétiques, y compris les lymphocytes. Tous les autres dérivent de celui-ci et sont de plus en plus limités dans leurs potentiels de différenciation. La CFU-GEMM est à l'origine des lignées granulocytaires, érythrocytaires, mégacaryocytaires et monocytaires. Les BFU-E et CFU-E sont les précurseurs de la lignée érythrocytaire ; la CFU-MEG donnera les mégacaryocytes et les plaquettes ; la CFU-GM sera à l'origine, soit de la CFU-G précurseur des granulocytes neutrophiles, soit de la CFU-M précurseur des monocytes et des macrophages. L'ensemble de la différenciation hématopoïétique s'effectue sous le contrôle de cytokines (IL-3: interleukine-3; EPO: érythropoïétine; TPO: thrombopoïétine; GM-CSF: granulocyte, macrophage- colony stimulating factor; G-CSF: granulocyte- colony stimulating factor; M-CSF: macrophage- colony stimulating factor).

gine des ostéoclastes. Sur la base des travaux les plus récents, incluant ceux de notre laboratoire, nous proposons l'hypothèse selon laquelle les ostéoclastes dérivent de stades très tardifs de la différenciation monocyttaire. Ces résultats donnent un nou-

vel éclairage aux relations pouvant exister entre les différents types de cellules phagocytaires que sont les ostéoclastes, les macrophages, et les macrophages polycaryoniques trouvés dans les tissus inflammatoires ou tumoraux.

Les systèmes in vitro de différenciation des ostéoclastes

Il faut rappeler ici les principaux critères utilisés pour l'identification des ostéoclastes (Tableau I) fondés sur : leur morphologie ; l'expression de certains marqueurs tels que la phosphatase acide résistante au tartrate (ou TRAP), les récepteurs de la calcitonine (CTR) ; l'intégrine $\alpha\text{V}\beta\text{3}$, récepteur de la vitronectine et l'anhydrase carbonique II (CAII). Enfin, la capacité des ostéoclastes de résorber des fragments d'os *in vitro* (figure 1) est le critère d'identification fonctionnel.

Durant ces dernières années plusieurs approches ont été développées pour déterminer l'origine cellulaire précise des ostéoclastes, ainsi que le micro-environnement optimal pour induire leur différenciation terminale en cellules fonctionnelles résorbant l'os. Dans ce but, de nombreux modèles ont été décrits dans lesquels des populations cellulaires contenant les précurseurs potentiels des ostéoclastes ont été cultivées sur plusieurs substrats. La plupart des modèles cellulaires récents utilisent la co-culture de cellules de moelle osseuse avec des cellules stromales de type ostéoblaste en présence de vitamine D₃, hormone de différenciation ostéoclastique. Dans ces conditions il est possible d'obtenir des ostéoclastes résorbant l'os.

Les différents modèles proposés pour l'origine des ostéoclastes

Ces différentes voies de différenciation sont schématisées sur la figure 3.

• **Première hypothèse : les ostéoclastes dérivent d'un précurseur antérieur à la CFU-GM**
 Pour un certain nombre d'auteurs, les précurseurs des ostéoclastes sont bien des cellules d'origine hématopoïétique, mais qui dérivent très précocement dans la voie de différenciation myéloïde, avant le stade CFU-GM. Cette hypothèse repose aussi bien sur des observations cliniques que sur des résultats obtenus *in vitro*. Flanagan (Londres, GB) [6] a observé que, chez des patients atteints d'apla-

