

Université de Sherbrooke

Étude de l'expression et de l'activation cellulaire du facteur nucléaire des lymphocytes T activés, cytoplasmique 1 (NFATc1) dans les ostéoclastes pagétiques.

Par
Stéphanie Boulay-Jean
Département de médecine / division rhumatologie
(Programme à la maîtrise en pharmacologie)

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)
en pharmacologie

Sherbrooke, Québec, Canada
Décembre, 2013

Mémoire évalué par :
Pr. Guillaume Grenier, Département de chirurgie, Service de chirurgie orthopédique
Pre. Nathalie Perreault, Département d'anatomie et de biologie cellulaire
Pre. Sophie Roux, Département de médecine, Service de rhumatologie



Library and Archives
Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-499-00377-5

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-499-00377-5

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

Canada

Étude de l'expression et de l'activation cellulaire du facteur nucléaire des lymphocytes T activés, cytoplasmique 1 (NFATc1) dans les ostéoclastes pagétiques.

Par
Stéphanie Boulay-Jean
Département de médecine, Service de rhumatologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du diplôme de maître ès sciences (M.Sc.) en pharmacologie
Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke,
Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Résumé

Les ostéoclastes (OCs) sont responsables de la résorption de l'os normal. La différenciation, la maturation et la survie de ces cellules sont principalement stimulées par RANKL. Ces phénomènes se produisent dans les suites de l'interaction de RANKL avec son récepteur RANK situé à la surface de l'OC, via la transduction de signaux intracellulaires conduisant à l'activation de différentes cascades de signalisation. Les principaux facteurs de transcription induits par cette signalisation sont NF- κ B et NFATc1, qui modulent l'expression de gènes d'importance majeure pour le bon fonctionnement des OCs. Dans la maladie de Paget, caractérisée par une augmentation multifocale du remodelage osseux avec hyperrésorption osseuse, les OCs ont une morphologie anormale, ils sont résistants à l'apoptose et leur activité est augmentée. Des mutations du gène codant pour la protéine p62 (séquestosome 1) ont été décrites dans cette maladie, identifiant p62 comme un facteur important de la signalisation de l'OC. Des travaux de notre laboratoire ont montré une augmentation de l'activation de NF- κ B induite par RANKL dans les OCs pagétiques, avec même une activité constitutive de NF- κ B en présence de la mutation *p62* p.P392L. Notre étude a évalué l'expression et l'activation de NFATc1, et le rôle de PKC ζ dans la signalisation NFATc1, cette kinase appartenant au complexe de signalisation TRAF6/p62 induit par RANKL. En culture primaire, des monocytes de sang périphérique de patients pagétiques et de contrôles (tous génotypés pour la mutation *p62*) ont été différenciés en OCs matures en présence de RANKL et M-CSF. Nous avons évalué l'effet de RANKL sur l'activation de NFATc1 (translocation nucléaire évaluée par immunofluorescence), en présence ou non d'un inhibiteur de PKC ζ , ainsi que l'expression protéique (immunobuvardage) et ARNm (RT-PCR quantitative). Nous avons observé que RANKL stimulait l'activation de NFATc1 dans les OCs pagétiques, porteurs ou non de la mutation *p62* p.P392L, et que PKC ζ intervenait dans cette signalisation. Dans un modèle de différenciation OC à partir de monocytes fœtaux, nous avons par ailleurs mis au point l'étude de l'activation de NFATc1 par essai luciférase, et les conditions optimales pour évaluer son expression protéique et génique. Nos résultats démontrent pour la première fois dans des OCs humains que RANKL stimule l'activation et l'expression de NFATc1, et que l'activation de NFATc1 est augmentée dans les OCs pagétiques. De manière tout à fait originale, nous montrons également que la PKC ζ contribue à l'activation de NFATc1.

Mots-clés : Ostéoclaste, NFATc1, Résorption, Protéine p62, Maladie de Paget, PKC ζ

TABLE DES MATIÈRES

Liste des TABLEAUX.....	VI
Liste des FIGURES.....	VII
I- INTRODUCTION.....	1
1. TISSU OSSEUX.....	1
1.1 L'os et ses fonctions.....	1
1.2 Classification et structure des os	1
1.3 Composantes de l'os.....	3
2. LE REMODELAGE OSSEUX.....	3
2.1 Unités de remodelage osseux à l'échelon cellulaire.....	4
2.2 Régulation du remodelage osseux	5
2.3 Système de régulation RANKL, RANK, OPG.....	5
3. LES CELLULES OSSEUSES.....	6
3.1 L'ostéoblaste	6
3.1.1 Différenciation des ostéoblastes	6
3.1.2 Fonctions de l'ostéoblaste	6
3.2 L'ostéocyte.....	7
3.3 L'ostéoclaste	8
3.3.1 Structure de l'ostéoclaste.....	8
3.3.2 L'ostéoclastogénèse.....	8
3.3.3 Fonction de l'ostéoclaste	10
3.3.4 La signalisation RANKL/RANK dans l'ostéoclaste	12
4. EMPHASE SUR 3 PROTÉINES D'INTÉRÊT DE LA SIGNALISATION RANKL/RANK	14
4.1 La protéine p62 (séquestosome 1).....	14
4.2. La protéine kinase C zêta (PKC ζ).....	15
4.3. NFATc1	17
5. LA MALADIE OSSEUSE DE PAGET	21
5.1 Généralités et épidémiologie de la maladie de Paget	21
5.2 Particularités des ostéoclastes dans la maladie de Paget.....	23
5.3 Effets des mutations de p62 sur les cellules osseuses de maladie de Paget	24
6- HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DU PROJET	25

II- MATÉRIEL ET MÉTHODES	26
1. Réactifs utilisés	26
2. Cultures cellulaires de cellules sanguines	26
2.1 Monocytes de sang périphérique	26
2.2 Monocytes de sang de cordon	27
2.3 Recueil des cellules	27
2.4 Culture cellulaire en milieu méthylcellulose	28
2.5 Congélation des cellules	29
2.6 Extraction du milieu semi-solide MethoCult®	29
3. Cultures cellulaires	30
3.1 Cultures des PBMCs	30
3.2 Cultures des CBMs	30
4. Fixation des cellules	31
5. Immunofluorescence (IF)	31
6. Microscopie à Fluorescence	32
7. Transfert et immunodétection des protéines	33
7.1 Extraction protéique des cellules en culture	33
7.2 Dosage des protéines	33
7.3. Immunobuvardages	34
7.4 Restauration de la membrane	36
8. Analyse par PCR quantitative	36
8.1 Extraction de l'ARN des cellules en culture	36
8.2 Transcription inverse (RT-PCR)	36
8.3 Analyse par PCR en temps réel	36
9. Essai luciférase	38
9.1 Transfection des cellules	38
9.2 Infection par lentivirus	38
10. Analyse statistique	39

III- RÉSULTATS.....	40
1. Effets de RANKL sur l'expression nucléaire de NFATc1 dans les OCs provenant de sujets contrôles ou pagétiques.....	40
1.1 Immunolocalisation de NFATc1 dans les OCs pagétiques <i>versus</i> contrôles	40
1.2 Impact de la mutation <i>p62 p.P392L</i> sur l'activation de NFATc1	43
2. Effet de RANKL sur l'expression protéique de NFATc1 dans les ostéoclastes provenant de sujets contrôles ou pagétiques.....	45
3. Expression génique de NFATc1 dans les OCs dérivés de CBMs : effet de RANKL	48
3.1- Expression génique de NFATc1 selon le temps de stimulation par RANKL	48
3.2- Expression génique de NFATc1 selon la concentration de RANKL	49
3.3 Effet de RANKL sur l'expression génique de MMP-9	50
4. Effet de RANKL sur l'expression protéique de NFATc1 dans les ostéoclastes dérivés de CBMs	
4.1 Expression protéique de NFATc1 selon le temps de stimulation	52
4.2- Expression protéique de NFATc1 selon la concentration de RANKL.....	53
4.3- Conclusion sur l'expression protéique de NFATc1	56
5. Effet de RANKL sur l'activité de NFATc1 et NF- κ B dans les ostéoclastes dérivés de CBMs	
5.1 Effet de RANKL sur l'activité de NF- κ B.....	56
5.2 Effet de RANKL sur l'activité de NFATc1	57
5.3- Effet de RANKL sur l'activité de NFATc1 mesurée par essai luciférase dans des ostéoclastes exprimant les variants de <i>p62</i>	59
IV- DISCUSSION.....	62
ÉTUDE DES EFFETS DE RANKL SUR L'ACTIVATION ET L'EXPRESSION DE NFATC1 DANS LES OSTÉOCLASTES HUMAINS	62
MALADIE DE PAGET ET IMPACT DE LA MUTATION <i>p62 p.P392L</i>	65
RÔLE DE LA PROTÉINE KINASE C ζ DANS L'ACTIVATION ET L'EXPRESSION DE NFATC1	68
V- CONCLUSION.....	70
VI- PERSPECTIVES	71
VII- REMERCIEMENTS	72
VIII- RÉFÉRENCES	73

Liste des TABLEAUX

Tableau 1 : Distribution géographique de la maladie osseuse de Paget.....	21
Tableau 2 : Anticorps utilisés en IF ainsi que leur dilution	32
Tableau 3 : Anticorps utilisés en immunobuvardage ainsi que leur dilution	34
Tableau 4 : Amorces utilisées pour la PCR en temps réel	37

Liste des FIGURES

Figure 1. Structure détaillée de l'os long.....	2
Figure 2: Cycle du remodelage osseux.....	4
Figure 3. Différenciation des ostéoblastes.....	7
Figure 4. Différenciation de l'ostéoclaste et médiateurs essentiels.....	9
Figure 5. Mécanisme de résorption osseuse par l'OC mature.....	11
Figure 6. Signalisation RANK/RANKL dans l'OC.....	13
Figure 7. Les domaines de liaison de la protéine p62 cytosolique.....	15
Figure 8. Structure des protéines kinases atypiques (PKCa).....	16
Figure 9. Isoformes de NFATc1 (NFAT2).....	17
Figure 10. Signalisation intracellulaire impliquant l'activation de NFATc1 dans l'OC.....	20
Figure 11. Ostéoclastes pagétiques.....	23
Figure 12. Mutations retrouvées dans le domaine UBA de p62.....	24
Figure 13. Isolement de monocytes de sang humain par gradient de densité.....	27
Figure 14. Image de la mise en culture dans le MethoCult®.....	29
Figure 15. Plaque de 8 puits (lab-tek®) utilisée pour la culture d'ostéoclastes.....	30
Figure 16. Culture in vitro de CBMs et différentes stimulations par RANKL.....	31
Figure 17. Dosage de protéine dans des plaques 96 puits.....	34
Figure 18. Fonctionnement du SYBR green en Q-PCR.....	37
Figure 19. Expression de NFATc1 dans les OCs : étude en IF.....	40
Figure 20. Effet de RANKL sur l'expression nucléaire de NFATc1 : Comparaison des OCs pagétiques et contrôles.....	41
Figure 21. Effet de RANKL sur l'expression nucléaire de NFATc1 : Impact de la mutation <i>p62</i> <i>p.P392L</i>	43
Figure 22. Étude par immunoblot de NFATc1 dans les OCs.....	46
Figure 23. Effet de RANKL sur l'expression protéique de NFATc1 dans les OCs.....	47
Figure 24. Expression relative de l'ARNm de NFATc1, après stimulation par RANKL pendant différents temps.....	48
Figure 25. Expression relative de l'ARNm de NFATc1, après stimulation par RANKL à différentes concentrations.....	49
Figure 26. Expression relative de l'ARNm de MMP-9, après stimulation par RANKL à différents temps.....	50
Figure 27. Expression relative de l'ARNm de MMP-9, après stimulation par RANKL à différentes concentrations.....	51
Figure 28. Effet de RANKL sur l'expression protéique NFATc1 selon la durée d'exposition.....	53
Figure 29. Effet de RANKL sur l'expression protéique de NFATc1 selon la concentration.....	54
Figure 30. Effet de RANKL sur l'expression protéique de NFATc1 après double stimulation.....	55
Figure 31. Effet de RANKL sur l'activité de NF- κ B.....	57
Figure 32. Effet de RANKL sur l'activité de NFATc1 dans les OCs : étude à différents temps de stimulation.....	58
Figure 33. Culture d'OCs, différenciés à partir de CBM, et infectés par lentivirus exprimant GFP (Green Fluorescent Protein).....	60
Figure 34. Effet de RANKL sur l'activité de NFATc1 dans les OCs exprimant les variants de <i>p62</i>	61

Liste des abréviations

ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
Akt	Protéine kinase B
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BMP	Bone morphogenetic protein
BMU	Unité multicellulaire de base (<i>Basic multicellular unit</i>)
BSA	Bovine serum albumine
BSP	Bone Sialoprotein
CBM	Monocytes foetaux (<i>Cord blood monocyte</i>)
CFU-M	Macrophage Colony-Forming Unit
CFU-GM	Granulocyte-Macrophage Colony-Forming Unit
Ca ²⁺	Calcium
CO ₂	Dioxyde de carbone
CATK	Cathepsine K
CTR	Récepteur de la calcitonine
DKK	Dickkopfs
EV	Vecteur vide (<i>Empty vector</i>)
FBS	Fetal bovine serum
FGF	Fibroblast growth factor
g	Gramme
GFP	Green Fluorescent Protein
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GSK3 β	Glycogen synthase kinase 3 β
h	Heure
IF	Immunofluorescence
IKK	Inhibitor of kappa B Kinase
JNK	c-Jun N-terminal kinases
kDa	KiloDalton
LRP-5	lipoprotein receptor-related proteins 5
mA	Milliampère
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
M-CSF	Macrophage colony stimulating factor
MITF	Microphthalmia-associated transcription factor
ml	Millilitre
mm	Millimètre
MMP-9	Métalloprotéase matricelle-9
NaOH	Hydroxyde de sodium
Na ₄ PP	Tétrasodium pyrophosphate
NaVO ₄	Sodium Orthovanadate
NH ₄ Cl	Ammonium chloride
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NFATc1	Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1
NF- κ B	Nuclear Factor κ B
NT	Non traité
OC	Ostéoclaste

OB	Ostéoblaste
OPG	Ostéoprotégérine
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Polymerase chaine reaction
PKC ζ	Protéine kinase C zêta
PSF	Pénicilline, streptomycine et antifongique
PTH	Parathormone
PVDF	Polyvinylidene fluoride
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chaine reaction
RANK	Receptor Activator of Nuclear Factor κ B
RANKL	Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
RPM	Révolution par minute
SDS-PAGE	sodium dodécyl sulfate de polyacrylamide électrophorèse sur gel
Sost	Sclérostine
TBS	Tris buffer salin
TGF- β	Transforming growth factor-beta
TNF	Tumor necrosis factor
TNF- α	Tumor Necrosis Factor alpha
TRAF6	TNF receptor associated factor 6
TRAP	Tartrate-Resistant Acid Phosphatase
μ g	Microgramme
μ l	Microlitre
WNT	β -catenin signaling pathway

I- INTRODUCTION

1. TISSU OSSEUX

1.1 L'os et ses fonctions

Les os sont des organes très importants pour les mammifères vertébrés, de par plusieurs de leurs rôles indispensables à la vie. Le premier rôle du squelette est un rôle de soutien; l'os sert de structure rigide afin de supporter notre corps et sert d'ancrage à certains tissus mous. Le squelette exerce aussi un rôle de protection des organes vitaux (ex : le cerveau est protégé par le crâne). La deuxième fonction des os est le mouvement; le déplacement s'effectue grâce à l'agencement des os, des muscles squelettiques, des tendons, des ligaments et des articulations qui fonctionnent ensemble (par transfert de forces). Le troisième rôle de l'os est sa propriété de contenir des minéraux, en particulier le calcium et le phosphore (sous forme de cristaux d'hydroxyapatite). Ces minéraux peuvent être libérés dans la circulation sanguine sous forme d'ions et participer au métabolisme phosphocalcique. De façon continue, ces minéraux sont déposés dans la matrice osseuse ou en sont retirés. La quatrième fonction est de contenir la moelle osseuse, lieu de formation des cellules sanguines, ou hématopoïèse, dans l'os trabéculaire et la cavité médullaire de certains os. La matrice osseuse est également un réservoir de facteurs de croissance et de cytokines (CLARKE, 2008).

1.2 Classification et structure des os

Les os sont classés selon leur forme et leur taille; on retrouve les os longs (ex : fémur), courts (ex: les os du carpe, situés dans le poignet), plats (ex : crâne) et irréguliers (ex : vertèbres). Chaque os est composé d'une couche externe dense nommée l'os compact (cortical) et d'une couche interne d'os spongieux (ou trabéculaire) (CLARKE, 2008). L'os spongieux est constitué de travées possédant une structure tridimensionnelle s'apparentant à celle d'un nid d'abeille, et contenant la moelle osseuse (Fig. 1). Les os courts vont être plus ou moins cubiques et ils contiennent surtout de l'os spongieux alors que les os plats sont minces, aplatis et légèrement courbés. Ils ont deux couches fines d'os compact séparées par une couche épaisse d'os spongieux. Les os irréguliers sont de forme complexe et sont composés en majorité d'os spongieux. Les os longs, dont la structure est composée d'un axe longitudinal (la diaphyse) et de deux extrémités (les épiphyses) sont surtout composés d'os cortical (compact). Celui-ci peut paraître dense et solide à l'œil nu, mais au microscope, on observe une multitude

de petits canaux. L'os cortical est en effet constitué d'ostéons formés de lamelles concentriques d'os au centre desquelles se trouve le canal haversien où l'on retrouve les capillaires sanguins et lymphatiques et les fibres nerveuses.

La surface des os est recouverte d'une membrane, nommée le périoste, assurant leur croissance en épaisseur et leur nutrition (Fig. 1). La couche externe de cette membrane contient du tissu conjonctif dense et irrégulier. La couche interne contient principalement des cellules ostéogéniques.

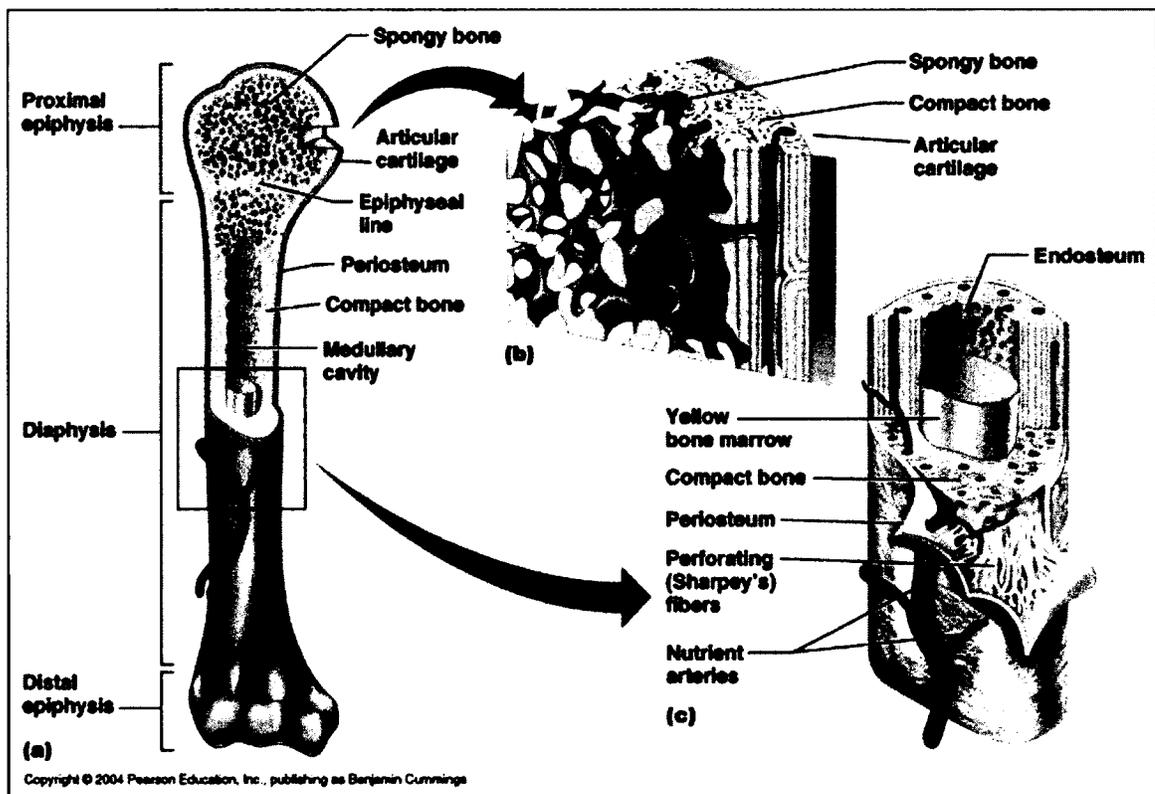


Figure 1. Structure détaillée de l'os long.