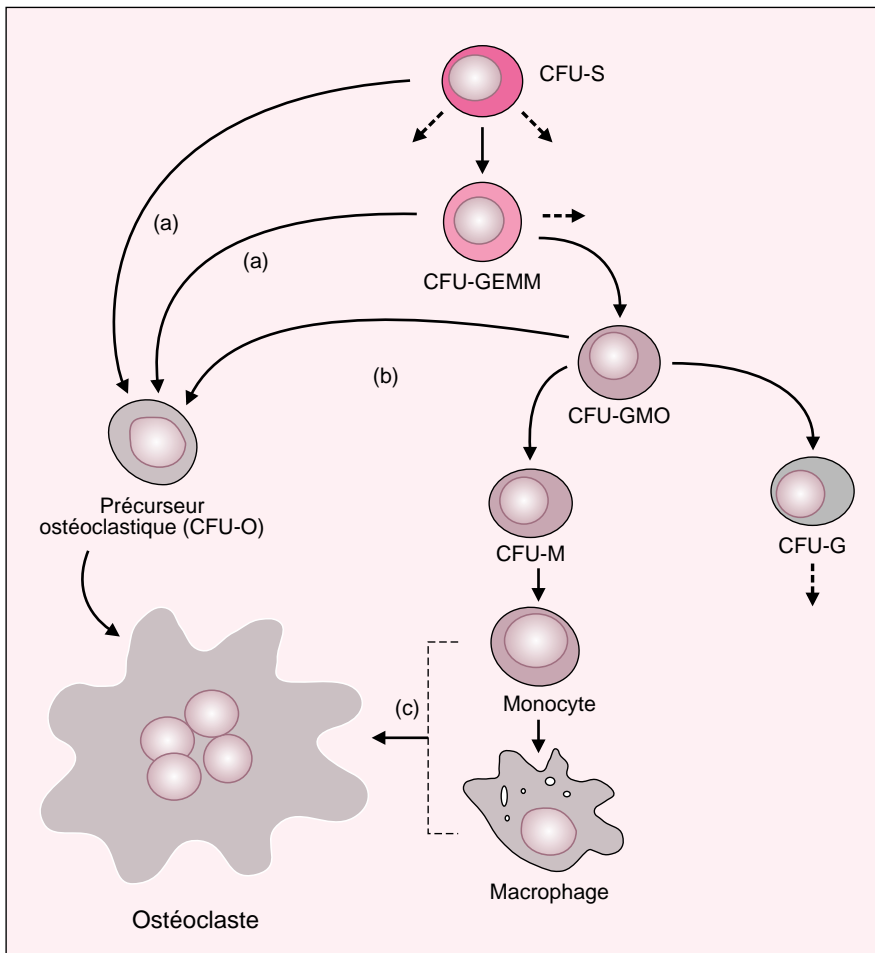


Figure 3. **Les différents modèles proposés pour la voie de différenciation des ostéoclastes.** Voie a : Un précurseur ostéoclastique, appelé CFU-O (colony forming unit-osteoclast) par homologie avec la nomenclature classique des précurseurs hématopoïétiques, dérive, soit d'une cellule pluripotente (CFU-S), soit d'un précurseur plus tardif la CFU-GEMM, à l'origine des lignées granulocytaires, érythrocytaires, mégacaryocytaires et monocytaires. Voie b : le même précurseur ostéoclastique CFU-O dériverait directement d'un précurseur CFU-GMO aux potentialités encore plus limitées car capable de ne donner que les lignées granulocytaires, monocytaires et d'ostéoclastes. Voie c : la cellule CFU-GMO s'engage, soit pour donner une CFU-G à l'origine des lignées granulocytaires, soit pour donner une CFU-M qui se différenciera ensuite en monocytes puis en macrophages. Ce sont ces deux derniers types cellulaires qui seraient à l'origine des ostéoclastes. Dans cette hypothèse, il n'y a pas de précurseur ostéoclastique CFU-O.

sie médullaire caractérisée par un déficit sanguin en érythrocytes, granulocytes, monocytes et en plaquettes, le nombre d'ostéoclastes n'est pas réduit. Pour cet auteur, ces résultats révèlent une bifurcation très précoce du lignage ostéoclastique par rapport aux lignages myéloïdes, avant même le stade CFU-GEMM (figure 2).

Selon d'autres auteurs, des colonies CFU-GM pures cultivées en milieu semi-solide ne pourraient pas donner

de colonies d'ostéoclastes [7, 8]. En conséquence, les précurseurs ostéoclastiques dériveraient avant ce stade. Il est vraisemblable que, dans ce type d'expérience, les conditions de culture utilisées n'étaient pas propices au développement des précurseurs ostéoclastiques. Nous verrons plus tard que les résultats obtenus chez la souris par délétion du gène codant pour le facteur de transcription PU.1 infirment ces conclusions.

• **Deuxième hypothèse : les granulocytes, les monocytes et les ostéoclastes dérivent d'un précurseur commun, la CFU-GMO**

Des cellules de moelle osseuse humaine, enrichies en précurseurs hématopoïétiques CD34⁺, ont été cultivées en milieu semi-solide, en présence de GM-CSF, afin d'obtenir des colonies dérivées de CFU-GM. Les colonies ont ensuite été traitées par la vitamine D3 et, après deux semaines de culture, plusieurs types de colonies sont apparus composés de granulocytes, de macrophages, ou d'ostéoclastes. Ces auteurs concluent que les monocytes/macrophages, les granulocytes et les ostéoclastes ont un précurseur commun, appelé CFU-GMO, sensible au GM-CSF.

Chambers *et al.* (Londres, GB) [9] ont utilisé les souris transgéniques *H-2K^btsA58* pour développer des lignées cellulaires thermosensibles à partir de moelle osseuse. Ils ont ainsi établi plusieurs lignées de préostéoclastes potentiels. La formation d'ostéoclastes fonctionnels dépend de la présence de cellules stromales et de vitamine D3 ajoutée. La caractérisation de leurs lignées leur a permis de conclure qu'ils avaient immortalisé un précurseur commun aux macrophages et ostéoclastes et que les macrophages et les ostéoclastes divergent à une étape tardive. Cependant, leurs résultats n'excluent pas la possibilité que les précurseurs se différencient d'abord en macrophages, dont une certaine proportion donnera ultérieurement les ostéoclastes.

Enfin, plusieurs auteurs ont rapporté l'impossibilité d'obtenir des ostéoclastes directement à partir de monocytes et de macrophages dans divers systèmes *in vitro* [10-14]. Ces cellules seraient à un stade trop avancé dans la voie de différenciation monocyte-macrophage pour pouvoir donner des ostéoclastes.

• **Troisième hypothèse : les ostéoclastes dérivent de précurseurs monocytaires, de monocytes ou de macrophages**

Les nombreuses similitudes entre les monocytes-macrophages et les ostéoclastes suggèrent cependant une relation très étroite entre ces deux types cellulaires. Les monocytes-macrophages sont souvent mis en évidence

à proximité des sites de résorption et ils partagent des caractéristiques communes avec les ostéoclastes, telles que la mobilité et la présence d'une membrane ondulante. Les macrophages, comme les ostéoclastes, sont des cellules phagocytaires qui possèdent de nombreux lysosomes et mitochondries. Certains macrophages sont aussi capables de résorber en partie la matrice osseuse *in vitro*. Par ailleurs, les monocytes présentent une réponse chimiotactique à certains composants de la matrice osseuse [15].

Mise en évidence d'antigènes communs aux macrophages et aux ostéoclastes

Des antigènes communs entre les ostéoclastes et les monocytes-macrophages ont été mis en évidence dans différentes espèces, notamment chez l'homme, le lapin, le rat et le poulet [16-18]. Nijweide *et al.* (Amsterdam, Pays-Bas) [19] et Oursler *et al.* (Minneapolis, MN, USA) [20] ont immunisé des souris avec des ostéoclastes de caille ou de poulet, et ont isolé des anticorps qui reconnaissent les ostéoclastes, mais aussi les cellules du lignage monocyttaire. Oursler *et al.* [20] ont notamment produit un anticorps monoclonal qui reconnaît à la fois, les ostéoclastes, les monocytes en culture et les cellules géantes dérivées de monocytes. Deux des anticorps isolés par Nijweide reconnaissent des déterminants antigéniques présents sur trois types de cellules différenciées: les ostéoclastes, les cellules de Küpffer et les macrophages intestinaux. Par ailleurs, ces antigènes sont absents dans les stades de différenciation plus précoces du lignage monocyttaire, suggérant la possibilité d'une origine commune aux macrophages tissulaires et aux ostéoclastes.

Les préostéoclastes expriment des marqueurs du lignage monocyttaire Takahashi *et al.* (Tokyo, Japon) [21] ont analysé au cours du temps la synthèse de marqueurs spécifiques associés aux macrophages, dans des co-cultures de cellules spléniques et ostéoblastiques murines, conduisant à la formation d'ostéoclastes fonctionnels. Leurs résultats mettent en évidence des cellules mononucléées, présentant des caractéristiques à la

fois des macrophages et des ostéoclastes, qui apparaissent après ajout d'hydroxyurée et de vitamine D₃ et dont le nombre diminue ensuite de façon corrélée à l'apparition d'ostéoclastes multinucléés. Ainsi, les précurseurs ostéoclastiques postmitotiques seraient des cellules mononucléées exprimant un phénotype macrophagique qui disparaîtrait au cours de leur différenciation en ostéoclastes.

Les cellules mûres du lignage monocyttaire se différencient en ostéoclastes

Sur la base des similitudes antigéniques entre les monocytes-macrophages et les ostéoclastes, quelques auteurs ont testé l'hypothèse d'une filiation directe entre ces deux types cellulaires.

Les arguments les plus décisifs ont été apportés par Udagawa *et al.* (Tokyo, Japon) [22] dont les travaux ont montré la formation d'ostéoclastes *in vitro*, en présence de cellules stromales, de vitamine D₃ et de glucocorticoïde, non seulement à partir de cellules immatures de la lignée monocyte-macrophage, mais aussi à partir de monocytes circulants et de macrophages tissulaires. L'obtention d'ostéoclastes à partir de monocytes de sang de cordon a également été décrite chez l'homme [23]. En outre, nous avons montré, en accord avec les résultats rapportés par Alvarez *et al.* (Saint-Louis, MO, USA) [24], que des macrophages dérivés de monocytes de sang circulant de poulet peuvent se différencier en cellules géantes de type ostéoclaste [25]. Ces résultats montrent que les ostéoclastes peuvent être directement obtenus à partir de monocytes et de macrophages mûrs, dans un micro-environnement approprié.

Nous allons voir que les résultats de l'analyse de souris mutantes atteintes d'ostéopétrose vont à l'appui de cette dernière hypothèse.

Origine des ostéoclastes: approches *in vivo*

Les modèles de différenciation proposés pour la voie ostéoclastique sont essentiellement basés sur des résultats obtenus *in vitro*. Il faut rappeler ici deux problèmes majeurs liés aux systèmes de culture *in vitro*. Tout

d'abord, les conditions de culture sont déterminantes pour l'expression des potentialités de différenciation d'une cellule. Par ailleurs, les critères utilisés pour identifier les ostéoclastes ne sont pas unanimement acceptés par les auteurs. Ainsi, la divergence des différents modèles proposés concernant l'origine des ostéoclastes est en grande partie inhérente à la diversité des systèmes de culture employés et à l'ambiguïté qui réside dans la définition des ostéoclastes.

Les modèles animaux permettent d'appréhender l'origine des ostéoclastes *in vivo* et donc de pallier en partie ces problèmes.

Les modèles murins d'ostéopétrose

Les résultats apportés par l'analyse des mutants murins manifestant une ostéopétrose apportent aussi la confirmation d'une relation très étroite entre les lignages macrophagiques et ostéoclastiques.

• Les mutants *Op/Op*

Le phénotype *Op/Op* se caractérise par des os anormalement denses et un nombre réduit de macrophages. La perturbation de la résorption osseuse est due à l'absence d'ostéoclastes [26, 27]. Les souris exprimant ce phénotype sont homozygotes pour une mutation ponctuelle du gène codant pour le M-CSF et ne produisent pas d'activité M-CSF décelable (*m/s n° 8, vol. 6, p. 825*) [26, 28, 29]. L'injection intraveineuse de M-CSF aux souris *Op/Op* induit la réapparition des macrophages et des ostéoclastes, et la disparition du phénotype ostéopétrotique [26, 30]. Cette observation montre sans ambiguïté que le facteur de différenciation des macrophages est aussi nécessaire à la formation des ostéoclastes.