(a) Vue d'ensemble d'un os long (intérieur et extérieur). (b) Représentation en trois dimensions de l'os spongieux et compact. (c) Grossissement de la diaphyse et ses différentes couches. (Adapté de *Marieb EN, Anatomie et physiologie humaine, Ed Pearson Education, 2005*)

1.3 Composantes de l'os

Les os sont constitués d'une matrice organique, de composés inorganiques et d'eau. Les constituants organiques représentent 20 à 40% de l'os. Ils comportent une matrice extra-cellulaire et les cellules osseuses (Ostéoblastes (OBs), Ostéocytes et Ostéoclastes (OCs)). La matrice extra-cellulaire (ou tissu ostéoïde) est principalement constituée de fibres de collagène de type 1. On retrouve aussi des protéoglycanes, des glycoprotéines et des protéines globulaires comme l'ostéonectine et l'ostéocalcine. Les substances organiques sont toutes sécrétées par les OBs, lors de la formation osseuse. Ce sont ces substances organiques et surtout le collagène qui déterminent la structure de l'os et lui confèrent sa flexibilité. Par ailleurs, des cytokines et facteurs de croissance se trouvent séquestrés dans la matrice osseuse, tels que TGF- β , IGFs ou FGF. Ces facteurs peuvent être libérés et/ou activés lors de la résorption osseuse et participer aux interactions entre cellules osseuses, et avec le microenvironnement (CLARKE, 2008).

Les composés inorganiques (cristaux d'hydroxyapatite) composent 50 à 70 % de l'os. Il s'agit essentiellement de sels minéraux de calcium et de phosphate ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Ces sels de calcium forment de minuscules cristaux déposés autour des fibres de collagène lors de la minéralisation du tissu ostéoïde. Ces petits cristaux sont serrés les uns contre les autres, ce qui confère à l'os sa dureté et sa rigidité. L'os contient d'autres minéraux tels que le potassium, le magnésium et le sodium, et de 5 à 10 % d'eau (CLARKE, 2008).

2. LE REMODELAGE OSSEUX

Malgré les apparences, le tissu osseux est un tissu vivant et très dynamique. L'os de l'adulte se renouvelle en permanence, le remaniement osseux (ou remodelage) est un processus physiologique réalisé par les cellules osseuses, les OCS responsables de la résorption osseuse, et les OBs responsables de la formation osseuse. Ces deux processus (résorption et formation) sont couplés dans le temps et dans l'espace. Le remodelage de l'os est important dans le maintien de l'homéostasie osseuse, dans le maintien de sa qualité et de son intégrité structurale. L'os ancien va être détruit par les OCs, et est par la suite remplacé par de l'os nouveau formé par les OBs (PARFITT, et al., 1996).

Le cycle de remodelage osseux se divise en quatre grandes étapes (Fig. 2). Le tout commence par la résorption osseuse qui débute par le recrutement de pré-OCs. Ces cellules mononucléées vont proliférer, fusionner et se différencier en OCs matures, seules cellules capables de résorber l'os. Après la phase de résorption, les OCs sont éliminés par apoptose.

Au même moment, il y a recrutement de cellules mononucléées du lignage monocyte-macrophage, qui vont préparer la surface de l'os, et vont aussi servir de signal pour le recrutement et la différenciation des pré-OBs. Tout ce processus prend environ trois semaines. Ensuite, les OBs se développent et forment du nouvel os, matrice ostéoïde qui sera par la suite minéralisée. Certaines cellules OB restent emprisonnées dans la matrice osseuse, et formeront les ostéocytes, les autres OBs seront soit éliminés par apoptose, soit resteront à la surface osseuse, pour former la couche bordante (*resting cells*). Les phases de formation osseuse et de minéralisation s'étalent sur approximativement trois mois (PARFITT, et al., 1996).

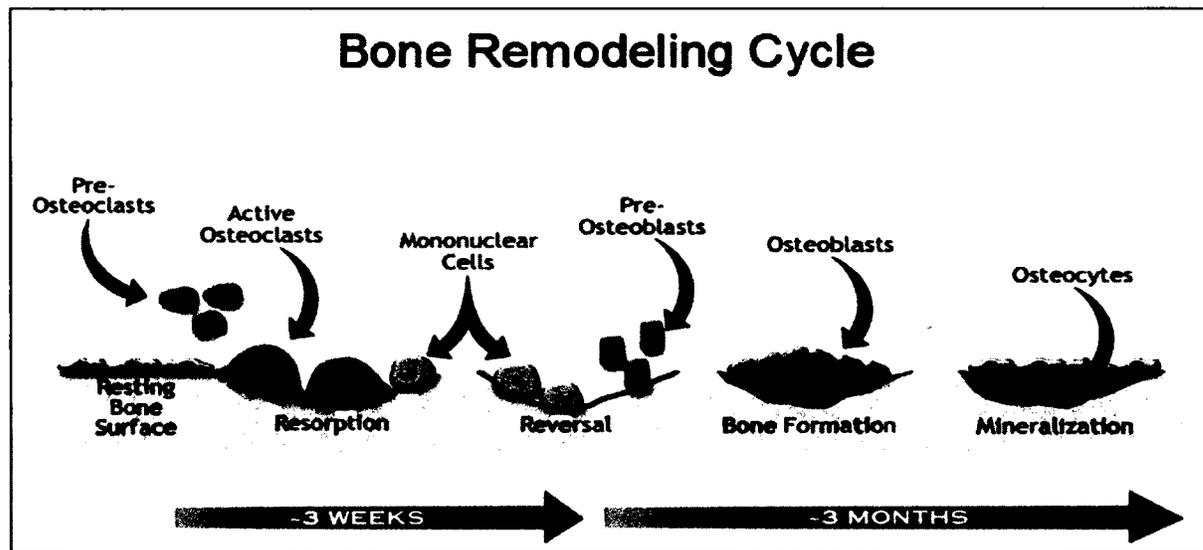


Figure 2: Cycle du remodelage osseux.

Un cycle complet de remodelage dure environ quatre mois, et se déroule en quatre grandes étapes. Tout d'abord, les OCs sont recrutés puis activés. Après la résorption, les OCs entrent en apoptose et il s'en suit le recrutement de pré-OBs et leur maturation. Finalement, la formation osseuse prend place, avec sécrétion de protéines matricielles par les OBs, formation d'ostéocytes restant inclus dans la matrice osseuse, et minéralisation du nouvel os.

(Référence : Université de Michigan: <http://www.ns.umich.edu/Releases/2005/Feb05/img/bone.jpg>)

2.1 Unités de remodelage osseux à l'échelon cellulaire

Le remodelage osseux a lieu à la surface osseuse, où des millions d'unités de remodelage (BMU: basic multicellular unit) sont en activité, réalisant résorption et réparation de cavités microscopiques, et dans lesquelles se trouvent les cellules osseuses. Par exemple, la Figure 2 représente une unité de remodelage. On estime qu'à tout moment chez l'adulte il y a environ un million de BMUs qui progressent. La durée de vie d'une BMU est de six à neuf mois (PARFITT, et al., 1996; SMITH, et al., 2012).

2.2 Régulation du remodelage osseux

L'équilibre de ce remodelage osseux, spatial et temporel, reflète le couplage étroit existant entre OCs et OBs, et est régulé par des hormones: hormones calciotropes (parathormone, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$), ou hormones sexuelles (Estrogènes), ainsi que par des facteurs locaux, cytokines et facteurs de croissance, sécrétés par les cellules du micro-environnement, les cellules osseuses et les cellules de la moelle hématopoïétique. Il existe ainsi à proximité de la surface osseuse une grande complexité d'interactions cellulaires ayant un rôle capital dans la régulation du remodelage osseux (ERIKSEN, 2010; MANOLAGAS, 2000; RAISZ, 1999).

Un second mécanisme de régulation du remodelage osseux dépend de la réaction de l'os à la sollicitation mécanique et gravitationnelle, et qui implique que les os les plus sollicités sont renforcés (loi de Wolff) (BOYLE et KIM, 2011).

2.3 Système de régulation RANKL, RANK, OPG

Parmi les médiateurs locaux impliqués dans le remodelage de l'os, la voie de signalisation impliquant RANKL (Receptor Activator of NF- κ B), son récepteur RANK exprimé par les OCs, et l'ostéoprotégérine (OPG) joue un rôle majeur. De nombreux facteurs locaux et hormonaux modulent la résorption via cette voie de signalisation. L'OPG est un inhibiteur physiologique de RANKL, agissant comme un récepteur leurre, il prévient la liaison de RANKL à RANK, et est un puissant inhibiteur de la résorption osseuse (BOYCE et XING, 2008).

2.4 Équilibre du remodelage osseux

Chez les sujets en bonne santé, la masse osseuse reste constante, reflétant un équilibre entre les taux de formation et de résorption osseuse. On obtiendra annuellement un renouvellement de 10% du squelette, 4% de l'os compact et environ 28% pour l'os trabéculaire (MANOLAGAS, 2000). Le remodelage n'est pas non plus égal d'un os à l'autre et varie en fonction de la taille et de l'épaisseur des os. Un déséquilibre entre la formation osseuse et la résorption osseuse peut conduire à diverses maladies osseuses qui touchent le squelette adulte telle l'ostéoporose ou encore la maladie de Paget qui sera traitée dans la présente étude (MANOLAGAS, 2000; RAISZ, 1999).

3. LES CELLULES OSSEUSES

Les trois principaux types de cellules osseuses impliquées dans le remodelage de l'os sont décrits en détail dans cette section.

3.1 L'Ostéoblaste

3.1.1 Différenciation des ostéoblastes

Les OBs dérivent de cellules souches mésenchymateuses, provenant de la moelle osseuse ou du périoste (MANOLAGAS, 2000; RAISZ, 1999). Les précurseurs OB se différencient en pré-OBs puis en OBs matures. De nombreux facteurs locaux et systémiques comme le TGF β , les FGFs, les BMPs, la PTH, la 1,25(OH) $_2$ D et les estrogènes stimulent la différenciation de ces cellules, en intervenant à différentes étapes de l'ostéoblastogénèse (ZUO, et al., 2012).

Le principal gène ostéogénique pour la différenciation OB et la formation osseuse est le gène de Runx2 (Cbfa1), codant pour un facteur de transcription ayant de multiples activités régulatrices, dont l'activation ou la répression de nombreux gènes, et l'intégration de signaux biologiques provenant des voies BMP/TGFbeta, et de la voie de signalisation Wnt. Les voies de signalisation Wnt, MAPK, Notch, Hedgehog et FGF sont impliquées dans le devenir de l'OB (CHEN, et al., 2012; ZUO, et al., 2012). Une des voies majeures de la formation OB est la voie Wnt, dont l'activation conduit à une cascade d'évènements intracellulaires qui stabilisent la β -caténine, facilitant son transport au noyau où elle se lie à des facteurs de transcription et module l'expression de gènes qui stimulent la différenciation, l'expansion et la fonction des OBs. Les antagonistes physiologiques de Wnt, Dickkopf1 (dkk1), secreted frizzled-related proteins (sFRP1) et la sclérostine, affectent l'activation de ce complexe, et inhibent la différenciation du pré-OB vers l'OB et la formation osseuse (Fig. 3) (ROBLING, et al., 2006).

3.1.2 Fonctions de l'ostéoblaste

Les OBs sont des cellules mononucléées responsables de la formation osseuse. Ces cellules sont impliquées dans la synthèse de la matrice osseuse, mais aussi dans le contrôle de sa minéralisation et dans la régulation de l'activité de l'OC. Les OBs matures sécrètent les protéines matricielles (collagène de type I, protéoglycanes, ostéocalcine, ostéopontine et phosphatase alcaline) nécessaires à la formation du tissu ostéoïde et à la minéralisation de la matrice osseuse (MANOLAGAS, 2000). De plus, les OBs régulent la vitesse à laquelle les OCs se différencient, et contrôlent la résorption osseuse. Ces régulations sont soigneusement règlementées par la modulation de la production de RANKL, M-CSF et OPG, sécrétés par l'OB (BOYCE et XING, 2008; ROBLING, et al., 2006).

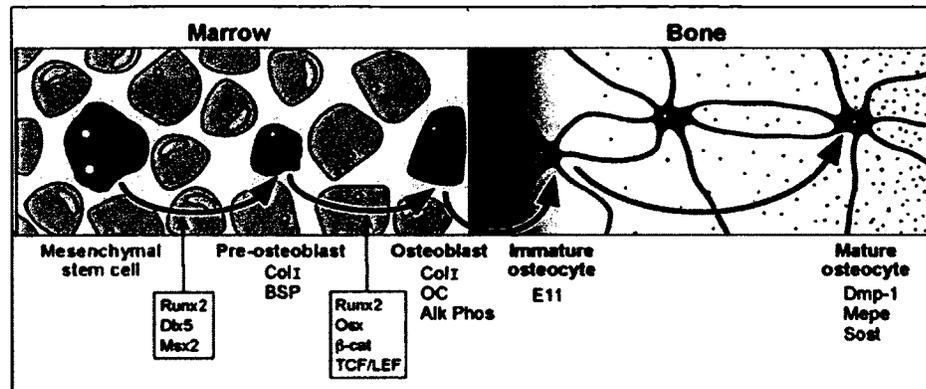


Figure 3. Différenciation des ostéoblastes.

La voie commune de différenciation OB débute par l'engagement de précurseurs mésenchymateux qui se différencient progressivement en pré-Obs puis en OB matures. À la fin de la formation osseuse, les OBs sont soit inclus dans la matrice avec une différenciation terminale en ostéocytes, soit forment la couche bordante des OBs de surface, ou sont éliminés par apoptose. Abréviations: Col I: collagène de type I, β -cat: β -caténine, BSP: Bone Sialoprotein, OC: Osteocalcin, Osx: Osterix, Alk Phos: Phosphatase alcaline, Dmp-1: Dentin matrix protein-1, Mepe: Matrix extracellulaire phosphoglycoprotéine, Sost: sclérostine. *Figure adaptée de ROBLING, et al., 2006.*

3.2 L'Ostéocyte

Comme déjà mentionné, certains OBs restent emprisonnés dans la matrice osseuse et deviennent des ostéocytes. Ces cellules représentent environ 90-95 % des cellules osseuses du squelette adulte, et sont donc les cellules les plus abondantes (GUO et BONEWALD, 2009).

Les ostéocytes peuvent former des réseaux entre eux ainsi qu'avec les cellules de surface grâce à des extensions de la membrane cytoplasmique nommées dendrites, contenues dans les canalicules de la matrice osseuse (Fig. 3). On retrouve sur les dendrites des jonctions communicantes qui permettent la transmission intercellulaire de signaux aux ostéocytes et aux ostéoblastes de surface. Ces réseaux de communication permettent aux ostéocytes d'organiser une réponse ordonnée à un signal ou à un stress, conduisant à une stimulation ou une inhibition de la formation osseuse (GUO et BONEWALD, 2009).

La régulation du métabolisme osseux par les ostéocytes implique la synthèse et la sécrétion de facteurs impliqués dans la formation et l'activation des OBs et des OCs. L'ostéocyte est la principale source du RANKL, essentiel à la formation et l'activité des OCs (XIONG, et al., 2011). L'ostéocyte est également responsable de la production de sclérostine, antagoniste naturel dans la voie Wnt, et inhibiteur de la formation osseuse (GUO et BONEWALD, 2009). D'autres protéines telles que Mepe et Dmp1 sont sécrétées par les ostéocytes, et sont impliquées dans la minéralisation osseuse et l'homéostasie du phosphore (Fig. 3).

3.3 L'Ostéoclaste

3.3.1 Structure de l'ostéoclaste

Les OCs sont des cellules multinucléées de grande dimension variant de 50 à 100 μm de diamètre. Ils possèdent 5-8 noyaux jusqu'à une cinquantaine selon les espèces (VAANANEN et LAITALA-LEINONEN, 2008). Les OCs proviennent de la fusion de cellules précurseurs appartenant à la lignée monocyte-macrophage et sont d'origine hématopoïétique (§3.3.2). L'OC est une cellule polarisée, avec au pôle basal, en regard de la matrice osseuse, une différenciation de la membrane plasmique constituée de fines expansions cytoplasmiques digitiformes appelée "bordure plissée". Cette région caractéristique est délimitée par une couronne de cytoplasme dépourvue d'organites cellulaires (zone claire) et riche en éléments du cytosquelette (actine), constituant un anneau périphérique étroitement accolé à la surface osseuse, permettant d'individualiser la zone de résorption sous l'OC, en regard de la membrane plissée. La durée de vie des OC est d'environ 15 jours, et ils meurent par apoptose (VAANANEN et LAITALA-LEINONEN, 2008).

3.3.2 L'ostéoclastogénèse

L'ostéoclastogénèse débute à partir d'une cellule souche hématopoïétique qui se différencie en cellule pluripotente (CFU-GM). La différenciation des précurseurs en OC est initiée et contrôlée par les cellules stromales et les pré-OB. Ceux-ci favorisent la prolifération et la différenciation des OCs par des contacts cellule-cellule et la production de facteurs solubles (SUDA, et al., 1999). OBs et cellules stromales produisent du M-CSF et expriment RANKL, deux cytokines cruciales dans la formation OC (Fig. 4). La production de RANKL et de M-CSF est contrôlée par d'autres facteurs systémiques (PTH) ou locaux, cytokines (IL1, $\text{TNF}\alpha$, IL11, IL15, IL17) et prostaglandines (PGE2), qui stimulent la résorption OC (ROUX et ORCEL, 2000).

Les principaux facteurs de transcription impliqués dans l'engagement vers la voie OC sont PU-1 et MTIF. Le pré-OC se différenciera en précurseur OC et après une phase de prolifération, poursuivra sa différenciation en OC mature, sous l'influence de RANKL et de divers facteurs de transcription, tels que NF- κ B (nuclear factor kappa B), CSF-1R, c-Fos, et NFATc1 (nuclear factor of activated T cells, cytoplasmic, calcineurin dependent 1) (ASAGIRI et TAKAYANAGI, 2007; ZHAO et IVASHKIV, 2011).