En dehors des mutants spontanés comme les souris *Op/Op*, d'autres phénotypes ostéopétrotiques ont été révélés de façon inattendue, suite à la destruction par recombinaison homologue des gènes *c-Src*, *c-Fos* et *PU.1*. La protéine c-Src serait impliquée dans la fonction des ostéoclastes (*m/s n° 5, vol. 7, p. 509*) [31] alors que c-Fos et PU.1 sont les premiers facteurs de transcription identifiés qui jouent un rôle déterminant dans la décision de la cellule de s'engager dans la voie ostéoclastique.

• *Les mutants c-Fos^{-/-}*

Le phénotype le plus marquant de ces souris mutantes consiste en l'apparition d'une ostéopétrose [32-34]. Leurs cellules souches hématopoïétiques peuvent donner toutes les cellules lymphoïdes et myéloïdes à l'exception des ostéoclastes [35]. Par ailleurs, chez les souris mutantes, le nombre de macrophages tissulaires est normal sauf celui des macrophages médullaires dont le nombre est deux fois plus élevé que celui des souris sauvages [36].

Grigoriadis *et al.* (Vienne, Autriche) [35] ont montré que la transplantation de moelle de souris normale chez des souris *c-Fos^{-/-}* guérit l'ostéopétrose. Dans les systèmes de co-culture, les cellules ostéoblastiques de souris *c-Fos^{-/-}* permettent la différenciation de cellules spléniques de souris normales en ostéoclastes. À l'inverse, les cellules spléniques de souris *c-Fos^{-/-}* ne se différencient pas en cellules TRAP⁺, même en présence de cellules ostéoblastiques de souris *c-Fos^{+/+}*. Les cellules spléniques de souris *c-Fos^{-/-}* retrouvent leur potentialité de différenciation après infection des co-cultures par un rétrovirus exprimant le gène *c-Fos*. Le blocage de la différenciation ostéoclastique chez les souris mutantes est donc probablement dû à l'absence d'expression de *c-Fos* dans les précurseurs ostéoclastiques.

On peut conclure que *c-Fos* joue un rôle essentiel dans la différenciation ostéoclastique, et qu'il pourrait contrôler directement la fusion des macrophages en ostéoclastes. L'absence d'expression de *c-Fos* entraînerait ainsi une accumulation de précurseurs monocytaires incapables de fusionner. On ne peut pas toutefois exclure deux autres hypothèses : la protéine Fos pourrait agir, soit indépendamment sur les macrophages et les ostéoclastes en ayant respectivement un effet inhibiteur et activateur de différenciation, soit sur une sous-population de cellules hématopoïétiques à l'origine à la fois des ostéoclastes et des macrophages.

• *Les mutants PU.1^{-/-}*

L'expression du gène du facteur de transcription PU.1 est limitée aux cellules hématopoïétiques. La destruction de ce gène, par recombinaison homologue chez la souris, est létale,

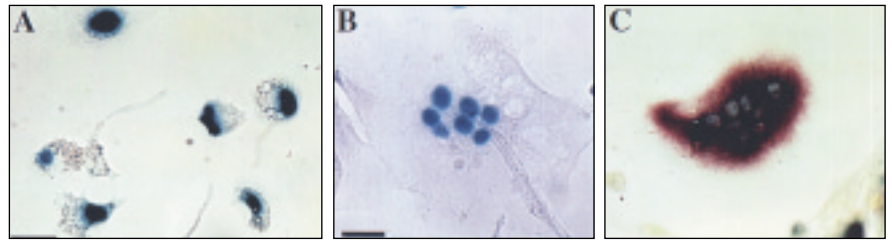


Figure 4. **A. Macrophages à noyaux bleus, dérivés des monocytes de la lignée BM2nlsLacZ. B. Formation in vitro de cellules multinucléées géantes à noyaux bleus après fusion de macrophages de poulet avec des BM2nlsLacZ. C. Formation in vivo d'ostéoclastes à noyaux bleus après injection intraveineuse de BM2nlsLacZ à des embryons de poulet de 10 jours. L'ostéoclaste montre une activité phosphatase acide résistante au tartrate (TRAP) révélée par la coloration brune du cytoplasme.**

les souriceaux mourant de septicémie deux jours après leur naissance [37, 38]. Ces animaux ne possèdent ni macrophages ni ostéoclastes ce qui se traduit par une ostéopétrose sévère (*m/s n° 5, vol. 13, p. 724*). La production de neutrophiles est également affectée, alors que les érythrocytes et les mégacaryocytes sont produits normalement. La greffe de cellules de moelle osseuse de souris aux animaux *PU.1^{-/-}* permet la survie des souris au-delà de six mois et restaure le phénotype ostéopétritique grâce au repeuplement des tissus respectivement en macrophages et en ostéoclastes. Ces résultats indiquent clairement que les macrophages et les ostéoclastes appartiennent à une même voie de différenciation indissociable.

Les cellules d'une lignée monocyttaire aviaire se différencient en ostéoclastes in vivo et in vitro

Afin de montrer que les ostéoclastes dérivent de la fusion des macrophages ou de stades de différenciation intermédiaires entre les monocytes et les macrophages, nous avons utilisé une lignée monocyttaire aviaire (BM2). Les cellules de cette lignée sont capables de se différencier en macrophages soit *in vivo* [39], soit *in vitro* en présence de lipopolysaccharides (LPS) et de TPA (12-O-tétradécanoyl phorbol-13-acétate) [40]. Dans les conditions *in vitro*, Lomri et Baron (New Haven, CN, USA) [41] ont montré que l'expression du gène de l'anhydrase carbonique II des lignées BM2 est faible alors qu'elle est stimulée par l'addition de vita-

mine D3. Ces résultats suggèrent que les lignées BM2, une fois différenciées en macrophages, répondraient de façon appropriée à un signal inducteur de la différenciation ostéoclastique tel que la vitamine D3.

Nous avons suivi, *in vitro* et *in vivo*, le devenir des cellules de lignée BM2 exprimant le gène *nslacZ*. Ce gène code pour la β-galactosidase qui, après sa synthèse dans le cytoplasme, est transférée dans le noyau grâce à la séquence peptidique nls (*figure 4*). Nous avons montré, après injection dans des embryons de poulet, que les cellules *BM2nslacZ* se différencient aussi bien en macrophages dans la moelle osseuse, qu'en ostéoclastes dans l'environnement osseux *in vivo* (*figure 4*) [42]. Les cellules *BM2nslacZ* sont également capables de participer à la formation d'ostéoclastes *in vitro* lorsqu'elles sont co-cultivées avec des macrophages primaires, et induites par le lipopolysaccharide. Ces résultats indiquent que les cellules *BM2nslacZ* doivent franchir une étape supplémentaire de différenciation vers le macrophage pour participer à la formation des ostéoclastes.

En conclusion, les données *in vivo* les plus récentes nous suggèrent que les ostéoclastes proviendraient directement de la fusion des macrophages entre eux dans un micro-environnement osseux approprié. Cependant, aucun élément ne permet d'exclure totalement la possibilité qu'à un stade tardif, existe entre le monocyte et le macrophage une bifurcation permettant d'aboutir, soit aux macrophages, soit à l'ostéoclaste, de façon mutuellement exclusive.

Les ostéoclastes pourraient être des macrophages polycaryoniques spécialisés dans la résorption de l'os

La capacité des macrophages de fusionner entre eux est connue depuis longtemps. En effet, la formation de macrophages polycaryoniques est observée dans des situations pathologiques. Elle est notamment associée à certaines réactions granulomateuses (tumeurs bénignes) induites par divers stimulus et fait partie intégrante de la réponse immunitaire de l'hôte dans les maladies infectieuses chroniques (parasitaires, virales, bactériennes et fongiques). Des granulomes contenant des macrophages polycaryoniques sont communément détectés dans des maladies idiopathiques comme la sarcoïdose, les maladies de Crohn et de Paget [43]. Par ailleurs, des macrophages polycaryoniques qui dérivent des cellules de la microglie ont aussi été mis en évidence dans le cerveau de patients atteints de Sida.

Le processus d'activation des macrophages, dans la réponse à l'inflammation, est associé à deux étapes essentielles : tout d'abord, la migration de ces cellules qui sont attirées par chimiotactisme jusqu'au site inflammatoire, puis leur fusion. Ces deux étapes rappellent le recrutement des précurseurs ostéoclastiques mononucléés à la surface de l'os, qui vont ensuite fusionner pour remplir leur fonction.

Une origine commune pour la formation des macrophages polycaryoniques et des ostéoclastes

Bien que le phénotype des macrophages polycaryoniques soit très semblable à celui des ostéoclastes, de nombreux auteurs considèrent néanmoins que les macrophages polycaryoniques n'ont aucun lien avec les ostéoclastes car ils ne résorbent pas l'os, n'expriment pas de récepteurs de la calcitonine et ne forment pas de membranes plissées. Cependant, des études ont montré que les macrophages polycaryoniques sont responsables de l'ostéolyse maligne associée à certaines tumeurs et seraient donc