Au cours de la maturation de l'OC, les OCs mononucléés fusionnent entre eux pour donner un OC mature multinucléé (Fig. 4). La multinucléation est une caractéristique importante,

nécessitant la fusion d'environ 10 à 20 cellules individuelles, et est nécessaire à l'activité de l'OC. Ce phénomène a pour effet d'augmenter la surface de résorption des BMUs, et dépend surtout de RANKL (BOYLE, et al., 2003). Plusieurs marqueurs OC sont exprimés à ce stade, comme l'intégrine $\alpha\beta3$, la phosphatase acide tartrate-résistante (TRAP), la MMP-9, le récepteur de la calcitonine et la cathepsine K. Ces facteurs sont importants pour l'activité de résorption osseuse, seule caractéristique phénotypique de l'OC (§I-3.3.3). La prolifération, la formation, la survie et l'activité des OCs sont principalement sous la dépendance de RANKL.

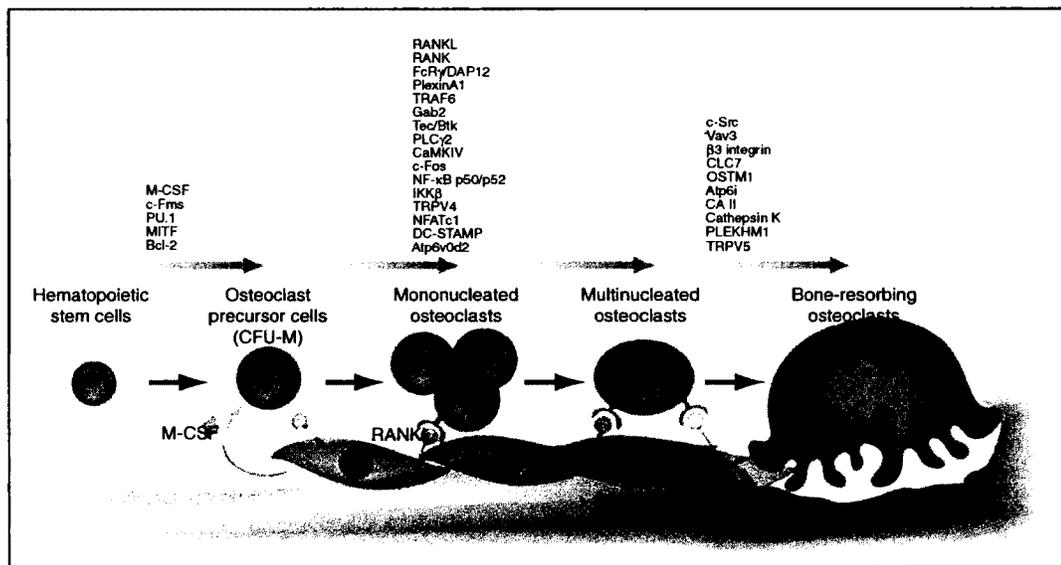


Figure 4. Différenciation de l'ostéoclaste et médiateurs essentiels.

Les cellules souches hématopoïétiques se différencient en CFU-GM puis CFU-M sous l'influence du M-CSF. Les cellules des colonies CFU-M comportent les précurseurs communs aux macrophages et pré-OCs. RANKL joue par la suite un rôle majeur dans l'engagement vers la voie OC des précurseurs, dans la différenciation et la fusion des cellules mononucléées, et dans la maturation et l'activation des OCs. Dans le haut de l'image, les molécules exprimées par les cellules OC aux différentes étapes de l'ostéoclastogénèse sont indiquées. L'apparition de ces différentes molécules dépend aussi de la présence de RANKL et de M-CSF. Figure adaptée de (NEGISHI-KOGA et TAKAYANAGI, 2009)

3.3.3 Fonction de l'ostéoclaste

Les OCs sont responsables de la résorption osseuse. Cette activité ostéoclastique est permanente et contribue au remodelage osseux, essentiel au maintien de la qualité et de la solidité des os. Au cours de la différenciation, l'OC migre vers la surface osseuse destinée à être résorbée. L'OC mature adhère à la matrice osseuse à l'aide des intégrines $\alpha\beta3$ exprimées à sa surface. Les intégrines s'attachent à des séquences de reconnaissance RGD (motif d'acides aminés Arg-Gly-Asp) sur les protéines de la matrice osseuse (fibronectine, ostéopontine, collagène, BSP). Il s'en suit une réorganisation du cytosquelette d'actine qui amène l'OC à se polariser. L'un des côtés est orienté vers l'os et est constitué de la membrane plissée, cerclée par la zone de scellement individualisant le compartiment de résorption sous l'OC, un côté baso-latéral dirigé vers le micro-environnement et les vaisseaux, avec en son centre un domaine d'excrétion des produits de dégradation transportés par transcytose (SALO, et al., 1997). Les intégrines vont aussi conférer aux OCs la capacité de migrer sur l'os, en permettant la formation de structures nommées podosomes (LUXENBURG, et al., 2007).

Le processus de dégradation osseuse se produit au niveau de la membrane plissée de l'OC (Fig. 5). Deux conditions sont nécessaires pour que l'OC soit en mesure de dégrader la matrice osseuse. Suite à son adhésion et son ancrage à la matrice osseuse, l'OC acidifie le compartiment de résorption tout en maintenant son pH intracellulaire. Cela est rendu possible par la présence de pompes vacuolaires à protons (H^+)/ATPase qui vont permettre d'abaisser le pH extracellulaire en sécrétant des ions H^+ dans le compartiment de résorption. Le maintien du pH intracellulaire de l'OC est réalisé grâce à des échangeurs ioniques (HCO_3^-/Cl^-) (VAANANEN et LAITALA-LEINONEN, 2008). L'OC sécrète ensuite des enzymes protéolytiques comme les MMPs ou la cathepsine K (CatK), des phosphatases acides (TRAP), des collagénases. L'action combinée de l'acidification et la sécrétion de diverses enzymes va permettre de dégrader la matrice extracellulaire et de dissoudre les cristaux d'hydroxyapatite ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$). Les produits de dégradation de l'os et les ions phosphate et calcium provenant de la dissolution des cristaux d'hydroxyapatite sont transportés à l'intérieur de l'OC (transcytose) puis rejetés à l'extérieur de la cellule. L'arrêt de la résorption se produit par défaut en l'absence de signaux stimulateurs. La cellule va alors se détacher de la matrice et entrer en apoptose (VAANANEN et LAITALA-LEINONEN, 2008).

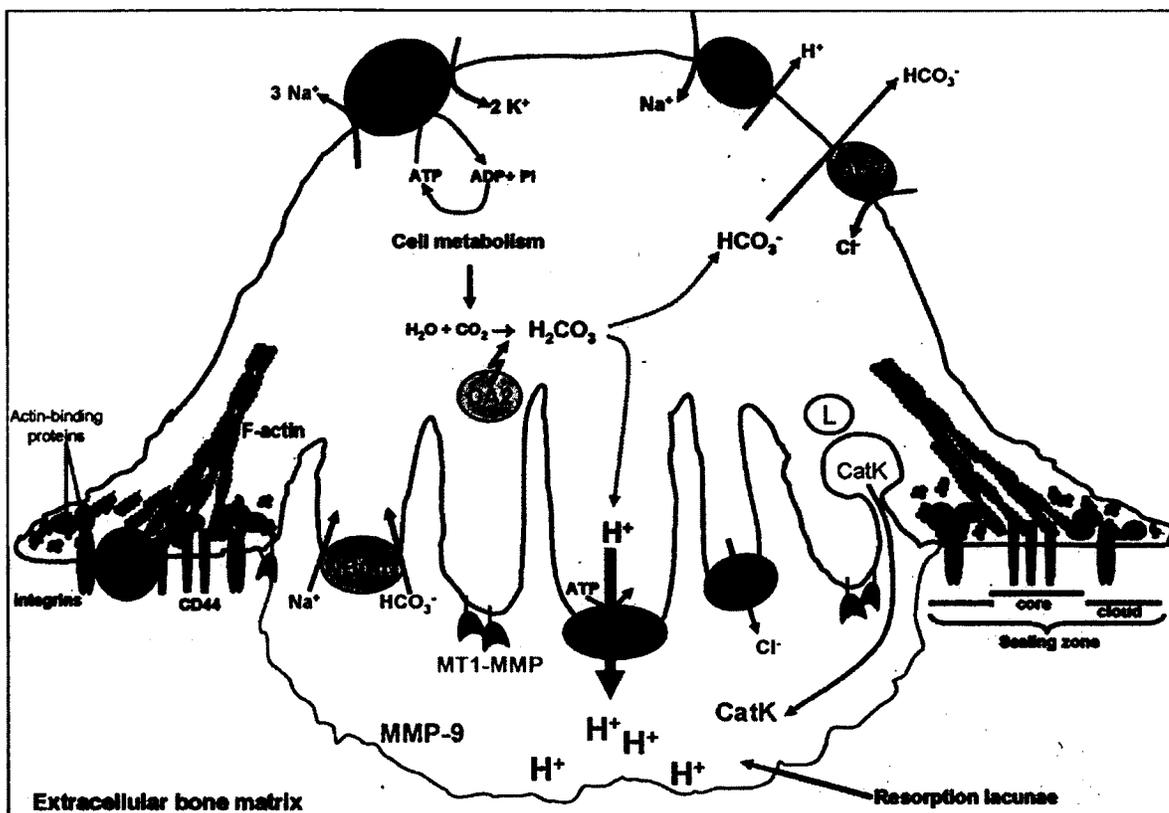


Figure 5. Mécanisme de résorption osseuse par l'OC mature.

La cellule s'attache à la matrice osseuse grâce à la réorganisation du cytosquelette d'actine et aux intégrines ($\alpha\beta3$). Cet attachement permet la formation d'une zone de scellement, individualisant sous l'OC le compartiment de résorption. Le tissu osseux sera dégradé petit à petit par les OCs en regard de la bordure plissée, formant la lacune de résorption. Cette dégradation est possible du fait de l'acidification du compartiment de résorption par les pompes à protons (V-ATPase) qui libèrent des ions H^+ et permettent la dissolution du composant minéral. L'OC sécrète également des enzymes (MMP, TRAP, CatK et collagénases) responsables de la dégradation de la phase organique. Les protons H^+ proviennent de l'hydratation du CO_2 en H_2CO_3 ($H^+HCO_3^-$) par l'anhydrase carbonique de type II (CA2), située dans le cytosol près de la bordure plissée. Des échanges ioniques permettent de maintenir l'électroneutralité : libération d'ions Cl^- dans la lacune par le canal ClC-7 ; et transport de HCO_3^- à l'intérieur de la cellule via le canal NBCn1. On retrouve également divers canaux échangeurs ioniques dans la partie basolatérale de la membrane plasmique, importants dans le maintien de l'homéostasie de l'OC. Le pH cytosolique est maintenu entre 6.9 et 7.2 par le fonctionnement de ces canaux ioniques de surface. Figure adaptée de (BRISSEAU, et al., 2012).

3.3.4 La signalisation RANKL/RANK dans l'ostéoclaste

La principale voie de signalisation impliquée dans la formation et la fonction de résorption des OCs est induite par RANKL qui lie son récepteur RANK à la surface de la cellule. Cette interaction mène à la transduction de multiples signaux intracellulaires dans l'OC (ASAGIRI et TAKAYANAGI, 2007). Après la liaison de RANKL à son récepteur RANK, des facteurs TRAFs (facteurs cytoplasmiques associés aux récepteurs TNF) sont recrutés (TRAF-2, 5 et 6) dans le complexe de signalisation, avec un rôle majeur de TRAF6 (LAMOTHE, et al., 2007). Des études réalisées chez des souris génétiquement invalidées en protéine TRAF2 et/ou 5 n'objectivent pas d'anomalie osseuse, à la différence des souris génétiquement invalidées en TRAF-6 (EDWARDS et MUNDY, 2011). TRAF6 agit comme une protéine adaptatrice qui lie d'autres protéines, dont la protéine p62/séquestosome1, la kinase atypique PKC ζ , et CYLD (Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase). Ce complexe va permettre l'activation de diverses cascades de signalisation conduisant à l'activation des deux principaux facteurs de transcription, NF- κ B et NFATc1 (McMANUS et ROUX, 2012).

Le facteur de transcription NF- κ B forme des dimères à partir de cinq protéines : cRel, Rel A (p65), Rel B, p50 (NF- κ B1) et p52 (NF- κ B2). Les isoformes p50 et p52 sont les principales protéines impliquées dans la résorption osseuse OC (Fig. 6). Les souris génétiquement invalidées en p50/p52 (double délétion) développent une ostéopétrose, liée à un défaut d'activité des OCs (IOTSOVA, et al., 1997). Dans la voie classique de signalisation NF- κ B, l'inhibiteur I κ B est liée de manière constitutive au dimère NF- κ B, et en bloque l'activation. La kinase IKK est activée par RANKL et phosphoryle la protéine I κ B, induisant sa libération, et sa dégradation par le protéasome, et permettant l'activation de NF- κ B et sa translocation nucléaire (HAYDEN et GHOSH, 2004). Le facteur nucléaire modulera alors l'expression de gènes importants dans le fonctionnement de l'OC. La voie alterne comme la voie classique de NF- κ B sont impliquées dans la différenciation et l'activation des OCs induites par RANKL (NOVACK, 2011). Alors que la voie classique de NF- κ B peut être induite par de nombreux stimuli, l'activation de la voie alterne de NF- κ B est restreinte à certains membres de la famille du TNF, dont RANKL et TNF- α .

Le facteur NFATc1 est le deuxième facteur nucléaire d'importance majeure dans la signalisation de l'OC, et sa présentation sera détaillée à la section I-4.3.

D'autres voies intracellulaires sont aussi activées par RANKL (Fig. 6). La voie des MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinases) dans laquelle des kinases (MAPKK) activent par phosphorylation JNK, p38, et ERK. L'activation de la voie des MAPKs induit l'activation de facteurs nucléaires tels que c-Fos et c-Jun, jouant un rôle important dans le fonctionnement de l'OC (ASAGIRI et TAKAYANAGI, 2007). L'activation de la protéine Src par sa liaison à TRAF6 est impliquée dans la survie de l'OC. Src induit l'activité de PI3K qui active Akt. La protéine Akt une fois phosphorylée inactive certaines protéines pro-apoptotiques (comme Bad) et est aussi importante dans l'organisation du cytosquelette, ainsi que dans la motilité cellulaire (WONG, et al., 1999). La voie Akt est inhibée par deux suppresseurs de tumeur SHIP et PTEN qui déphosphorylent PIP3, produit de PI3K nécessaire à l'activation de Akt, et SHIP pourrait de surcroît déphosphoryler Akt ; ces phosphatases pourraient ainsi faciliter l'apoptose. De plus, les souris génétiquement invalidées SHIP^{-/-} développent une hyperrésorption osseuse très similaire à celle de la maladie osseuse de Paget (TAKESHITA, et al., 2002).

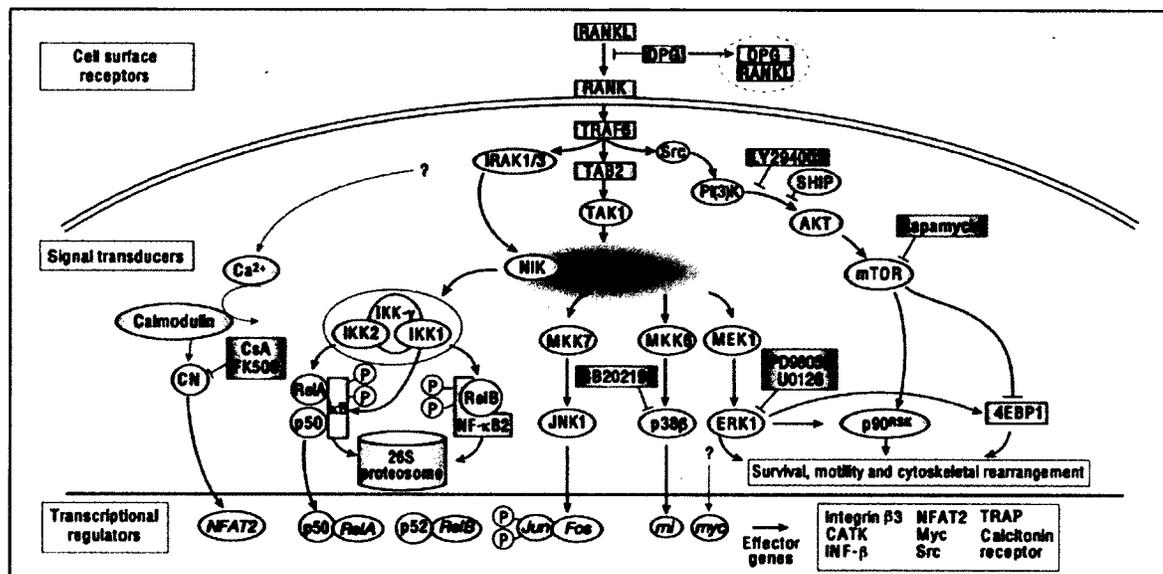


Figure 6. Signalisation RANK/RANKL dans l'OC.

RANKL induit l'activation de nombreuses voies de signalisation dans l'OC, impliquées dans la différenciation, la survie, mais aussi l'activation de l'OC. RANK et OPG sont des récepteurs trimériques de la famille des TNFR (tumeur necrosis factor receptor) qui interagissent avec RANKL. L'OPG inhibe la liaison de RANKL à RANK, constituant une boucle de rétro-inhibition. Les cascades de signalisation comprennent: les voies classique et alterne de NF-κB; la voie des MAPKs conduisant à l'activation par phosphorylation de JNK, p38, et ERK, et des facteurs nucléaires c-Fos, c-Jun et myc; la voie de Src qui active Akt via PI3K, et est impliquée dans la survie. Finalement, NFATc1 (NFAT2) est activé par une phosphatase nommée la calcineurine (CN) dont l'activation dépend de la signalisation calcique. Figure adaptée de (BOYLE, et al., 2003).

4. EMPHASE SUR 3 PROTÉINES D'INTÉRÊT DE LA SIGNALISATION RANKL/RANK

Dans cette section, trois protéines de la signalisation de l'OC abordées précédemment seront discutées, du fait de leur importance dans le travail présenté: la protéine p62, la protéine kinase zêta (ζ) et NFATc1.

4.1 La protéine p62 (séquestosome 1)

La protéine p62 ou « séquestosome » est une protéine adaptatrice possédant de multiples domaines de liaison pour diverses protéines, et impliquée dans la formation de complexes multimériques (Fig. 7). Les domaines d'interaction comprennent en C-terminal le domaine UBA (ubiquitin-associated domain) qui permet de lier des protéines polyubiquitinées de façon non covalente; le domaine TF6-b permet la liaison de TRAF 6, et un autre domaine permet les interactions avec p38 ; à son extrémité N-terminale, le domaine PB1 lie les PKC atypiques dont PKC ζ , certaines MAPKs comme MEK5 et ERK, et permet également des interactions avec d'autres p62 permettant la formation d'homodimères; enfin p62 est capable d'interagir en N-terminal avec le protéasome (26S) (GEETHA et WOOTEN, 2002; SEIBENHENER, et al., 2007).

Du fait de ces différents domaines, p62 joue un rôle majeur dans la formation des complexes de signalisation, en particulier le complexe induit par RANKL, et dans l'activation de la voie NF- κ B (NAKAMURA, et al., 2010). La capacité à lier les protéines polyubiquitinées par son domaine UBA et le protéasome en N-terminal rend compte de son rôle dans le transport des protéines vers leur lieu de dégradation (SEIBENHENER, et al., 2004). p62 est également une molécule clé de l'autophagie sélective, permettant de cibler les protéines ubiquitinées vers l'autophagosome, et a été impliquée dans la détection des éléments nutritifs, et dans la réponse au stress oxydatif; par ces propriétés liées à l'autophagie, p62 contribue à l'adipogénèse, et la croissance cellulaire (MOSCAT et DIAZ-MECO, 2012). Les souris génétiquement invalidées pour *SQSTM1/p62* ont une densité osseuse élevée, et la différenciation des OCs induite par RANKL *in vitro* est altérée, avec un défaut d'activation de la voie NF- κ B et un défaut d'expression de NFATc1. Ces données confortent l'implication de p62 dans la formation et l'activation des OCs, et dans la régulation du remodelage osseux (DURAN, et al., 2004).