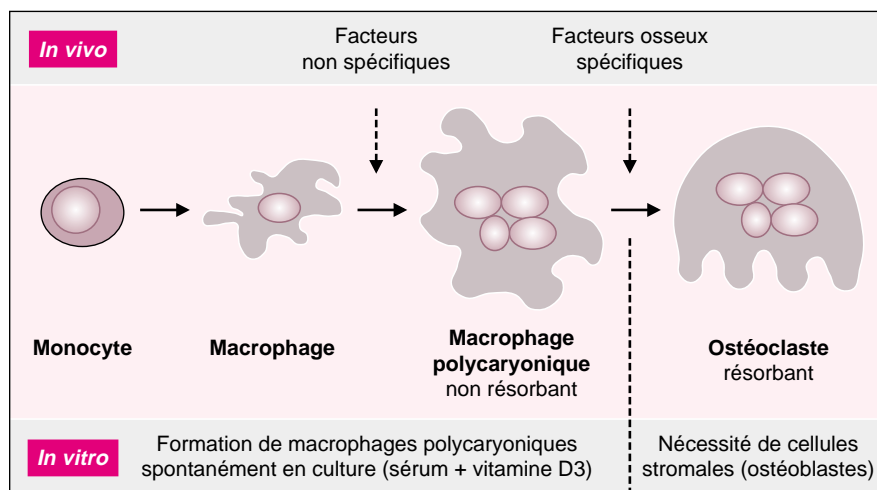


Figure 5. **Schéma hypothétique proposant une relation directe entre macrophages polycaryoniques et ostéoclastes dépendante de facteurs liés au micro-environnement in vivo et in vitro.** Les monocytes sont les cellules trouvées dans la moelle osseuse et le sang. Les macrophages mononucléés sont trouvés dans les tissus, et les ostéoclastes uniquement au niveau de l'os. La formation des ostéoclastes fonctionnels passerait par une étape de fusion de macrophages aboutissant à des polycaryons, identiques à ceux trouvés dans les situations inflammatoires, incapables de résorber l'os. La maturation de ces polycaryons en ostéoclastes capables de résorber l'os dépendrait de facteurs présents dans l'environnement osseux in vivo, ou apportés par les cellules stromales in vitro.

capables de résorber la matrice osseuse [44]. Par ailleurs, l'induction d'une réaction inflammatoire par implantation intramusculaire de particules d'os dans des rats s'accompagne de la formation, à la surface de l'os, d'ostéoclastes présentant une membrane plissée et compétents pour la résorption [45]. Enfin, Vignery *et al.* (New Haven, CN, USA) [46] ont mis en évidence de nombreux récepteurs de la calcitonine fonctionnels à la surface de macrophages polycaryoniques dérivés de cultures de macrophages alvéolaires de rats.

Tong *et al.* (Los Angeles, CA, USA) [47] ont comparé le profil d'expression des gènes, entre des ostéoclastes obtenus à partir de culture de moelle osseuse de souris, et des macrophages polycaryoniques dérivés de cultures de cellules spléniques. Dans leurs conditions de culture les macrophages polycaryoniques ne synthétisent pas les ARNm codant pour la phosphatase TRAP, l'anhydrase carbonique II, le récepteur de la calcitonine et l'ostéopontine (une protéine de la matrice extracellulaire sécrétée notamment par les ostéoclastes), contrairement aux ostéoclastes. Ces

résultats apparaissent contradictoires avec ceux d'Udagawa *et al.* [22] qui ont montré que les cellules multinucléées obtenues à partir de cellules spléniques synthétisent la phosphatase TRAP, le récepteur de la calcitonine, et sont compétentes pour la résorption. Cependant, dans les expériences de Tong, les cellules spléniques ont été cultivées seules, alors que dans les expériences d'Udagawa elles étaient co-cultivées avec des ostéoblastes, en présence de vitamine D₃ et de dexaméthasone.

L'expression du phénotype ostéoclastique *in vitro* dépend donc des conditions de culture plutôt que de l'origine des macrophages polycaryoniques. Les macrophages polycaryoniques et les ostéoclastes correspondraient au même type cellulaire à des étapes de maturation différentes.

Conclusion et perspectives

La formation des macrophages polycaryoniques a d'abord été associée aux réactions inflammatoires chroniques et aux tumeurs, alors que les ostéoclastes se différencient sur l'os qu'ils résorbent. Les résultats rappor-

tés ci-dessus suggèrent que ces deux types cellulaires seraient très proches et que la spécialisation de leur fonction dépendrait essentiellement de leur environnement (figure 5). Nous proposons que les premières étapes conduisant des macrophages aux cellules multinucléées géantes de type polycaryons inflammatoires ou aux ostéoclastes sont identiques et mettent en œuvre des mécanismes communs d'agrégation et de fusion cellulaire. Cette étape se ferait en présence de facteurs liés à l'environnement indépendants de l'os (figure 5). La formation des ostéoclastes nécessiterait une étape de maturation supplémentaire dépendante du tissu osseux.

Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait s'assurer que des macrophages polycaryoniques obtenus *in vitro* à partir de cultures de macrophages sont capables de donner des ostéoclastes résorbant l'os dans des conditions de culture mimant l'environnement osseux, notamment en présence d'ostéoblastes. De même, chez l'animal l'introduction de fragments d'os dans des tissus inflammatoires devrait permettre la maturation des polycaryons en ostéoclastes. Enfin, si notre hypothèse est correcte, la formation des macrophages polycaryoniques inflammatoires devrait être altérée chez les souris déficientes en facteurs de transcription c-Fos ou PU.1 ■

Remerciements

Les auteurs remercient O. Gandrillon et C. Domenget pour la lecture critique de ce manuscrit, ainsi que F. Flamant pour son aide efficace au cours du travail de thèse de F. Solari. F. Solari a été soutenue par l'ARC et la Ligue contre le cancer de l'Yonne. Les travaux du laboratoire mentionnés dans cette revue ont bénéficié du soutien de l'ARC, de la Ligue contre le cancer du Rhône, et de la Ligue nationale contre le cancer.

RÉFÉRENCES

1. Vernejoul M, Marie P. Cellules osseuses et remodelage osseux. *Med Sci* 1993; 9: 1192-203.
2. Jotereau FV, Le Douarin NM. The developmental relationship between osteocytes and osteoclasts: a study using the quail-chick nuclear marker in endochondral ossification. *Dev Biol* 1978; 63: 253-65.
3. Pardanaud L, Yassine F, Dieterlen-Lièvre F. Relationship between vasculogenesis, angiogenesis and hemopoiesis during avian ontogeny. *Development* 1989; 105: 473-85.
4. Cowling GJ, Dexter TM. Erythropoietin and myeloid colony stimulating factors. *Tib Tech* 1992; 10: 349-57.
5. Gordon S. The macrophage. *Bioessays* 1995; 17: 977-86.
6. Flanagan AM. The osteoclast, which derive from a haemopoietic stem cell, is not depleted in aplastic anaemia. *J Pathol* 1990; 164: 261-3.
7. Hattersley G, Kerby JA, Chambers TJ. Identification of osteoclast precursors in multilineage hemopoietic colonies. *Endocrinology* 1991; 128: 259-62.
8. Hattersley G, Owens J, Flanagan AM, Chambers TJ. Macrophage colony stimulating factor (M-CSF) is essential for osteoclasts formation *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 177: 526-31.
9. Chambers TJ, Owens JM, Hattersley G, Jat PS, Noble MD. Generation of osteoclast-inductive and osteoclastogenic cell lines from the H-2KbtsA58 transgenic mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 5578-82.
10. Burger EH, Van Der Meer JWM, Van De Gevel JS, Gribnau JC, Thesingh CW, Van Furth R. *In vitro* formation of osteoclasts from long term cultures of bone marrow mononuclear phagocytes. *J Exp Med* 1982; 156: 1604-14.
11. Schneider GB, Relfson M. A bone marrow fraction enriched for granulocyte-macrophage progenitors gives rise to osteoclasts *in vitro*. *Bone* 1988; 9: 303-8.
12. Kerby JA, Hattersley G, Collins DA, Chambers TJ. Derivation of osteoclasts from hematopoietic colony-forming cells in culture. *J Bone Min Res* 1992; 7: 353-62.
13. De Grooth R, Mieremet RHP, Kawilarang-De Hass EWN, Nijweide PJ. Murine macrophage precursor cell line are unable to differentiate into osteoclasts: a possible implication for osteoclast ontogeny. *Int J Exp Path* 1994; 75: 265-75.
14. Van't Hof RJ, Tuinenburg-Bol Raap AC, Nijweide PJ. Induction of osteoclast characteristics in cultured avian blood monocytes; modulation by osteoblasts and 1,25-(OH)₂ vitamin D₃. *Int J Exp Path* 1995; 76: 205-14.
15. Marks SC, Popoff S. Bone cell biology: the regulation of development, structure, and function in the skeleton. *Am J Anat* 1988; 183: 1-44.
16. Athanasou NA, Quinn J. Immunophenotypic differences between osteoclasts and macrophage polykaryons: immunohistological distinction and implications for osteoclast ontogeny and function. *J Clin Pathol* 1990; 43: 997-1003.
17. Athanasou NA, Alvarez JI, Ross FP, Quinn JM, Teitelbaum SL. Species differences in the immunophenotype of osteoclasts and mononuclear phagocytes. *Calcif Tissue Int* 1992; 50: 427-32.
18. Siminia T, Dijkstra CD. The origin of osteoclasts: an immunohistochemical study on macrophages and osteoclasts in embryonic rat bone. *Calcif Tissue Int* 1986; 39: 263-6.
19. Nijweide PJ, Vrijheid-Lammers T, Mulder RJP, Blok J. Cell surface antigens on osteoclasts and related cells in the quail studied with monoclonal antibodies. *Histochemistry* 1985; 83: 315-24.
20. Oursler MJ, Bell LV, Clevinger B, Osdoby P. Identification of osteoclast-specific monoclonal antibodies. *J Cell Biol* 1985; 100: 1592-600.
21. Takahashi N, Udagawa N, Tanaka S, Murakami H, Owari I, Tamura T, Suda T. Postmitotic osteoclast precursors are mononuclear cells which express macrophage-associated phenotype. *Dev Biol* 1994; 163: 212-21.
22. Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, Tanaka H, Sasaki T, Nishihara T, Koga T, Martin TJ, Suda T. Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 7260-4.
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.
24. Alvarez JI, Ross FP, Athanasou NA, Blair HC, Greenfield EM, Teitelbaum SL. Osteoclast precursors circulate in avian blood. *Calcif Tissue Int* 1992; 51: 48-53.
25. Woods C, Domenget C, Solari F, Gandrillon O, Lazarides E, Jurdic P. Antagonistic role of vitamin D₃ and retinoic acid on the differentiation of chicken hematopoietic macrophages into osteoclast precursor cells. *Endocrinology* 1995; 136: 85-95.
26. Felix R, Cecchini MC, Fleisch H. Macrophage colony-stimulating factor restores *in vivo* bone resorption in the *op/op* osteopetrotic mouse. *Endocrinology* 1990; 127: 2592-4.
27. Cecchini MG, Dominguez MG, Mocci S, Wetterwald A, Felix R, Fleisch H, Chisholm O, Hofstetter W, Pollard JW, Stanley ER. Role of colony-stimulating factor in the establishment and regulation of tissue macrophages during postnatal development of the mouse. *Development* 1994; 120: 1357-72.
28. Yoshida H, Hayashi SI, Kunisada T, Ogawa M, Nishikawa S, Okamura H, Sudo T, Shultz LD, Nishikawa SI. The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature* 1990; 345: 442-3.