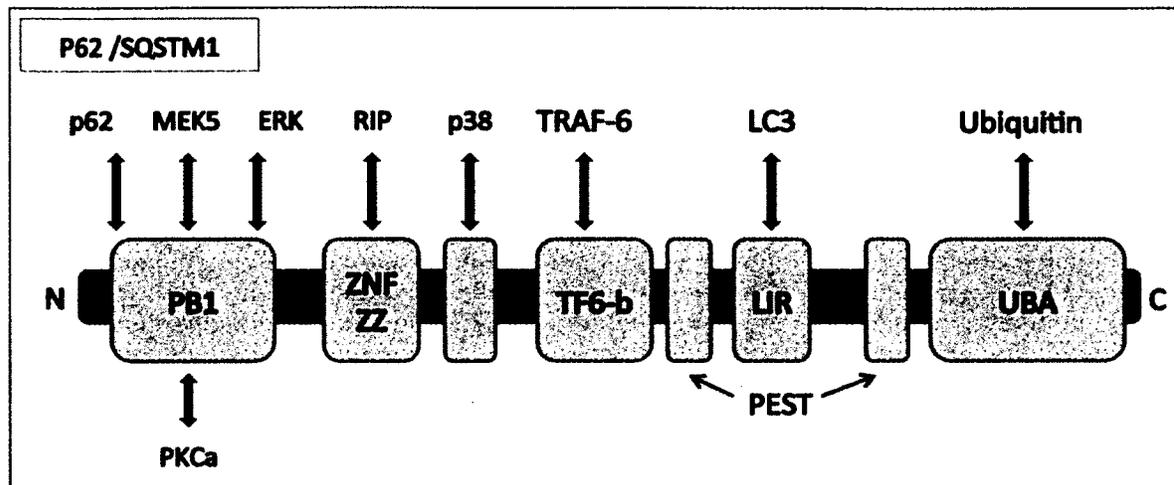


Figure 7. Les domaines de liaison de la protéine p62 cytosolique.

La protéine p62 est codée par le gène *SQSTM1*, et comporte de nombreux domaines de liaison permettant des interactions avec diverses protéines, dont certaines sont impliquées dans la signalisation RANK/RANKL : TRAF-6 se lie au domaine TF6-b; les PKC atypiques, ERK, et d'autres protéines se lient au domaine PB1; un domaine UBA en C-terminal permet la liaison de protéines polyubiquitinées. *Figure adaptée de (McMANUS et ROUX, 2012).*

4.2. La protéine kinase C zêta (PKC ζ)

La PKC ζ est une sérine/thréonine kinase de la sous-classe des PKC atypiques. Cette classe contient deux membres, la PKC lambda/iota (λ/ι) (lambda chez la souris) et la PKC zêta (ζ). Les deux protéines kinases atypiques sont homologues à 70 % et ont une activité très similaire. Elles font partie de cette sous-classe car leur activation n'est pas dépendante du calcium (Ca^{2+}) et du DAG (diacylglycérol), comparativement aux PKCs des autres groupes. Cette PKC atypique est présente dans divers types cellulaires, les cellules immunitaires (lymphocytes T), les cellules endothéliales et les OCs (HIRAI et CHIDA, 2003; REYLAND, 2009).

La PKC ζ est impliquée dans la régulation de plusieurs voies critiques, en particulier la survie, mais également la prolifération, la différenciation ainsi que la polarité cellulaire (REYLAND, 2009). La structure protéique de PKC ζ comporte un domaine PB1, un domaine C1 et un domaine à activité enzymatique kinase (Fig. 8). PKC ζ interagit avec p62 au domaine PB1, et intervient dans la signalisation NF- κ B. De par ces interactions, PKC ζ est impliquée dans diverses voies de signalisation. L'importance de l'interaction PKC ζ et p62 dans l'activation de la voie NF- κ B au cours de l'ostéoclastogénèse a été soulignée (DURAN, et al., 2004). PKC ζ est recrutée dans le complexe de signalisation induit par RANKL, mais le rôle

précis de cette kinase dans l'activation de NF- κ B induite par ces interactions reste à définir. La protéine régulatrice Par-4 (prostate androgen responsive-4), un inhibiteur spécifique de l'activité enzymatique des PKCa, se lie au domaine C1 des PKCa. D'autres protéines se lient au domaine PB1 comme la protéine Par-6 (partitioning defective-6), jouant un rôle dans la polarité cellulaire, ainsi que des protéines de la famille des MAPKs (MEK5, MEKK3, et p38) (MOSCAT, et al., 2009; MOSCAT et DIAZ-MECO, 2012). Ces protéines sont impliquées dans des cascades de signalisation activant divers facteurs de transcription tels que NF- κ B, NFAT et AP-1. La PKC ζ contrôle la fonction de NFAT dans les cellules T en modulant son activité de transactivation, par phosphorylation du glutathion S-transférase-NFAT1 (NFATc2) (1-385), et PKC ζ co-précipite avec NFAT1 ou NFAT2 (SAN-ANTONIO, et al., 2002). PKC ζ est activée par de nombreux facteurs : les cofacteurs lipidiques comme la phosphatidylsérine (PS), l'acide phosphatidique, le phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate, l'acide arachidonique et céramide; certaines cytokines comme TNF- α , RANKL et l'IL-1. La PKC ζ est également un substrat de PDK1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1) (DIAZ-MECO et MOSCAT, 2012).

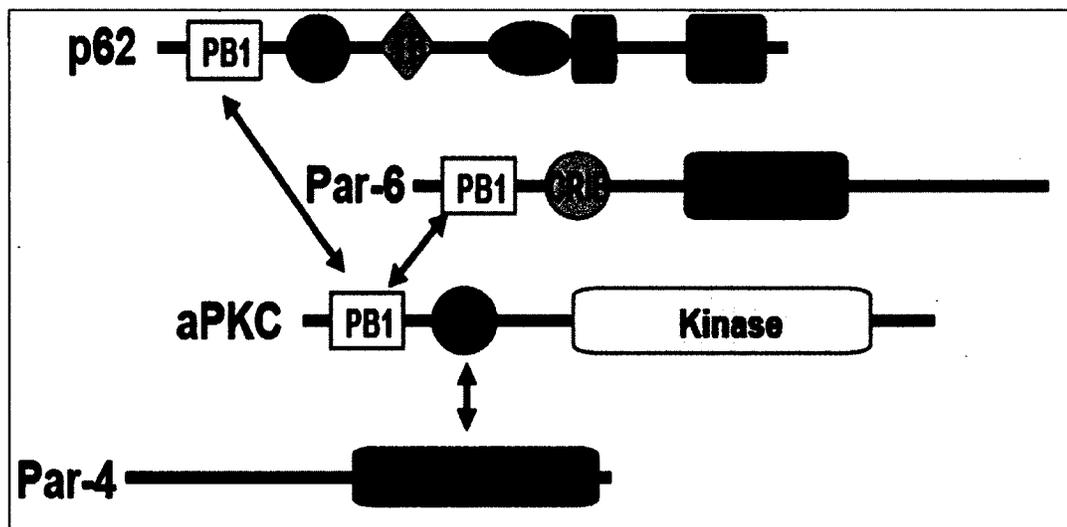


Figure 8. Structure des protéines kinases atypiques (PKCa).

Les PKCa contiennent différents domaines importants pour la liaison de plusieurs protéines impliquées dans la signalisation cellulaire. Les PKCa interagissent avec p62 et Par-6 (via PB1), et avec Par-4, un inhibiteur spécifique des PKCa (via C1). Figure adaptée de (DIAZ-MECO et MOSCAT, 2012).

4.3. NFATc1

NFATc1 est un facteur de transcription que l'on retrouve sous différentes terminologies comme NFATc et NFAT2. On compte cinq familles de NFAT incluant NFATc1 (NFAT2, NFATc), NFATc2 (NFAT1, NFATp), NFATc3 (NFAT4, NFATx), NFATc4 (NFAT3) et NFAT5 (TonEBP and OREBP). L'activation de tous les NFATs est régulée par la signalisation calcique et la sérine/thréonine phosphatase appelée calcineurine (CaN), excepté le NFAT5 qui est activé en réponse de stress osmotique (MACIAN, 2005).

La structure protéique des NFATs comporte deux domaines, un domaine de régulation (NHR) en N-terminal et un domaine d'homologie Rel (RHD ou RHR) à l'extrémité C-terminale. Le domaine de régulation est composé de deux sites de liaison pour la calcineurine, d'une longue région riche en sérine et d'une séquence de localisation nucléaire (NLS). Le domaine d'homologie Rel se lie à l'ADN et interagit avec des protéines partenaires pour transactiver la transcription de gènes cibles. Parmi les facteurs de transcription partenaires on retrouve AP-1 (dimères de FOS ou JUN), NF- κ B, GATA4, et MEF2. Les régions N- et C-terminales de chaque protéine NFAT sont uniques et contiennent des domaines d'activation de transcription (TAD) (MACIAN, 2005).

Plusieurs isoformes protéiques de NFATc1 sont produites par épissage alternatif de l'ARNm (VIHMA, et al., 2008). Ces isoformes diffèrent dans les régions N- et C- terminales, et comprennent l'isoforme A de 703 acides aminés (aa), l'isoforme B de 812 aa et l'isoforme C de 930 aa (Fig. 9) (SERFLING, et al., 2006).

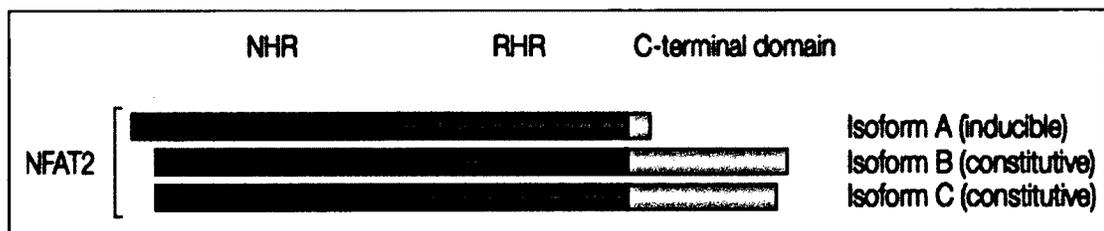


Figure 9. Isoformes de NFATc1 (NFAT2).

La structure des NFATs comporte deux régions : un domaine d'homologie REL (RHR), contenant le motif de liaison à l'ADN; un domaine de régulation (NHR), conservé parmi NFAT1-NFAT4. Les protéines NFATs ont plusieurs isoformes générées par épissage alternatif ou promoteurs alternatifs (P1, P2). Les différentes isoformes de NFAT2 (NFATc1) sont représentées; dans les LT elles sont exprimées de manière constitutive et/ou sont inducibles. Figure adaptée de (MACIAN, 2005).

Les facteurs NFATs, initialement décrits dans les lymphocytes T, ont une expression ubiquitaire, présents dans les cellules immunitaires, les kératinocytes, les cellules du système cardio-vasculaire, musculaire, neurologique, digestif et osseux (AL-DARAJI, et al., 2009; VIHMA, et al., 2008). Ils sont impliqués dans la fonction et le développement de nombreux types cellulaires. NFATc1 et NFATc2 sont exprimés dans le tissu osseux, et les deux ont été impliqués dans l'ostéoclastogénèse. L'ARNm de NFATc1 est induit électivement par RANKL, alors que l'ARNm de NFATc2 est exprimé de façon constitutive dans les cellules à des niveaux plus bas (TAKAYANAGI, 2007). Dans l'OC humain, les 3 isoformes de NFATc1 (A, B, C) sont retrouvées, et sont induites au cours de la différenciation OC induite par RANKL. Ces 3 isoformes sont exprimés par les OCs matures, principalement les isoformes B et C (DAY, et al., 2005). Cette observation montre l'importance du facteur NFATc1 dans la différenciation, mais aussi dans le fonctionnement des OCs induit par la voie RANKL.

Les souris génétiquement invalidées en *NFATc1* meurent lors de l'embryogenèse (*in utero*), du fait d'une malformation cardiaque (TAKAYANAGI, 2007). Des souris génétiquement modifiées qui conservent une expression de *NFATc1* au niveau du cœur ont été conçues et sont viables (WINSLOW, et al., 2006). Ces souris ont des OCs plus petits et moins nombreux, et développent une ostéopétrose, sans éruption dentaire (ALIPRANTIS, et al., 2008). Ces travaux *in vivo* soulignent l'importance de NFATc1 dans le tissu osseux.

Le rôle essentiel de NFATc1 dans la signalisation intracellulaire des OCs a été identifié *in vitro* par son induction forte et sélective par RANKL dans les précurseurs monocytes/macrophages de moelle osseuse de souris (ASAGIRI, et al., 2005). Dans l'OC, les interactions RANK/RANKL induisent la formation d'un complexe de signalisation avec le recrutement initial de TRAF6 qui induit l'activation des voies NF- κ B et c-Fos. L'activation de NF- κ B induite par RANKL stimule l'expression de NFATc1 au cours de la différenciation OC (ASAGIRI et TAKAYANAGI, 2007). Les inhibiteurs de NF- κ B préviennent l'induction de NFATc1 induite par RANKL lors de la formation des OCs (TAKATSUNA, et al., 2005). Si le rôle essentiel de NFATc1 dans la différenciation OC induite par NF- κ B a bien été démontré, en particulier dans le processus de fusion conduisant à la formation des cellules multinucléées, le rôle de NFATc1 dans l'activité de résorption des OCs induite par NF- κ B n'a pas été clairement établi.

L'activation nucléaire de NFATc1 est dépendante de la signalisation calcique. Celle-ci est activée par la signalisation RANKL, associée à une voie de co-stimulation comportant des molécules adaptatrices tq FcR γ et DAP12 contenant un motif ITAM (immunoreceptor

tyrosine-based activation motif) dont la phosphorylation est cruciale pour l'activation de la signalisation calcique (NEGISHI-KOGA et TAKAYANAGI, 2009). L'élévation du Ca^{2+} cytosolique agit sur la calmoduline qui stimule l'activité d'une phosphatase, la calcineurine. NFATc1 est présent sous forme inactivé dans le cytosol dans un état phosphorylé. Son activation nécessite sa déphosphorylation par la calcineurine, qui déphosphoryle de multiples résidus sérine, exposant ainsi un signal de localisation nucléaire qui permet la translocation nucléaire de NFATc1 (RAO, et al., 1997).

Un rôle de la voie Wnt dans les cellules OC a récemment été mis en évidence, agissant comme une autre voie de co-stimulation dans ces cellules. Si la voie canonique Wnt (dépendante de la β -caténine) dans les cellules OB stimule la production d'OPG et diminue celle de RANKL, contribuant à l'inhibition de la différenciation et de l'activation des cellules OC, certaines protéines de la voie Wnt non-canonique (indépendante de la β -caténine) ont un effet direct sur les OCs. Les protéines Wnt5a et Wnt11 se lient à un complexe-récepteur comprenant un récepteur « frizzled » et un récepteur tyrosine-kinase-like (Ror 1/2) exprimé par les OCs. Cette voie de signalisation active la polarité cellulaire en stimulant la phosphorylation de JNK induite par RANKL, de même que la signalisation calcique via des signaux dépendants de PKC et de la calcineurine. Wnt5a et Wnt11 ont une action directe sur les précurseurs OC et stimulent leur différenciation (TAKAHASHI, et al., 2011). L'activation de NFATc1 par cette voie n'a pas été démontrée dans les OCs, mais l'activation de la signalisation calcique et de la calcineurine suggèrent que la voie Wnt non-canonique pourrait y contribuer (Fig. 10).

Après translocation nucléaire de NFATc1, son activité transcriptionnelle nécessite la présence d'autres partenaires nucléaires tels que AP-1, c-Fos, MITF, PU.1, ou CREB (cyclic AMP-responsive element-binding protein) (NEGISHI-KOGA et TAKAYANAGI, 2009). NFATc1 complexé induit la transcription de gènes spécifiques qui modulent l'activation des OCs : TRAP, CTR, OSCAR (osteoclast-associated receptor), cathepsine K, C1CL7 et $\beta 3$ intégrine (NEGISHI-KOGA et TAKAYANAGI, 2009; SONG, et al., 2009).

À l'inverse, les kinases p38 MAP kinase (MAPK14), JUN N-terminal kinase (MAPK8), les caséines kinases 1 et 2 (CK1, CK2), et la glycogène synthétase kinase 3 β (GSK3 β) phosphorylent NFATc1, conduisant à son inactivation et son transfert rapide hors du noyau (MURPHY et HUGHES, 2002; PORTER, et al., 2000).

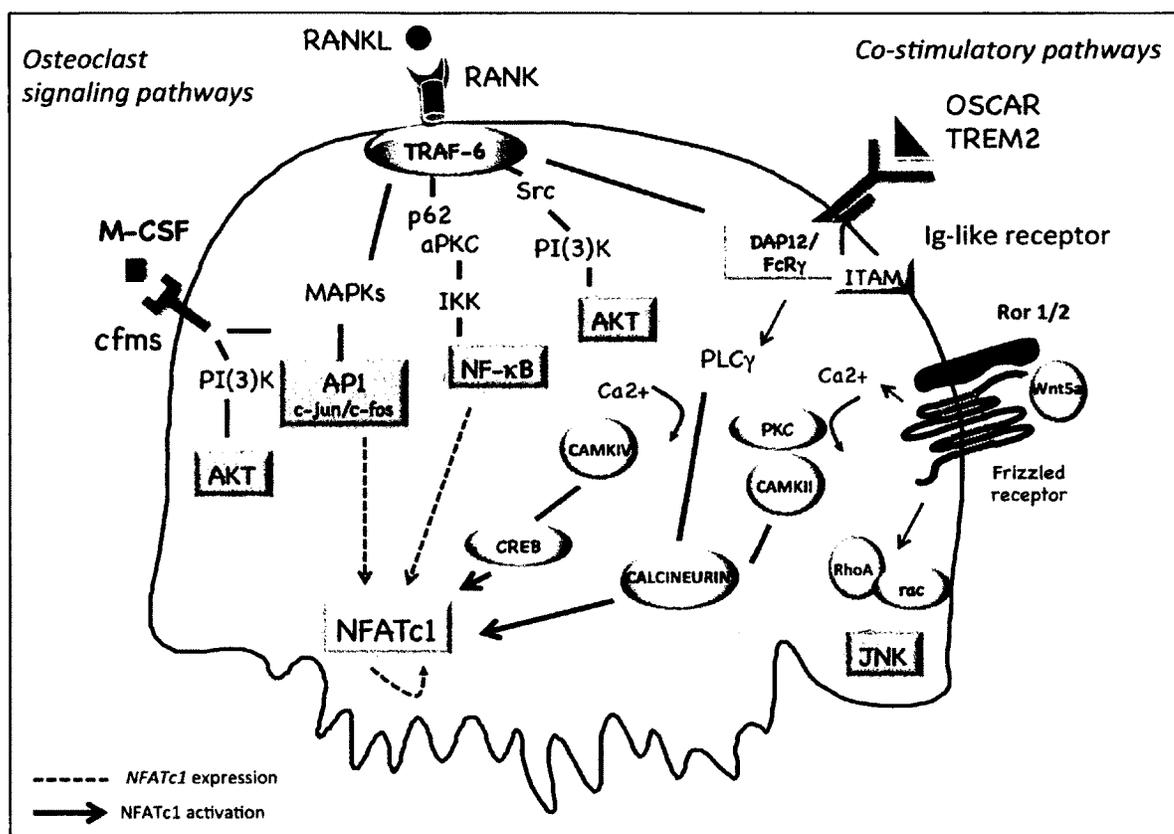


Figure 10. Signalisation intracellulaire impliquant l'activation de NFATc1 dans l'OC.

Les OCs et leurs précurseurs expriment RANK, récepteur pour RANKL dont la production provient des OBs et ostéocytes dans le microenvironnement osseux. L'interaction entre RANK et RANKL entraîne la formation d'un complexe de signalisation qui comprend TRAF6, et qui induit différentes cascades de signalisation, stimulant l'expression de NFATc1 via d'autres facteurs de transcription: AP-1 et NF- κ B.

L'activation du facteur de transcription NFATc1 dépend de la voie du calcium elle-même stimulée par RANKL et une voie de co-stimulation faisant intervenir la phosphorylation de protéines adaptatrices exprimant le motif ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif). La voie calcique induit l'interaction de la Ca^{2+} /calmoduline kinase IV (CaMKIV) et active CREB (cAMP response element-binding protein), facteur également important dans la différenciation de l'OC. La signalisation calcique induit l'activité phosphatase de la calcineurine qui déphosphoryle la protéine NFATc1. Cette déphosphorylation permet la transcription de gènes cibles du facteur de transcription NFATc1.

Le rôle de la voie non-canonique Wnt activée par les protéines Wnt5a et Wnt 11 dans l'activation de NFATc1 reste à définir dans l'OC.

Figure adaptée de (McMANUS, S., BISSONNETTE, L., ROUX, S. 2012).

5. LA MALADIE OSSEUSE DE PAGET

5.1 Généralités et épidémiologie de la maladie de Paget

La maladie osseuse de Paget a reçu le nom d'un médecin britannique, Sir James Paget, le premier à décrire la maladie en 1876. Cette pathologie osseuse touche 3 à 4 % des sujets âgés de plus de 40 ans, avec un sex-ratio légèrement en faveur des hommes. Sa fréquence augmente avec l'âge de 1-2 % après 55 ans, à plus de 9 % après 80 ans au Royaume Uni. L'incidence de la maladie varie d'un pays à l'autre, plus élevée en Angleterre et pratiquement absente au Japon (POOR, et al., 2006; RALSTON et LAYFIELD, 2012) (Tableau 1).

La maladie de Paget est la deuxième maladie métabolique osseuse la plus fréquente après l'ostéoporose. Elle se caractérise par un renouvellement osseux anarchique et excessif avec deux étapes successives : une résorption ostéoclastique intense, puis une formation osseuse rapide et désordonnée, conduisant à un os fragile, hypertrophique, et hypervascularisé (SEITZ, et al., 2009).

Tableau 1 : Distribution géographique de la maladie de Paget.

Incidence élevée	Grande Bretagne, États Unis, Canada, Australie, Nouvelle-Zélande, Allemagne, France
Incidence faible	Scandinavie, Suisse, Japon, Chine, Pays de l'Est et Afrique

Adapté de (CHUNG et VAN HUL, 2012; POOR, et al., 2006; RALSTON et LAYFIELD, 2012)

La maladie de Paget est souvent asymptomatique et peut n'être découverte que par hasard sur des radiographies prises pour une autre raison. 30 % des patients ressentent des douleurs osseuses, ou présentent d'autres symptômes associés à la maladie : déformation osseuse, fracture, arthrose secondaire, compression neurologique et/ou une surdité, et dans moins de 1% des cas, la possibilité d'une transformation sarcomateuse (SETON, et al., 2011; SINGER, 2009).

L'évolution de la maladie est progressive avec transformation de l'os sain en os pagétique à plusieurs sites du squelette; l'atteinte osseuse s'étend au tissu osseux voisin du même os, mais il n'y a pas de nouveau site osseux au cours de l'évolution, et le squelette n'est jamais atteint en totalité.

L'étiologie de la maladie de Paget est mal connue, et serait multifactorielle, avec deux principales contributions, une composante génétique et une composante environnementale. Une origine virale a été évoquée de longue date sur la base de la présence d'inclusions nucléaires et cytoplasmiques dans les OCs pagétiques, très similaires aux nucléocapsides des paramyxovirus à ARN tels que les virus lents de la rougeole ou du virus respiratoire syncytial. Toutefois, la présence d'une infection par paramyxovirus dans les OCs pagétiques reste très controversée (RALSTON et LAYFIELD, 2012). En revanche, de nombreux travaux ont souligné la forte composante génétique dans la maladie de Paget, avec un fréquent contexte familial, et une association de cette maladie à plusieurs loci de susceptibilité (ALBAGHA, et al., 2010; ALBAGHA, et al., 2011; HOCKING, et al., 2001; LAURIN, et al., 2001). Plusieurs gènes pourraient être en cause, toutefois des mutations n'ont été rapportées que dans le gène *SQSTM1* codant pour p62 (séquestosome 1) (HOCKING, et al., 2002; LAURIN, et al., 2002; MORISSETTE, et al., 2006). Une trentaine de mutations du gène *SQSTM1/p62* ont été identifiées dans la maladie de Paget, la substitution P392L dans la protéine p62 étant la plus fréquente (dénommée « p62 p.P392L » dans le texte), et toutes sont localisées dans le domaine UBA de p62. Ces mutations sont présentes dans environ 30% des formes familiales, et 10% des cas sporadiques (CHUNG et VAN HUL, 2012). L'existence de mutations dans le gène *SQSTM1/p62* dans une forte proportion de patients atteints de la maladie de Paget, suggère un rôle critique de cette protéine dans la régulation de la physiologie osseuse, et dans la pathogénie de la maladie de Paget.

Compte tenu de l'augmentation importante du remodelage osseux, avec une résorption osseuse prédominante dans les phases initiales, le traitement de la maladie de Paget est basé sur l'utilisation d'inhibiteurs de la résorption osseuse, les bisphosphonates. Les bisphosphonates diminuent la résorption osseuse par un effet direct sur les OCs, induisant leur apoptose, et par le fait même diminuent le remodelage osseux (SINGER, 2009). Le bisphosphonate le plus utilisé actuellement est un aminobisphosphonate hétérocyclique, l'acide zolédronique. Ce médicament a fait la preuve de son efficacité dans le contrôle métabolique de la maladie de Paget, avec un effet sur les douleurs et la progression de la maladie. Il s'administre par voie intra-veineuse, et une seule perfusion peut suffire pour contrôler la maladie pendant plusieurs années (SINGER, 2009). Toutefois, ni les bisphosphonates ni aucun autre traitement ne permettent de prévenir les complications à long terme, justifiant la nécessité de poursuivre la recherche sur la pathogénie de la maladie, afin de mieux comprendre cette pathologie et d'ouvrir de nouvelles avenues thérapeutiques.

5.2 Particularités des ostéoclastes dans la maladie de Paget

La phase initiale de la maladie de Paget comporte une hyperactivation des OCs et une résorption osseuse massive, soulignant le rôle majeur de ces cellules dans le développement de la maladie. Les OCs ont une morphologie anormale, ils sont plus gros et possèdent un nombre de noyaux plus élevé que les OCs normaux. Leur activité est également augmentée et ils sont résistants à l'apoptose (CHAMOIX, et al., 2009; GOODE et LAYFIELD, 2010; HELFRICH et HOCKING, 2008) (Fig. 11). Les OCs pagétiques sont également plus sensibles à certains facteurs ostéoclastogéniques tels que RANKL ou la 1,25-(OH)₂D₃, et leur expression de TAFII-17, une protéine de liaison au VDR (Vitamin D receptor) est augmentée (KURIHARA, et al., 2004; MENAA, et al., 2000; MENAA, et al., 2000).

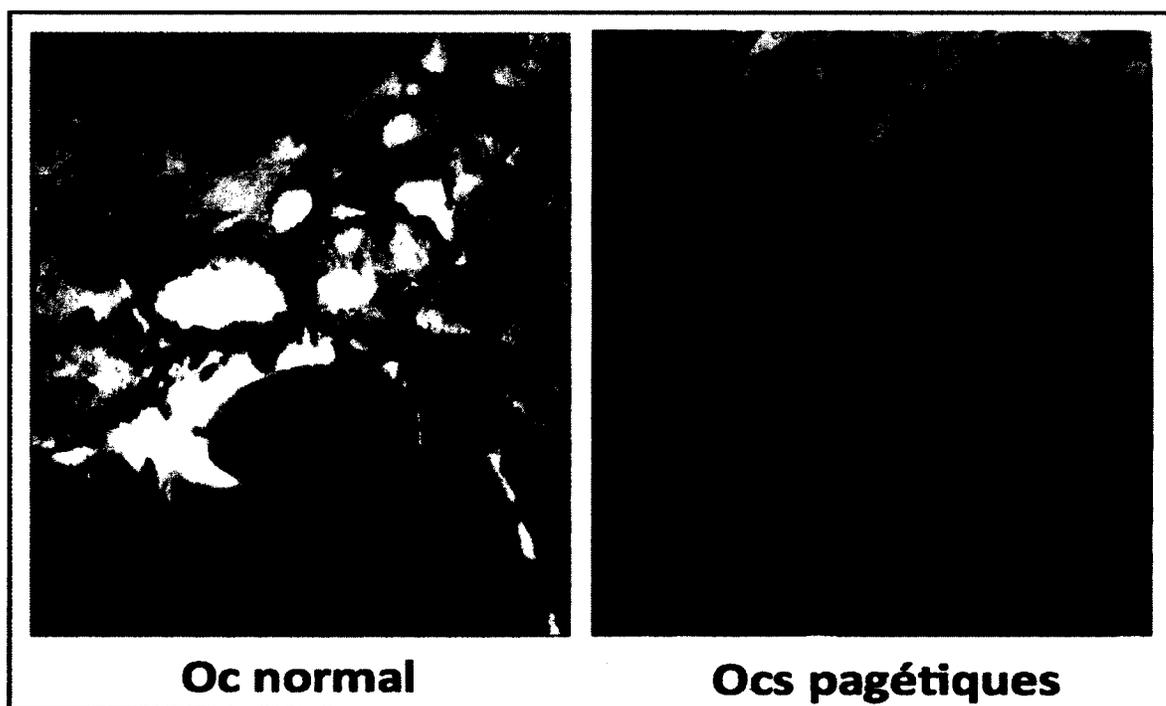


Figure 11. Ostéoclastes pagétiques.

À gauche, photographie d'un ostéoclaste normal (patient sain). À droite, photographie d'ostéoclastes pagétiques. (photographies de Sylvain Picard, GRMO, Québec)

5.3 Effets des mutations de *p62* sur les cellules osseuses de maladie de Paget

Plusieurs mutations du gène *SQSTM1/p62* ont été décrites dans la maladie de Paget, toutes situées dans l'exon 7 ou 8 codant pour une région de *p62* située à proximité ou dans le domaine UBA de la protéine, dont les mutations P392L, E396X, K378X, A390X, M404V/T, G411S, ou G425R (Fig. 12). Une des conséquences fonctionnelles de ces mutations est la perte de la capacité de *p62* à lier les protéines ubiquitinées, ce qui pourrait affecter la dégradation et le recyclage de certaines protéines (CAVEY, et al., 2006).

La mutation ou la délétion du domaine UBA de *p62* chez la souris a pour effet d'augmenter la formation OC (YIP, et al., 2006). Des souris transgéniques exprimant le gène *p62* p.P394L (équivalent de *p62* p.P392L chez l'homme) développent des lésions osseuses, semblables à celles de maladie de Paget (DAROSZEWSKA, et al., 2011). L'impact de la mutation *p62* p.P392L sur les cellules osseuses a été évaluée *in vitro*. La surexpression de *p62* p.P392L dans les cellules OBs augmente leur expression de RANKL. Les précurseurs OC porteurs de la mutation *p62* p.P392L sont hypersensibles aux facteurs d'ostéoclastogénèse comme RANKL et TNF α , et les OCs transfectés avec *p62* p.P392L ont une plus grande capacité de résorption osseuse (McMANUS et ROUX, 2012). Dans des modèles de cellules murines (RAW) transfectées, la surexpression de *p62* p.P392L, ou d'autres mutations de *p62* associées à la maladie de Paget augmente l'expression de cFos et de NFATc1, et l'activité NF- κ B et NFATc1 (REA, et al., 2006; SUNDARAM, et al., 2011). Enfin, une activité constitutive de NF- κ B a été observée dans les OCs pagétiques porteurs de la mutation *p62* p.P392L (CHAMOUX, et al., 2009).

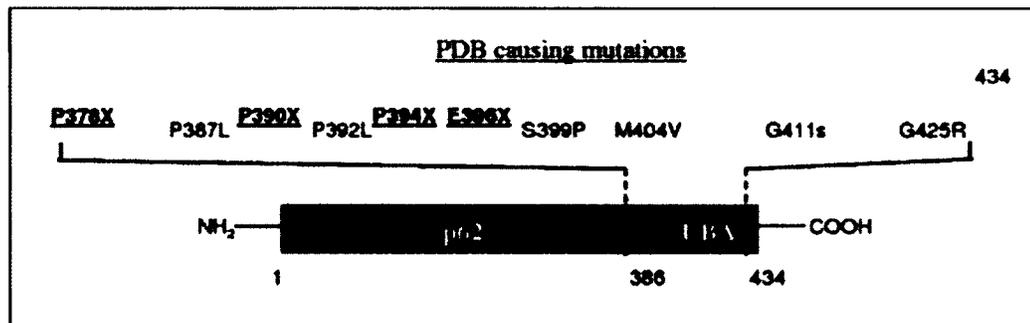


Figure 12. Mutations retrouvées dans le domaine UBA de la protéine *p62*.

Toutes les mutations rapportées dans la maladie osseuse de Paget se trouvent à proximité ou dans le domaine UBA de la protéine *p62*. La mutation *p62* p.P392L qui est étudiée dans notre laboratoire est la plus fréquente. *Figure adaptée de (YIP, et al., 2006).*

6- HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DU PROJET

Des mutations du gène *SQSTM1* codant pour p62 ont été identifiées dans la maladie de Paget. La protéine p62 est associée au complexe de signalisation induit par RANKL, facteur crucial impliqué dans la formation et l'activation des OCs. RANKL induit la formation d'un complexe multiprotéique contenant outre p62 et TRAF6, la kinase PKC ζ . Des travaux de notre laboratoire ont montré que *p62* p.P392L contribuait à l'activation des OCs via une signalisation impliquant PKC ζ et conduisant à une augmentation de l'activation de NF- κ B (CHAMOIX, et al., 2009). Nous avons fait l'hypothèse que NFATc1, autre facteur de transcription majeur de la formation et de l'activation des OCs, pourrait aussi être impliqué dans l'hyperactivation OC observée dans la maladie de Paget, ce d'autant que l'expression du gène de NFATc1 est stimulé par NF- κ B en réponse à RANKL au cours de la différenciation OC.

Pour répondre à notre question de recherche, trois objectifs avaient été définis :

1- Notre 1^{er} objectif était d'évaluer l'expression cellulaire et l'activation de NFATc1 dans les OCs pagétiques, et de les comparer aux valeurs obtenues dans les OCs de sujets sains.

2- Notre second objectif consistait à savoir si la PKC ζ , appartenant au complexe de signalisation induit par RANKL, était impliquée dans la signalisation de NFATc1. Pour ce faire l'évaluation de l'expression et de l'activation de NFATc1 ont été évaluées en présence d'un inhibiteur de PKC ζ , dans des cultures d'OCs.

3- Notre dernier objectif était de déterminer l'impact de la mutation *p62* p.P392L sur l'expression et l'activation de NFATc1.

Afin de répondre à ces objectifs, nous avons utilisé comme modèles *in vitro* des OCs dérivés soit de sang périphérique de patients ayant une maladie de Paget ou de sujets sains, porteurs ou non de la mutation *p62* p.P392L, ou des OCs dérivés de sang de cordon ombilical humain. Les monocytes isolés du sang sont placés en culture primaire et différenciés en OCs matures en présence des deux facteurs indispensables à la différenciation OC, RANKL et M-CSF. Après l'obtention d'OCs, différentes stimulations sont réalisées afin de répondre aux objectifs de notre étude. L'expression et l'activation de NFATc1 ont été évaluées après stimulation par RANKL, et en présence ou non d'inhibiteur de PKC ζ .

II- MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Réactifs utilisés

Les facteurs de croissance rhM-CSF et rhGM-CSF proviennent de R&D Systems, et RANKL est produit au laboratoire. L'inhibiteur de PKC ζ (myristoylated pseudosubstrate peptide inhibitor) provient de Calbiochem, le Ficoll-Paque de GE Healthcare (gradient de densité), le DMEM et les antibiotiques PSF de Wisent, l'Opti-MEM, FBS (fetal bovine serum), coloration bleue de Trypan 0.4% et le milieu de congélation de Gibco. La solution d'héparine (anticoagulant) vient de Sandoz, le MethoCult® H4534 classique de Stemcell technologies, la lipofectamine LTX d'Invitrogen™. Les anticorps pour les immunobuvardages (anticorps monoclonal de lapin anti-actine- β et anticorps secondaire anti-lapin-HRP) proviennent de Cell Signaling. L'anticorps monoclonal de souris anti-NFATc1 provient de BD Pharmingen (IF et immunobuvardage), l'anticorps secondaire IgG anti-souris de Amersham™ (GE Healthcare) (immunobuvardage) et l'Alexa fluor, IgG anti-souris de Molecular Probes (IF). Les solutions de blocage sont faites à partir de lait écrémé en poudre (carnation®) et de BSA de Wisent. La solution ECL+ provient de PerkinElmer, le Triton X-100 de Fisher Scientific (IF). Le kit RT-PCR provient de Roche, l'eau stérile ARNase Free de Wisent, les dNTPs d'Amersham biosciences, les oligo-d(T)₁₅ de Promega et les inhibiteurs d'ARNase d'Invitrogen™. Pour les essais luciférase les produits de Promega ont été utilisés.

2. Cultures cellulaires de cellules sanguines

2.1 Monocytes de sang périphérique

Les cultures primaires ont été réalisées à partir de cellules mononucléées isolées de sang périphérique de patients adultes, PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells). Différents sangs ont été utilisés, provenant de patients ayant une maladie osseuse de Paget et porteurs ou non de la mutation *p62* p.P392L, et de patients sains (appelés contrôles) avec ou sans la mutation *p62* p.P392L. Les prélèvements sanguins ont été réalisés après consentement éclairé et signé, chez des sujets de la cohorte du Dr J.P. Brown (Université Laval, Québec), tous préalablement génotypés pour la mutation du gène *p62* (LAURIN, et al., 2002), évalués cliniquement, et ayant eu des radiographies (sujets ayant une maladie de Paget) et une scintigraphie osseuse (négative chez les sujets sains, avec ou sans mutation). La cohorte comprenait 12 patients avec maladie de Paget, 8 sans mutation et 4 porteurs de la mutation *p62* p.P392L (74 ans en moyenne, 2/3 d'hommes), et 15 patients contrôles, 10 sans mutation et 5 porteurs de la mutation *p62* p.P392L (57.4 ans en moyenne, 1/3 d'hommes).