TIRÉS A PART

P. Jurdic.

RÉFÉRENCES

29. Wiktor-Jedrzejczak W, Bartocci A, Ferrante AW, Ahmed-Ansari A, Sell KW, Pollard JW, Stanley ER. Total absence of colony stimulating factor-1 in the macrophages-deficient osteopetrotic (*op/op*) mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 4828-32.
30. Kodama H, Yamasaki A, Nose M, Niida S, Ohgame Y, Abe M, Kumegawa M, Suda T. Congenital osteoclast deficiency in osteopetrotic (*op/op*) mice is cured by injections of macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 1991; 173: 269-72.
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.
32. Johnson RS, Spiegelman BM, Papaioannou V. Pleiotropic effects of a null mutation in the *c-Fos* proto-oncogene. *Cell* 1992; 71: 577-86.
33. Wang ZQ, Ovitt C, Grigoriadis AE, Möhle-Steinlein U, Rütger U, Wagner EF. Bone and haematopoietic defects in mice lacking c-Fos. *Nature* 1992; 360: 741-5.
34. Saint-Arnaud R. Fonction osseuse: *fos* et les autres. *Med Sci* 1993; 9: 1243-6.
35. Grigoriadis AE, Wang ZQ, Cecchini MG, Hofstetter W, Felix R, Fleisch HA, Wagner EF. c-Fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling. *Science* 1994; 266: 443-8.
36. Grigoriadis AE, Wang Z, Wagner EF. Fos and bone cell development: lessons from a nuclear oncogene. *Trends Genet* 1995; 11: 436-41.
37. McKercher SR, Torbett BE, Anderson KL, Henkel GW, Vestal DJ, Baribault H, Klemsz M, Feeney AJ, Wu GE, Paige CJ, Maki RA. Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *EMBO J* 1996; 15: 5647-58.
38. Tondravi MM, McKercher SR, Anderson K, Erdmann JM, Quiroz M, Maki R, Teitelbaum SL. Osteopetrosis in mice lacking hematopoietic transcription factor PU.1. *Nature* 1997; 386: 81-4.
39. Bagnis C, Cosset FL, Samarut J, Moscovici G, Moscovici C. Leukemogenicity of v-Myb-transformed monoblasts cells can be modulated by normal bone marrow environment. *Oncogene* 1993; 8: 737-43.
40. Symonds G, Klemmner KH, Evan GI, Bishop JM. Induced differentiation of avian myeloblastosis virus-transformed myeloblast: phenotypic alteration without altered expression of the viral oncogene. *Mol Cell Biol* 1984; 4: 2587-93.
41. Lomri A, Baron R. 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 regulates the transcription of carbonic anhydrase II mRNA in avian myelomonocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 4688-92.
42. Solari F, Flamant F, Chérel Y, Wyers M, Jurdic P. The osteoclast generation: an *in vitro* and *in vivo* study with a genetically labelled avian monocytic cell line. *J Cell Sci* 1996; 109: 1203-13.
43. Chambers TJ. Multinucleated giant cells. *J Pathol* 1978; 126: 125-48.
44. Quinn JMW, Matsumura Y, Tarin D, McGee JO, Athanasou NA. Cellular and hormonal mechanism associated with malignant bone resorption. *Lab Invest* 1994; 71: 465-71.
45. Saginario C, Qian HY, Vignery A. Identification of an inducible surface molecule specific to fusing macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 12210-4.
46. Vignery A, Raymond MJ, Qian HJ, Wang F, Rosenzweig SA. Multinucleated rat alveolar macrophages express functional receptors for calcitonin. *Am J Physiol* 1991; 261: F1026-32.
47. Tong HS, Sakai DD, Sims SM, Dixon J, Yamin M, Goldring SR, Snead ML, Minkin C. Murine osteoclasts and spleen cell polykaryons are distinguished by mRNA phenotyping. *J Bone Miner Res* 1994; 9: 577-84.

Summary

New concepts on osteoclast origin: relationship with normal and inflammatory macrophages

Osteoclasts are bone resorbing multinucleated giant cells. They derive from the fusion of hemopoietic mononucleated precursor cells, although their precise origin along the hemopoietic differentiation pathway is still a matter of discussion. Recent data obtained both *in vivo* and *in vitro* sustain the idea that osteoclasts derive from fusion of cells at the late stages of the monocytic pathway, or even directly from macrophages. Osteoclasts, as well as macrophages, are phagocytic cells sharing in common many surface antigens. *In vitro* models have been developed enabling formation of osteoclasts directly from resident tissue macrophages. Furthermore, analysis of osteopetrotic mice, obtained from either spontaneous mutations or after homologous recombinations, have shown that macrophages and osteoclasts are closely related. Finally, osteoclasts appear also to be highly related to polycaryonic macrophages found in inflammatory tissues. Here, we propose that only one way of differentiation leads from monocytes/macrophages to either inflammatory polycaryonic macrophages or bone resorbing osteoclasts, the final commitment depending upon microenvironment conditions.

7^e Salon Franco-Israélien de Médecine et de Technologie Médicale

6 - 7 - 8 décembre 1997 - Maison France Israël - Paris

Inauguration le 6 décembre 1997 à 21 h 30

Thème LE PROGRÈS
Évolution et avancées des connaissances médicales

Organisé par l'AMIF (participation des pharmaciens et dentistes)

Pour renseignements et participation aux Tables rondes - tél. : 01 49 10 09 10