2.2 Monocytes de sang de cordon

Dans un autre modèle, des monocytes fœtaux provenant de sang de cordon ombilical (CBMs) ont été utilisés en culture primaire. Le consentement éclairé de femmes enceintes recrutées était d'abord requis. Immédiatement après l'accouchement, le sang du cordon est prélevé stérilement et recueilli dans un tube (Falcon) de 50 ml avec 300 μ l d'héparine (anticoagulant). Une quantité d'environ 20 ml de sang de cordon est obtenue. L'utilisation de CBMs facilite les expérimentations, car les cellules sont plus immatures avec un potentiel de différenciation plus élevé par rapport aux PBMCs, et la disponibilité de cette source est plus grande, grâce à une entente avec le service de maternité, avec un recrutement régulier (deux à trois échantillons de sang par semaine), comparativement au sang périphérique de patients.

2.3 Recueil des cellules

Le sang périphérique et le sang de cordon sont dilués à volume égal dans le milieu DMEM avec 1.2 % PSF (pénicilline, streptomycine et fungizone), la suspension est ensuite déposée délicatement sur la solution de Ficoll-Paque (environ 8 ml) et centrifugée 20 minutes sans frein à 2000 rpm. Les cellules leucocytaires sont séparées par gradient de densité. La suspension cellulaire de faible densité se localise à l'interphase au-dessus du Ficoll et en dessous du plasma (Fig. 13). Cette fraction cellulaire est ensuite récoltée à l'aide d'une pipette pasteur et mise en suspension dans du milieu DMEM. Après centrifugation d'environ cinq minutes à 1500 rpm, on obtient le culot cellulaire qui sera resuspendu dans de l'Opti-MEM 2 % FBS et 1.2 % PSF.

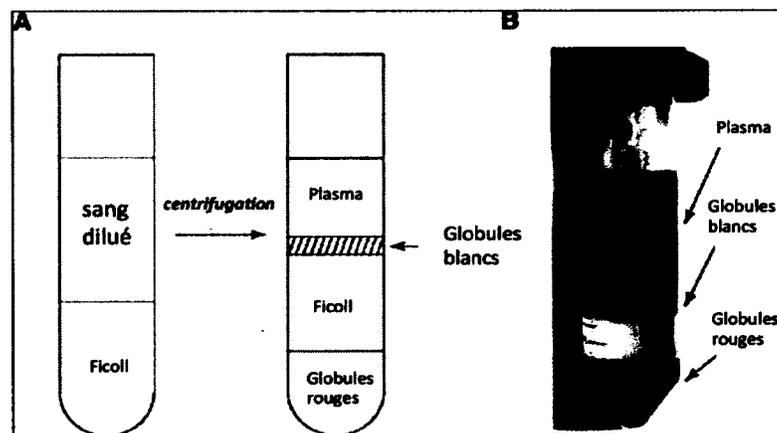


Figure 13. Isolement de monocytes de sang humain par gradient de densité. (A) Schéma montrant la séparation du sang par gradient de Ficoll. (B) Séparation adéquate du sang après centrifugation sur gradient de Ficoll. Les monocytes sont contenus dans l'anneau contenant les globules blancs. (Adapté de Lan K et al., *Currents protocols in microbiology*, 2007)

Un échantillon de cette suspension cellulaire est prélevé, auquel on ajoute 8% de solution NH_4Cl (4g) diluée dans 50 ml de PBS 1X. Ce produit permet de lyser les globules rouges et d'avoir un meilleur décompte cellulaire de globules blancs. Le décompte cellulaire est réalisé après traitement par le bleu de Trypan (un marqueur de viabilité cellulaire) à l'aide de l'hématimètre. La concentration cellulaire est ensuite ajustée à trois millions de cellules par ml, en complétant avec Opti-MEM 2% FBS et 1.2 % PSF, dans des tubes de 50 ml (Falcon), pour obtenir le volume approprié suite au décompte cellulaire et au nombre de plaques désirées en culture. Le M-CSF 25 ng/ml et le RANKL 100 ng/ml sont ajoutés à la suspension, facteurs de croissance et de différenciation essentiels à l'obtention d'OCs. Par la suite, les cellules sont cultivées en Lab-teks® (PBMCs) ou placées en MethoCult® pour le sang de cordon.

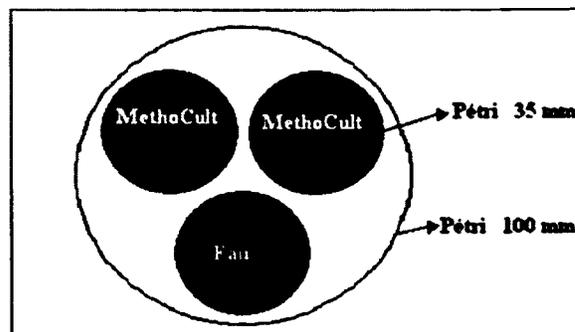
2.4 Culture cellulaire en milieu méthylcellulose

Un milieu semi-solide de méthylcellulose enrichi en facteurs de croissance (MethoCult®) a été utilisé pour permettre la croissance cellulaire de cellules non encore différenciées, et faciliter le développement des cellules souches immatures provenant du sang de cordon ombilical (HODGE, et al., 2004). Ce milieu stimule le développement de CFU-GM et facilite la prolifération des cellules mononucléées. Les cellules vont croître dans l'incubateur et leur nombre augmentera de 15 fois environ. Les cellules sont extraites du MethoCult® dix jours environ après la mise en culture.

Après décompte cellulaire, les cellules sont diluées dans l'Opti-MEM 2% FBS et 1.2 % PSF à 5×10^5 cellules par ml de MethoCult®. Cette solution est manipulée avec des seringues de 10 ml et des aiguilles de 16 G $\frac{1}{2}$ (grosseur de l'aiguille). Cinq ml de MethoCult® sont distribués dans des tubes (Falcon) de 50 ml. La suspension cellulaire est ajoutée dans les tubes et mélangée vigoureusement pour distribuer les cellules de manière homogène. Après avoir laissé reposer pendant dix minutes afin que les bulles formées lors de l'agitation soient éliminées, 1.1 ml de MethoCult® et de cellules sont distribués dans des boîtes de Pétri de 35 mm. Celles-ci sont placées par deux dans une grande boîte de Pétri de 100 mm avec une autre de 35 mm remplie d'eau (Fig. 14). Les boîtes de Pétri sont ensuite placées à 37°C avec 5% de CO_2 pendant dix jours.

Figure 14. Image de la mise en culture dans le MethoCult®.

Technique utilisée pour conserver les monocytes en MethoCult® et permettre leur multiplication.



2.5 Congélation des cellules

Les cellules qui n'ont pas été mises en MethoCult® sont congelées à une densité de 4 à 10 millions de cellules par ml, après avoir été placées dans un milieu de congélation (recovery™) en présence d'Opti-MEM 2% FBS et 1.2% PSF. Si les cellules ont été resuspendues dans un plus grand volume d'Opti-MEM, il suffit de les recentrifuger et de les resuspendre dans le milieu de congélation. Les cellules sont ensuite distribuées dans les tubes à congélation (PROGENE) et sont mises à -80°C dans un contenant à congélation (support de styrofoam). Le récipient contient de l'isopropanol (Fisher), un alcool qui prévient la congélation trop rapide des cellules. Après 24 heures, les cellules sont placées dans des boîtes identifiées à -80 °C et conservées.

2.6 Extraction du milieu semi-solide MethoCult®

Pour récupérer les cellules mononucléées du MethoCult®, on ajoute environ trois ml de PBS 1X (37°C) dans chaque boîte de Pétri. À l'aide d'une pipette 10 ml, la solution est dissoute délicatement en aspirant et rejetant celle-ci, puis les cellules sont recueillies dans un tube (Falcon) 50 ml. Afin de s'assurer qu'il n'y ait plus de MethoCult® et par le fait même de cellules dans le pétri, un deuxième lavage avec 2 ml de PBS 1X est réalisé (37°C). La centrifugation de la suspension cellulaire est faite dans un tube (Falcon) pendant 10 minutes à 1500 rpm, le culot cellulaire obtenu est suspendu dans 50 ml DMEM et 1.2% PSF. Après une deuxième centrifugation, le DMEM est ôté et les cellules sont remises en suspension dans environ 2 ml d'Opti-MEM 2% FBS et 1.2% PSF. Après décompte cellulaire, la concentration de cellules est ajustée à 5×10^5 cellules par ml, en complétant avec l'Opti-MEM 2% FBS et 1.2 % PSF, dans des tubes de 50 ml (Falcon) jusqu'au volume approprié. Le M-CSF 25 ng/ml et RANKL 100 ng/ml sont ensuite ajoutés pour permettre la différenciation des cellules mononucléées en OC (FONG, et al., 2013; HODGE, et al., 2004). Par la suite, les cellules sont distribuées dans des plaques (Falcon) (§6.6) ou des lab-teks® (§ 2.3).

3. Cultures cellulaires

3.1 Culture des PBMCs

Les cultures primaires de monocytes de sang de patients (PBMCs) sont disposées dans des plaques de 8 puits (Lab-tek®). Les cultures se font pendant 3 semaines en milieu Opti-MEM 2% FBS et 1.2 % PSF, et en présence de RANKL 100 ng/ml et M-CSF 25 ng/ml, afin de permettre la formation des OCs. Des changements de milieux sont effectués tous les 4 jours. À la fin de la troisième semaine, les cultures cellulaires sont placées dans l'OPTI-MEM 2% sans ajouter de RANKL ni M-CSF pendant 24 heures. Une journée plus tard, l'inhibiteur de PKC ζ (40 μ M) est ajouté dans les puits identifiés pendant 30 minutes à 37°C (Fig. 15). Une stimulation par RANKL (100 ng/ml) est ensuite réalisée dans les puits indiqués pendant 45 minutes à 37°C.

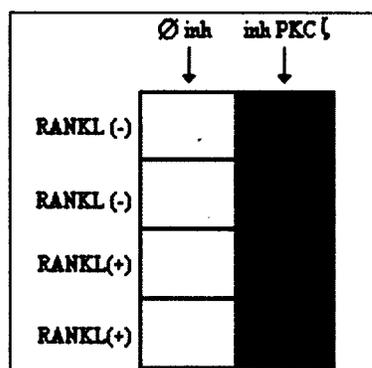


Figure 15. Plaque de 8 puits (Lab-tek®) utilisée pour la culture d'ostéoclastes.

Les cultures primaires de monocytes provenant du sang périphérique sont très délicates. C'est dans les plaques de 8 puits que ces cellules adhèrent le mieux. Dans ces plaques on étudie 4 conditions réalisées en duplicata.

3.2 Culture des CBMs

Les cellules provenant de sang de cordon ombilical et extraites du MethoCult® sont mises en culture dans des plaques de 12 puits (Falcon) pour une période de 10 jours en milieu Opti-MEM 2% FBS + 1.2 % PSF, en présence de RANKL 100 ng/mL, M-CSF 25 ng/mL, pour la formation des OCs. À la fin de la culture, diverses stimulations sont réalisées avec RANKL à différents temps et/ou différentes concentrations (Fig. 16).

Ces stimulations permettront la mise au point de la technique en immunobuvardage (§7), de la technique de PCR semi-quantitative (§8) et de la technique des essais luciférase (§9).

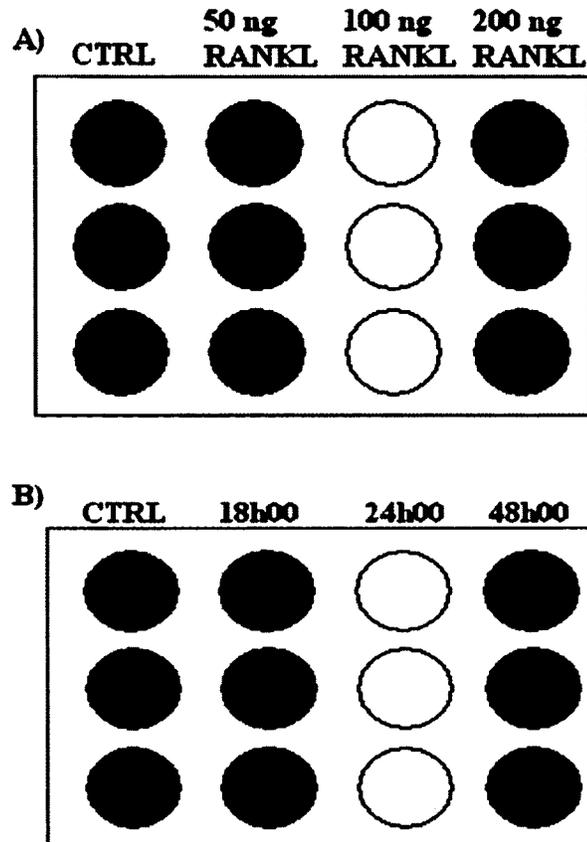


Figure 16. Culture *in vitro* de CBMs avec différentes stimulations par RANKL. Les expériences *in-vitro* sur les monocytes fœtaux sont réalisées dans des plaques de 12 puits. L'image représente le plan d'étude pour l'évaluation de l'effet de RANKL à différentes concentrations (A) et différents temps (B).

4. Fixation des cellules

À la fin des cultures (§2.3), les cellules sont fixées dans les Lab-tek® à l'aide d'une solution de paraformaldehyde (PFA) 1% pour les techniques d'immunofluorescence (IF). On recouvre les cellules de cette solution et on laisse pendant 15 minutes à température ambiante. Par la suite, on lave plusieurs fois avec du PBS 1X et on conserve les plaques dans le PBS 1 X à 4 °C. Les cellules fixées peuvent se conserver dans du PBS pendant quelques semaines avant leur utilisation.

5. Immunofluorescence (IF)

Après fixation des cellules, celles-ci sont perméabilisées avec 0.1 % de Triton X-100 pendant 10 minutes à température ambiante. Le Triton X-100 permet de perméabiliser la membrane des cellules pour favoriser l'entrée des anticorps dirigés contre des protéines

intracellulaires. On ajoute ensuite de la glycine 0.1 M pendant une heure à 4 °C. La glycine réagit avec l'excès de formaldéhyde, permettant le blocage des aldéhydes libres, et diminue ainsi l'auto-fluorescence. On bloque ensuite avec une solution de PBS 1X avec du lait écrémé en poudre (Carnation®) à 5%, afin de prévenir les liaisons non spécifiques des anticorps, et ce pendant 30 minutes à température ambiante. On ajoute ensuite l'anticorps primaire dirigé contre NFATc1, laissé toute la nuit à 4 °C (Tableau 2). La dilution de l'anticorps est faite dans du PBS 1X et du lait en poudre à 5%. Cet anticorps va alors se lier dans le cytosol et le noyau, là où se trouve la protéine NFATc1. Le lendemain, après avoir rincé 4 fois les préparations avec du PBS 1 X, on ajoute l'anticorps secondaire dilué (anti-souris, ALEXA fluor 546) dans du PBS 1 X et du lait en poudre à 5% (Tableau 2), pendant une heure à température ambiante. Cet anticorps est couplé à une protéine fluorescente (Alexa fluor 546) qui émet dans le spectre du rouge orangé. L'anticorps secondaire se lie à l'anticorps primaire et permettra de détecter la protéine étudiée en fluorescence. Les préparations avec l'anticorps fluorescent sont placées dans le noir, puisque cet anticorps est sensible à la lumière. La solution Hoechst 33258 est ensuite ajoutée, agent intercalant de l'ADN qui permet la détection des noyaux cellulaires (Tableau 2). Enfin, on prépare notre lame pour l'observer au microscope, en ajoutant à la surface de verre de la Lab-tek® une solution de montage composée de 50% de glycérol et 50% de PBS 1X, recouverte d'une lamelle, et scellée à l'aide de vernis à ongles transparent.

Tableau 2 : Anticorps utilisés en IF ainsi que leur dilution

Anticorps	Dilutions
Anti-NFATc1	1/500
Anti-souris-IgG (Alexa ®)	1/150
Hoechst 33258	1/10000

6. Microscopie à Fluorescence

Avec un microscope à fluorescence (Nikon Eclipse TE2000-U) on regarde l'état général de la lamelle. Le pourcentage de cellules OC ayant une immunolocalisation nucléaire de NFATc1 est ensuite déterminé. Une photo de la préparation est prise dans le filtre UV ($\lambda_{\text{excitation}} 365 \pm 12$ nm / $\lambda_{\text{émission}} \geq 397$ nm) pour détecter la coloration bleue des noyaux (Hoechst), puis une photo dans le filtre permettant de détecter la rhodamine ($\lambda_{\text{excitation}} 546 \pm 12$ nm / $\lambda_{\text{émission}} \geq 590$ nm) pour

la fluorescence de l'anticorps secondaire correspondant à NFATc1 (Alexa Fluor®546). Ensuite, on superpose les images avec le logiciel Simple PCI. On observe une coloration mauve ou rose des noyaux lorsqu'il y a co-localisation de NFATc1 dans le noyau. Le comptage se fait en deux étapes, on compte un total d'environ 30 OCs par puits (Lab-tek®) (cellules ayant trois noyaux et plus), et on détermine le nombre d'OCs ayant une immunolocalisation nucléaire de NFATc1. Chaque condition est évaluée deux fois (expérience en duplicata). Ceci permet de déterminer le pourcentage d'OCs présentant une localisation nucléaire, et donc une activation de NFATc1.

Un microscope motorisé a été utilisé pour prendre des images d'IF de manière aléatoire, afin d'empêcher des erreurs statistiques lors du comptage. Une série de cent images étaient prises par condition (§3.1). L'appareillage et le fonctionnement ont été effectués par le personnel de la plateforme du département de génétique (Éric Bouchard, technicien). Les calculs ont été effectués de la même façon décrite ci-dessus.

7. Transfert et immunodétection des protéines

7.1 Extraction protéique des cellules en culture

Afin d'extraire les protéines des cultures d'OCs, le milieu de chaque puits est aspiré à l'aide d'une pipette pasteur de verre. On ajoute ensuite du PBS 1X afin d'arrêter la stimulation par le RANKL. Une solution de tampon de lyse (1% de NP40 (Igepal), 1 M Tris HCl, 10% sodium deoxycholate, 5 M NaCl, 0,5 M EDTA, 200 mM de Na₄PP, 10% de SDS, 1 µg/ml d'inhibiteur de protéase, 1 mM NaVO₄, 1 mM NaF, pH 8) est alors appliquée. La lyse des protéines se fait sur glace où on laisse agir la solution pendant 10 minutes. On récolte ensuite le contenu cellulaire dans des tubes de 1,5 ml (Eppendorf) qui seront centrifugés à 13 000 rpm pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant contenant les protéines est ensuite conservé dans des tubes 1,5 ml à -20 °C.

7.2 Dosage des protéines

Il est important de déterminer la quantité de protéines extraites. Pour ce faire, on utilise des plaques de 96 puits (Fisher). Une solution contenant de la BSA 1mg/ml servira de standard. On ajoute en triplicata la solution de BSA diluée dans 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 µl d'eau nanopure dans un volume final de 10 µl (concentration entre 0 à 1mg/ml). On ajoute aussi 2 µl de la solution de lysat contenant les protéines en triplicata, diluée aussi dans 8 µl d'eau (Fig. 17).

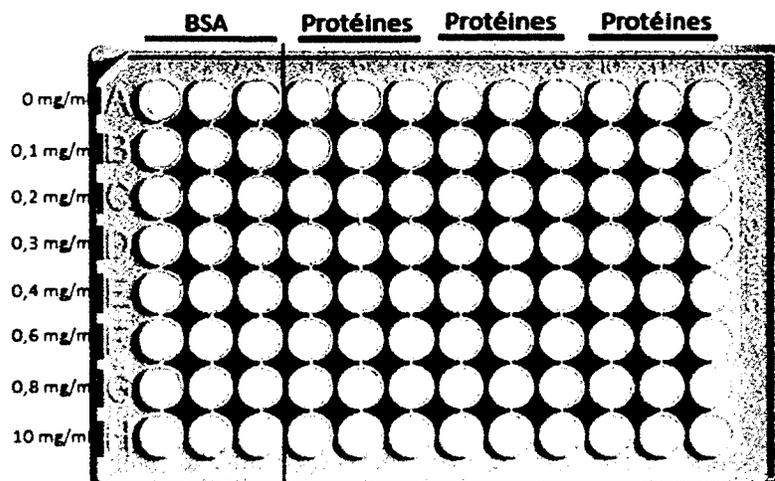


Figure 17. Dosage de protéine dans des plaques 96 puits

On utilise les trois solutions réactives (nommées A, B et S) pour dosage protéique (BioRad). On mélange 1 ml du réactif A avec 20 μ l du réactif S dans un tube de 1.5 ml. Ce mélange est ajouté à chaque puits dans une quantité de 20 μ l. Le réactif B est ajouté par la suite dans tous les puits à un volume de 200 μ l et on laisse agir pendant 5 min (jusqu'à ce que les puits changent de couleur et deviennent bleus). Les mesures sont faites avec un spectrophotomètre (lecteur de microplaque (Titertek Multiskan MCC/330)) à une longueur d'onde de 595 nm. Les résultats en absorbance des protéines sont déterminés et comparés à la courbe standard obtenue avec la BSA.

7.3. Immunobuvardages

Suite à l'extraction de protéines et à leur dosage, les immunobuvardages sont réalisés, permettant d'étudier l'expression des protéines d'intérêt (Tableau 3).

Tableau 3 : Anticorps utilisés en immunobuvardage ainsi que leur dilution

Anticorps	Dilutions	Référence
Anti- β Actine	1/500	Sigma # A2066
Anti-Lamine	1/500	Santa Cruz #sc-20681
Anti-NFATc1	1/500	BD pharmingen #556602
Anti-souris-IgG	1/10 000	GE Healthcare #NA931V
Anti-rabbit-IgG-HRP	1/10 000	Cell signaling #7074s

Une quantité de 30 µg de protéines est séparée sur gel SDS-PAGE 8% par électrophorèse. Les protéines sont suspendues dans un tampon d'échantillon (contenant 20% glycérol, 140 mM SDS, 2% β-mercaptoethanol, 150 mM bromophenol, 25% de tampon concentrateur (35mM SDS, 100 mM tris hydrochloride, pH 6.8)). Afin de voir les poids moléculaires des protéines, un standard Rainbow d'Amersham est utilisé.

On laisse migrer les protéines pendant 90 minutes à 130 volts ou 18 heures à 50 volts dans un tampon d'électrophorèse (250 mM tris base, 2000 mM glycine, 35 mM SDS). Les gels obtenus après électrophorèse sont transférés sur membrane de PVDF (Roche) ou de nitrocellulose (PerkinElmer). Un transfert semi-sec est effectué pour les membranes PVDF à l'aide d'un appareil à transfert Bio-Rad (Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell). On fait tremper les gels et les membranes dans du tampon de transfert (25 mM Tris base, 200 mM glycine, 3.5 mM, 20% méthanol) pendant 10 min. Trois papiers à chromatographie (Fisher) imbibés de tampon de transfert sont placés à la surface de l'appareil, puis on place la membrane, le gel et trois autres papiers à chromatographie. On laisse transférer les protéines 1 heure à 90 mA (pour deux gels ou 45 mA par gel). Le transfert des membranes de nitrocellulose est effectué dans une cuve contenant un litre de tampon de transfert. On place la membrane et le gel en sandwich entre quatre papiers à chromatographie (deux de chaque côté), pendant 4 heures à 400 mA à 4°C (pour deux gels).

Une fois le transfert terminé, les protéines se retrouvent à la surface des membranes. Une solution de blocage (TBS-Tween/BSA 2%) est ensuite appliquée pendant 1 heure. Par la suite, l'anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt (Tableau 3) est ajouté à la solution de blocage. Cette solution est scellée avec la membrane dans une enveloppe de plastique pendant une nuit sur plaque rotative (Thermolyne) à 4°C. Le lendemain, on effectue sur plaque agitatrice (Stovall) 3 lavages consécutifs des membranes au TBS-Tween 1X pendant 15 minutes à température ambiante. L'anticorps secondaire dilué dans du TBS-Tween 1X (Tableau 3) est ensuite ajouté aux membranes, 1 heure à température ambiante sur plaque agitatrice. Par la suite, on effectue encore 3 lavages de 15 minutes avec du TBS-Tween 1X.

La révélation est ensuite réalisée par chemiluminescence afin de détecter la liaison des anticorps (ECL(+)). La solution de révélation est ajoutée volume à volume sur les membranes de façon uniforme pendant une minute. La détection se fait sur film (Kodak ou Denville scientific inc) pendant différents temps d'exposition, allant de 5 secondes à 10 min (selon l'anticorps). L'intensité des bandes est mesurée avec le logiciel image J.

7.4 Restauration de la membrane

Il est possible de réutiliser les membranes 3 à 4 fois, suite à un premier immunobuvardage. Ceci permet d'exposer un anticorps différent sur une membrane contenant déjà des protéines. Pour ce faire, on incube les membranes dans du tampon NaOH 0.2 M deux fois 8 minutes à température ambiante, ce qui permet de déloger le ECL(+) ainsi que les anticorps primaires et secondaires. Les étapes de la section 7.3. peuvent alors être refaites.

8. Analyse par PCR quantitative

8.1 Extraction de l'ARN des cellules en culture

Les ARNs sont extraits à la fin des cultures à l'aide du kit d'extraction RNeasy de QIAGEN (directives du manufacturier). Leur concentration est déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre. Les ARN peuvent se conserver à -80°C et la qualité des ARNs peut se vérifier sur gel d'agarose 1% contenant du bromure d'éthidium (VWR). Si l'ARN n'est pas dégradé, on fait la réaction de transcription inverse.

8.2 Transcription inverse (RT-PCR)

La transcription inverse permet la synthèse d'ADNc (ADN complémentaire) à partir d'ARN. On réalise un mélange comprenant 10 µl de tampon AMV-RT 5X (Roche), de l'eau stérile ARNase Free, 20 mM dNTPs, 0.5 µg/ml oligo-d(T)₁₅, 40 U d'inhibiteur de RNase et 15 U d'enzyme AMV-RT. On mélange les réactifs avec l'ARN et on incube 1 heure à 42°C.

8.3 Analyse par PCR en temps réel

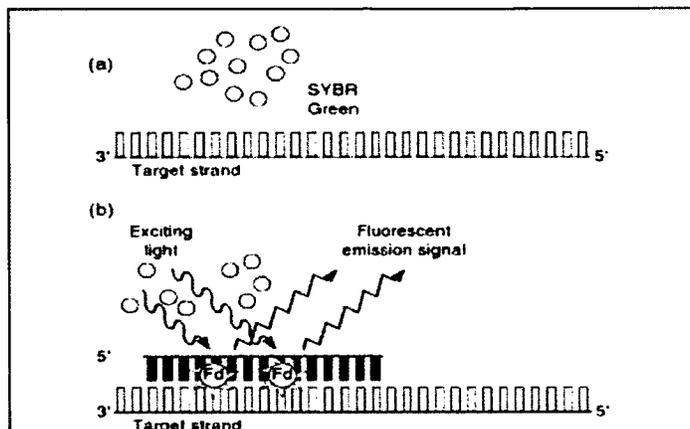
Pour faire l'analyse par PCR en temps réel, on utilise une solution SYBR Green I (Quanta). Ce réactif se lie à l'ADN double brin formé pendant la PCR. Le SYBR Green va émettre beaucoup plus de fluorescence lorsqu'il est lié à l'ADN double brin (Fig. 18). L'augmentation de la fluorescence au long du cycle est mesurée. SYBR Green I a une longueur d'onde d'excitation et d'émission des maxima de 494 nm et 521 nm, respectivement.

En pratique, on prépare tout d'abord une solution contenant 2X de SYBR Green, 100 ng/µl d'amorces sens (5'), 100 ng/µl d'amorces anti-sens (3'), et de l'eau stérile pour un volume final de 18 µl (par échantillon). Afin, d'éviter la dégradation des nucléotides et la contamination, on travaille sur glace et on utilise des tips filtrés (Axygen). On ajoute 2 µl d'ADNc à chaque échantillon. Un contrôle négatif ne contenant pas d'ADNc est aussi utilisé.

La PCR quantitative est faite à l'aide d'un appareil de base, un Roto-Gene™ 6000 de Corbett Life Science. L'expression relative est quantifiée de manière automatisée selon la méthode qBase (HELLEMANS et al., 2007), à partir du logiciel fourni par cet appareil.

Figure 18. Fonctionnement du SYBR green en Q-PCR.

(a) Utilisation de SYBR Green en Q-PCR pour détecter un gène. (b) Lorsque le SYBR green est lié à l'ADN double brin il y a émission de fluorescence. Figure adaptée de (*Molecular Biomehtods Handbook*, Editors: John M. Walker, Ralph Rapley, 2008)



Cette technique permet de mesurer l'expression d'un gène et l'abondance des transcrits produits par ce gène à un instant donné. Les gènes étudiés sont décrits (Tableau 4). L'appareil est réglé pour dix minutes à 95°C pour la dénaturation de l'ADNc. Ensuite, 40 cycles sont effectués : 40 s à 95°C (suite de la dénaturation), suivi de 40 s à 56°C (phase d'hybridation) et 40 s à 72°C (phase d'élongation). Les données sont entrées directement dans le logiciel de l'appareil et sauvegardées dans l'ordinateur.

Tableau 4 : Amorces utilisées pour la PCR en temps réel

Gènes	NCBI ID	Amorces	Séquences
<i>NFATc1</i>	4772	1 sens	5'-TGTGCCGGAATCCTGAAACTCAGA-3'
		anti-sens	5'-TCCCGTTGCAGACGTAGAAACTGA-3'
		2 sens	5'-GCATCACAGGGAAGACCGTGTC-3'
		anti-sens	5'-GAAGTTCAATGTCGGAGTTTCTGAG-3'
<i>GAPDH</i>	2597	sens	5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'
		anti-sens	5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3'
<i>MMP-9</i>	4318	sens	5'-GAGGTTTCGACGTGAAGGCGCAGATG-3'
		anti-sens	5'-CATAGGTCACGTAGCCCCACTTGGTC-3'

9. Essai luciférase

L'essai luciférase est une technique développée pour l'analyse fonctionnelle de facteurs de transcription, en utilisant un gène rapporteur (*luc*) codant pour la luciférase sous contrôle d'un promoteur possédant les éléments de réponse spécifiques des facteurs étudiés (séquences consensus permettant la liaison et l'activité du facteur de transcription). Ils sont largement utilisés pour évaluer l'activité de NF- κ B, facteur de transcription dont l'activation est stimulée par RANKL. Nous avons recherché dans la littérature les diverses techniques de transfection utilisées pour l'essai luciférase dans les OCs (KIM, et al., 2010; REA, et al., 2006).

9.1 Transfection des cellules

Pour les cellules sensibles comme les OCs, on ajoute 1.25 μ l de lipofectamine LTX (Invitrogen) pour 100 μ l d'OPTI-MEM 2% FBS. En plaque de 12 puits, 400 μ l de milieu transfectant sont nécessaires par puits. Pour une plaque de 24 puits on utilise 100 μ l de transfectant par puits. Dans un autre tube (Falcon de 15 ml) 1 μ g de plasmide contenant le gène rapporteur LUC sous contrôle d'un promoteur contenant les éléments de réponse spécifiques de NF- κ B ou NFAT (WILKINS, et al., 2004) est suspendu dans l'Opti-MEM 2% FBS. On mélange ensuite les deux solutions et on laisse agir pendant 30 min. Pour finir, on laisse 18 heures le transfectant incubé dans les cultures d'OCs différenciés.

9.2 Infection par lentivirus

Une infection par lentivirus des OCs a été effectuée pour l'expression des variants de p62 (*p62* p.P392L, *p62* UBA(del), *p62*wt), et en utilisant un vecteur vide (EV) comme contrôle. Cette technique est réalisée selon la technique de H. Garneau du département de biologie cellulaire (Université de Sherbrooke) (GARNEAU, et al., 2009).

Trois oligonucléotides sont générés après amplification de leur cDNA et sont sous-clonés dans le plasmide pLenti6/V5 entre les sites de restriction BamHI et ApaI, aboutissant aux constructions pLenti6/p62^{wt+}, pLenti6/p62^{P392L+}, and pLenti6/p62 ^{Δ UBA+}. Des lentivirus sont produits et utilisés pour l'infection cellulaire selon les recommandations de Invitrogen (ViraPower lentiviral expression system). Les cellules HEK 293T sont transfectées avec Lipofectamine2000 (Life Technologies, Inc.) pendant une nuit en présence de 6 μ g de vecteurs plasmidiques rétroviraux et 6 μ g de DNA amphotropique (gracieusement fourni par F. Boudreau, Université de Sherbrooke). Deux jours après la transfection, les surnageants sont filtrés et conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

À la fin des cultures d'OCs en présence de RANKL et MCSF, les cellules sont infectées pendant 48h avec le surnageant contenant les virus en présence de Polybrène à 8 µg/ml. Les OCs sont alors re-suspendus dans un milieu contenant M-CSF et RANKL, et analysés après 48 heures supplémentaires. Des cultures cellulaires infectées selon la même procédure avec des plasmides pLenti6/eGFP sont observées en microscopie à fluorescence permettant de déterminer la proportion d'OCs infectés.

9.3 Réaction Luciférase

Le principe de l'essai Luciférase est de mettre le gène de la luciférase, enzyme qui catalyse la luciférine avec une réaction lumineuse secondaire, sous le contrôle d'un promoteur possédant les séquences consensus pour la liaison de facteurs de transcription d'intérêt (NFATc1 et NF-κB dans notre étude). La réaction lumineuse est ainsi proportionnelle à l'activité transcriptionnelle de ces facteurs.

Après infection des OCs par les variants du gène *SQSTM1/p62* et le vecteur vide, et transfection par un plasmide contenant le gène *luc*, des stimulations par RANKL ont été réalisées à des concentrations de 0, 50, 100, et 200 ng/ml, et à des temps d'exposition de 5, 18, 20, et 24 heures. Les contenus cellulaires sont ensuite extraits après avoir laissé agir le tampon de lyse 1 X (Promega), 15 minutes avant de récolter les lysats. Ceux-ci peuvent être conservés à -80°C ou être analysés d'emblée avec un luminomètre (Sirius Single Tube Luminometer) qui permet de mesurer les intensités lumineuses. On utilise pour cela le réactif LAR II contenant la luciférine, substrat de la luciférase (Promega), ajouté à un volume précis (250 µl) dans les échantillons étudiés (20 µl). Les résultats sont obtenus en unités relatives de lumière (ou RLU). Un dosage protéique est effectué avec le reste des échantillons (§7.2.).

10. Analyse statistique

Tous les graphiques et les calculs de moyennes et d'écart-types ont été réalisés à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 5.03 pour Windows (GraphPad Software, San Diego USA, www.graphpad.com). Le test de Student pairé avec intervalles de confiance de 95 % a été effectué à l'aide de ce logiciel. Une valeur de $p < 0.05$ est considérée significative. Pour toutes les figures nous avons représenté les moyennes +/- SD (standard deviation ou écart-type).

III- RÉSULTATS

1. Effets de RANKL sur l'expression nucléaire de NFATc1 dans les OCs provenant de sujets contrôles ou pagétiques.

Afin d'évaluer l'activation de NFATc1 dans les OCs pagétiques, et d'approfondir la voie de signalisation (TRAF/PKC ζ /p62) qui conduit à l'activation de NF- κ B mais qui pourrait aussi intervenir dans celle de NFATc1, nous avons dans un premier temps étudié la translocation nucléaire de NFATc1, donc son activation, dans les OCs provenant de PBMCs de patients pagétiques ou de contrôles (sujets sains), porteurs ou non de la mutation *p62* p.P392L. Les PBMCs de sujets ont été cultivés *in vitro* et différenciés en OCs en présence de RANKL (100 ng/ml) et M-CSF (25 ng/ml). Après obtention d'OCs matures, les cultures ont été traitées par RANKL (45 min), et afin d'évaluer la contribution de PKC ζ dans l'activation de NFATc1 induite par RANKL, certaines cultures ont également été pré-traitées par un inhibiteur de PKC ζ (30 min). Chaque condition a été réalisée en duplicata.

1.1 Immunolocalisation de NFATc1 dans les OCs pagétiques *versus* contrôles

L'immunolocalisation de NFATc1 a été évaluée par Immunofluorescence (IF) indirecte, en utilisant un anticorps primaire de souris anti-NFATc1 humain et un anticorps secondaire anti-souris fluorescent (ALEXA Fluor 546). Les expériences ont été visualisées au microscope à fluorescence (Fig. 19).

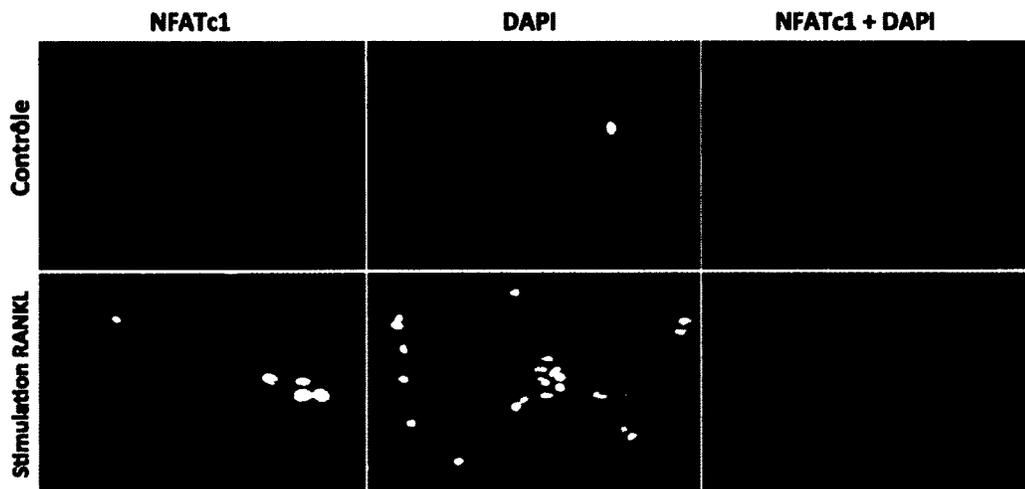


Figure 19. Immunolocalisation de NFATc1 dans les OCs : étude en IF. Les images illustrent l'effet de la stimulation de RANKL sur l'expression de NFATc1, présent soit dans cytosol ou, lorsqu'il est activé, dans le noyau (NFATc1 en rouge). Ligne supérieure : OCs contrôles, non stimulés par RANKL. Ligne inférieure : Localisation nucléaire de NFATc1 après stimulation par RANKL (40X).

Afin d'évaluer l'activation de NFATc1, basale ou induite par RANKL, dans les OCs, l'immunolocalisation de NFATc1 a été réalisée en IF, et la proportion de cellules OC ayant une expression nucléaire de NFATc1 a été déterminée (Fig. 20).

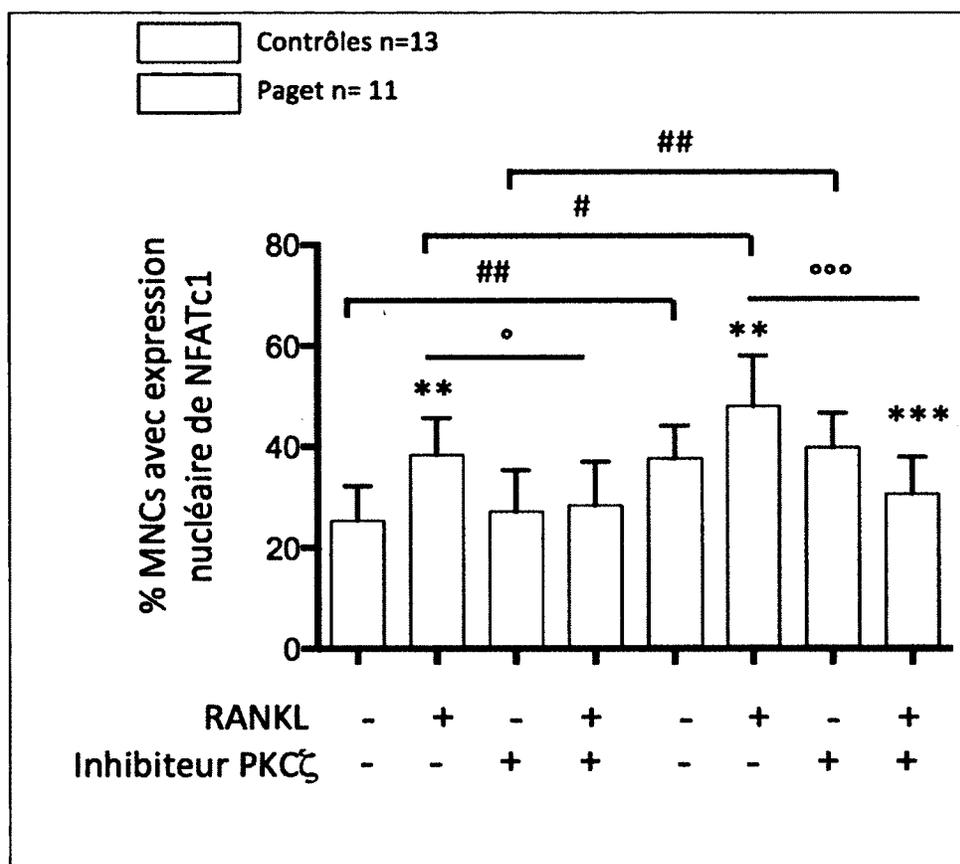


Figure 20. Effet de RANKL sur l'expression nucléaire de NFATc1 : Comparaison des OCs pagétiques et contrôles.

À la fin des cultures, les OCs provenant des PBMCs de sujets contrôles ou ayant une maladie de Paget sont stimulés ou non par RANKL (100 ng/ml pendant 45 min), en présence ou non d'inhibiteur de PKC ζ (n : nombre de sujets par groupe). L'expression de NFATc1 est étudiée par IF permettant de déterminer son immunolocalisation en utilisant un anticorps anti-NFATc1, révélé par un anticorps secondaire fluorescent. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules multinucléées ayant une expression nucléaire de NFATc1 (moyenne +/- déviation standard). **p<0.001, ***p<0.0001 (non traité vs RANKL); ° p<0.05, °°° p<0.0001 (présence d'inhibiteur vs sans inhibiteur de PKC ζ); # p<0.05, ## p<0.001 (sujets Paget vs contrôles).

Expression nucléaire de NFATc1 dans les OCs contrôles : L'activation basale de NFATc1 est déterminée par le pourcentage de cellules multinucléées (MNCs) ayant une localisation nucléaire de NFATc1 en l'absence de toute stimulation par RANKL. Cette activation est stimulée par RANKL avec une augmentation significative du pourcentage de MNCs ayant une expression nucléaire de NFATc1 (25.3% vs 38.4%, $p < 0.001$). L'activation basale est similaire en présence ou non d'inhibiteur de PKC ζ , en revanche l'activation de NFATc1 stimulée par RANKL est significativement diminuée en présence de l'inhibiteur, diminuant à des valeurs proches de l'activité basale, non stimulée, dans ces cellules (Fig. 20). L'induction de l'activation de NFATc1 par RANKL est déjà connue dans les OCs de rongeurs (KOMAROVA, et al., 2005; TAKAYANAGI, et al., 2002). Ces premiers résultats ne sont donc pas surprenants, mais permettent de valider notre modèle pour l'étude de NFATc1 dans les OCs humains. De manière intéressante, nous avons observé que l'inhibiteur de PKC ζ prévenait la translocation nucléaire de NFATc1 induite par RANKL, suggérant un rôle de cette kinase dans l'activation de NFATc1 dans les OCs, via le complexe de signalisation induit par RANKL.

Expression nucléaire de NFATc1 dans les OCs pagétiques: Comme dans les OCs contrôles, RANKL stimule l'activation de NFATc1 dans les OCs pagétiques (37.7 vs 48%, $p < 0.001$). L'inhibiteur de PKC ζ n'a pas d'effet sur l'activation basale de NFATc1 dans ces cellules, mais son augmentation induite par RANKL est complètement abolie, et diminue même de manière importante et significative en présence de l'inhibiteur (40% vs 30.7%, $p < 0.0001$). Par ailleurs, l'activation basale, non stimulée, de NFATc1 est significativement plus élevée dans les OCs pagétiques comparativement aux OCs contrôles (25.3% vs 37.7%, $p < 0.001$), de même que l'activation induite par RANKL (38.7% vs 48%, $p < 0.05$).

Ces résultats suggèrent que les OCs pagétiques ont une activation constitutive de NFATc1, encore augmentée par RANKL, et que la PKC ζ participe à cet effet dans les OCs pagétiques.

Par ailleurs, en l'absence de PKC ζ , RANKL a un effet inhibiteur sur l'activation de NFATc1 dans les OCs pagétiques, mais pas dans les OCs contrôles, suggérant que dans les OCs pagétiques, RANKL induit un facteur non déterminé inhibiteur de l'activation de NFATc1, dont l'action pourrait être bloquée par la PKC ζ (Fig. 20).

1.2 Impact de la mutation *p62 p.P392L* sur l'activation de NFATc1

Afin d'évaluer l'impact de la mutation *p62 p.P392L* sur l'activation de NFATc1, basale ou induite par RANKL, une analyse des résultats a été faite selon la présence ou non de cette mutation, en répartissant les sujets en 4 groupes, patients ayant une maladie de Paget ou contrôles, ayant ou non la mutation *p62 p.P392L*. L'analyse a été faite avec la réserve du faible nombre de sujets porteurs de la mutation (3 contrôles et 3 patients avec Paget) (Fig. 21)

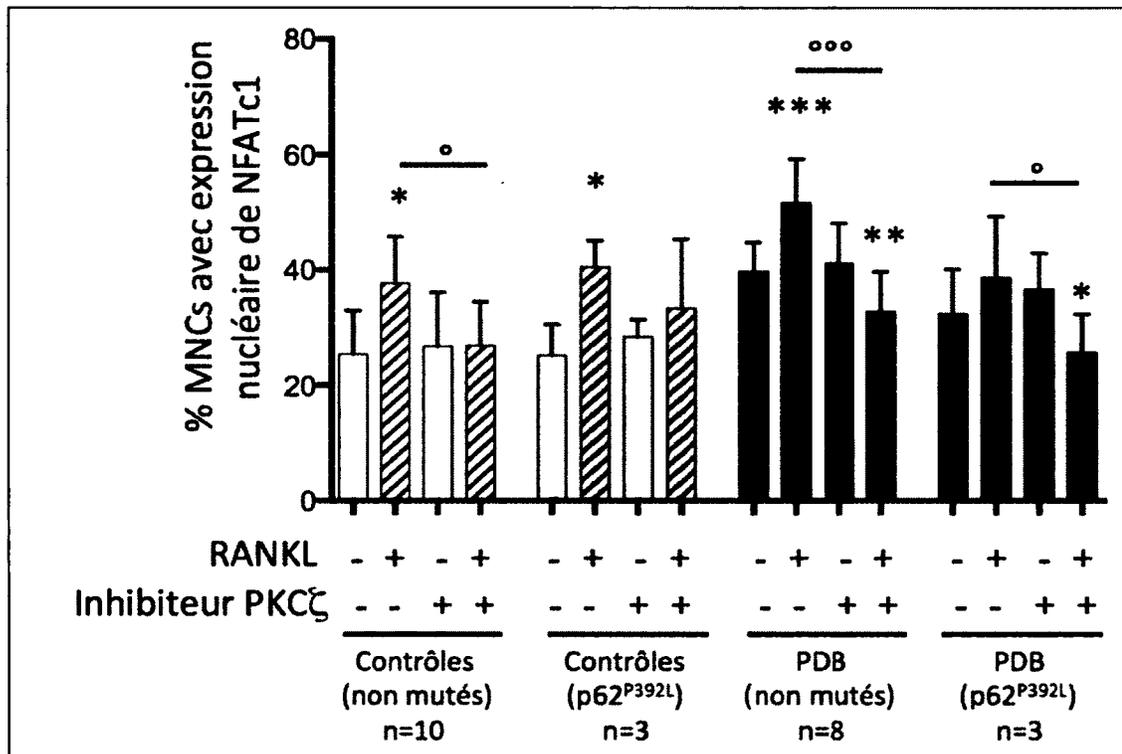


Figure 21. Effet de RANKL sur l'expression nucléaire de NFATc1 : Impact de la mutation *p62 p.P392L*

À la fin des cultures, les OCs provenant des PBMCs de 4 groupes (sujets contrôles ou ayant une maladie de Paget, porteurs ou non de la mutation *p62 p.P392L*) sont stimulés ou non par RANKL (100 ng/ml pendant 45 min), en présence ou non d'inhibiteur de PKC ζ (10 μ M 30 min) (n : nombre de sujets par groupe). L'immunolocalisation de NFATc1 est étudiée par IF en utilisant un anticorps anti-NFATc1, révélé par un anticorps secondaire fluorescent. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules multinucléées ayant une expression nucléaire de NFATc1 (moyenne +/- déviation standard). * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$ (non traité vs RANKL); ° $p < 0.05$, °°° $p < 0.0001$ (présence d'inhibiteur vs sans inhibiteur de PKC ζ).

Sujets contrôles porteurs ou non de la mutation *p62 p.P392L*: Le profil d'expression nucléaire de NFATc1 en condition basale ou après stimulation par RANKL apparaît similaire en présence de la mutation ou en son absence. En condition basale, donc en absence de traitement par RANKL, des pourcentages similaires de cellules multinucléées exprimant NFATc1 au noyau sont observés chez les sujets contrôles porteurs ou non de la mutation *p62 p.P392L*. La présence de l'inhibiteur de PKC ζ ne modifie pas ces pourcentages de manière significative. Après stimulation par RANKL (100 ng/ml), le pourcentage de cellules multinucléées exprimant NFATc1 au noyau tend à augmenter, de manière significative et de même amplitude en présence de *p62 p.P392L* ou en son absence (25.4% vs 37.7% en absence de *p62 p.P392L*; 25.2% vs 40.5% chez les sujets porteurs de *p62 p.P392L*). L'inhibiteur de PKC ζ prévient l'activation de NFATc1 induite par RANKL, de manière significative chez les sujets non mutés (37.7% vs 26.9%, $p < 0.05$). On observe une tendance à la diminution de l'activation de NFATc1 induite par RANKL en présence de la mutation, mais non significative, probablement du fait des grands écart-types dans ce groupe de 3 sujets.

Patients avec maladie de Paget porteurs ou non de la mutation *p62 p.P392L*: Chez les sujets pagétiques n'ayant pas la mutation, l'activation de NFATc1 est stimulée de manière significative par RANKL dans les OCs (39.7% vs 51.6% $p < 0.0001$), et l'inhibiteur de PKC ζ prévient cette stimulation, et même la diminue (41% vs 32.8%, $p < 0.001$). En présence de la mutation *p62 p.P392L*, on observe une tendance non significative à l'augmentation de l'activation de NFATc1 en présence de RANKL (32.4% vs 38.7%), et une diminution significative lorsque l'inhibiteur de PKC ζ est ajouté (36.6% vs 25.7%, $p < 0.05$). Toutefois, il n'y a pas de différence significative entre les valeurs basales et stimulées par RANKL en comparant chaque condition dans les cultures d'OCs ayant la mutation ou non. On soulignera encore la difficulté pour conclure du fait du faible nombre de patients porteurs de la mutation *p62 p.P392L*.

Comparaison des groupes Contrôles et Paget : Comme dans l'analyse précédente (Fig. 20), on observe les mêmes variations entre sujets contrôles et sujets ayant une maladie de Paget en l'absence de la mutation (Fig. 21), les sujets non mutés représentant la plus grande proportion des sujets de l'analyse poolée. Ainsi, une augmentation significative de l'activation basale de NFATc1 est observée dans les OCs pagétiques ($p < 0.001$), une augmentation significative de l'activation de NFATc1 stimulée par RANKL ($p < 0.01$), l'absence d'effet de PKC ζ sur

l'activation basale de NFATc1, et la prévention de l'effet en présence de l'inhibiteur de PKC ζ , avec une diminution significative dans les OCs pagétiques (résultats statistiques de la comparaison contrôles vs Paget non représentés sur la figure 21). En présence de la mutation *p62 p.P392L*, la comparaison des groupes contrôles et Paget ne permet pas de retrouver de différences significatives, mais les effectifs sont trop peu nombreux, avec des écart-types importants, pour permettre de conclure.

En conclusion, cette analyse ne permet pas de retrouver d'impact de la mutation *p62 p.P392L* sur l'activation de NFATc1 basale ou stimulée par RANKL dans les OCs.

2. Effet de RANKL sur l'expression protéique de NFATc1 dans les ostéoclastes provenant de sujets contrôles ou pagétiques

Après l'évaluation de l'effet de RANKL sur l'activation de NFATc1 (évaluée par la translocation nucléaire de la protéine), nous avons évalué l'expression protéique de NFATc1 dans les OCs de patients avec maladie de Paget ou de contrôles (sujets sains), porteurs ou non de la mutation *p62 p.P392L*. Pour ce faire, nous avons utilisé une technique d'immunobuvardage, consistant à quantifier la quantité de protéine NFATc1 dans les cultures d'OC, après avoir fait migrer les protéines extraites du lysat cellulaire en gel d'agarose, transféré les protéines sur une membrane, et appliqué un anticorps dirigé contre la protéine d'intérêt (NFATc1). Afin d'évaluer l'effet de RANKL sur l'expression de NFATc1, les cultures OC ont été préalablement stimulées par RANKL (100 ng/ml) pendant 45 min. Compte tenu du rôle de PKC ζ dans la signalisation RANKL et de son implication dans l'activation de NFATc1, nous avons également évalué sa contribution sur l'expression de NFATc1, en pré-traitant certaines cultures par l'inhibiteur de PKC ζ pendant 30 min avant stimulation par RANKL.

La protéine NFATc1 est composée de plusieurs isoformes de différents poids moléculaires, 3 isoformes principales ont été décrites, l'isoforme A (703 aa; 80-90 kDa), B (812 aa; 90-110 kDa), et C (930 aa; 100-120 kDa). Les isoformes B et C sont les plus abondantes dans l'OC humain (DAY, et al., 2005). L'anticorps monoclonal de souris anti-NFATc1 utilisé (7A6) reconnaît la région située entre les acides aminés 197-304 (spécifique pour NFATc1), et permet d'identifier plusieurs isoformes de PM 100-120 kD (BD Pharmingen).

Nous avons ainsi étudié l'expression de NFATc1 par immunobuvardage dans des cultures d'OCs provenant de sujets pagétiques et de contrôles, dans les conditions décrites précédemment (Fig. 22).

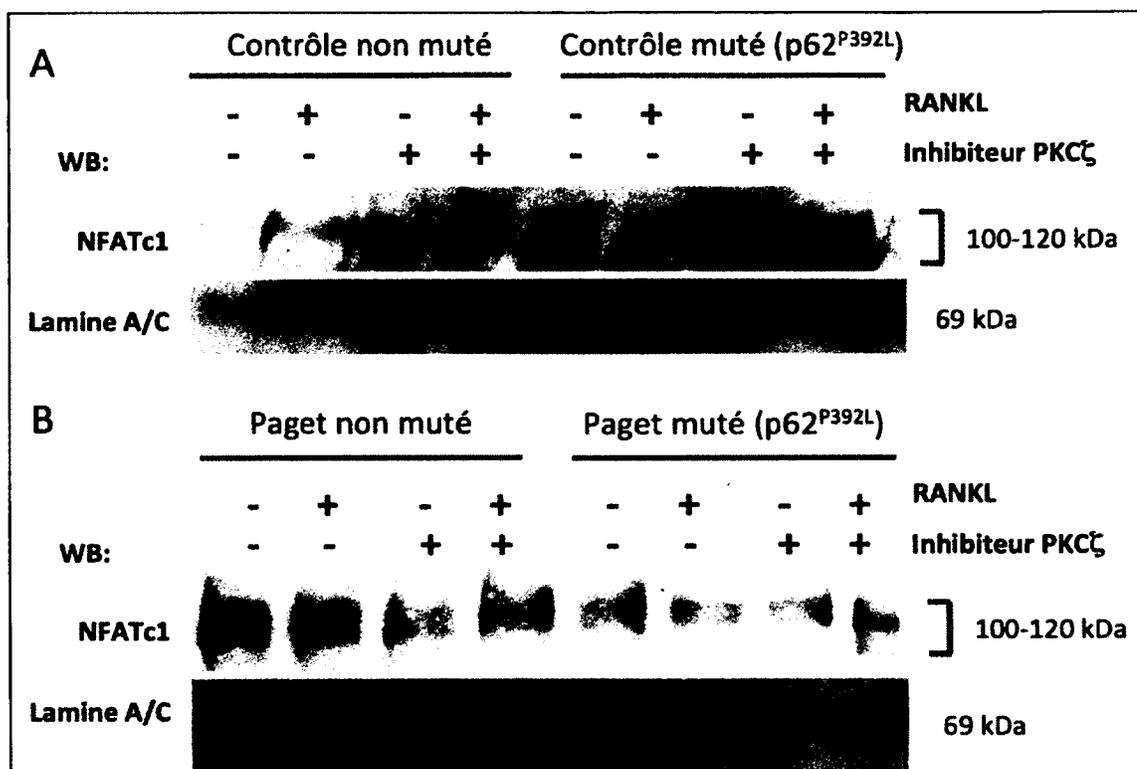


Figure 22. Étude par immunoblot de NFATc1 dans les OCs. À la fin des cultures, les OCs sont stimulés ou non par RANKL (100 ng/ml), après pré-incubation avec un inhibiteur de PKC ζ dans certains puits (10 μ M 30 min). Après extraction protéique, migration sur gel et transfert sur membrane, l'expression de NFATc1 est évaluée par immunoblot. La lamine est utilisée comme contrôle interne de la charge protéique. 4 groupes de cultures OC ont été étudiés, provenant de sujets contrôles avec ou sans mutation *p62 p.P392L* (A), ou de patients pagétiques (B).

L'évaluation de l'expression de NFATc1 par immunoblot a été effectuée chez 11 sujets (3 sujets par groupe, 2 dans le groupe Paget avec mutation). L'expression de NFATc1 et de la lamine a été quantifiée (Fig. 23).

L'étude par Western blot de NFATc1 est difficile d'interprétation compte tenu du faible nombre de sujets par groupe, et de la grande variabilité des résultats obtenus (écart-types). Par ailleurs les films obtenus à partir des gels n'étaient pas optimaux, avec beaucoup de bruit de fonds, ne permettant pas une visualisation adéquate des bandes d'intérêt.

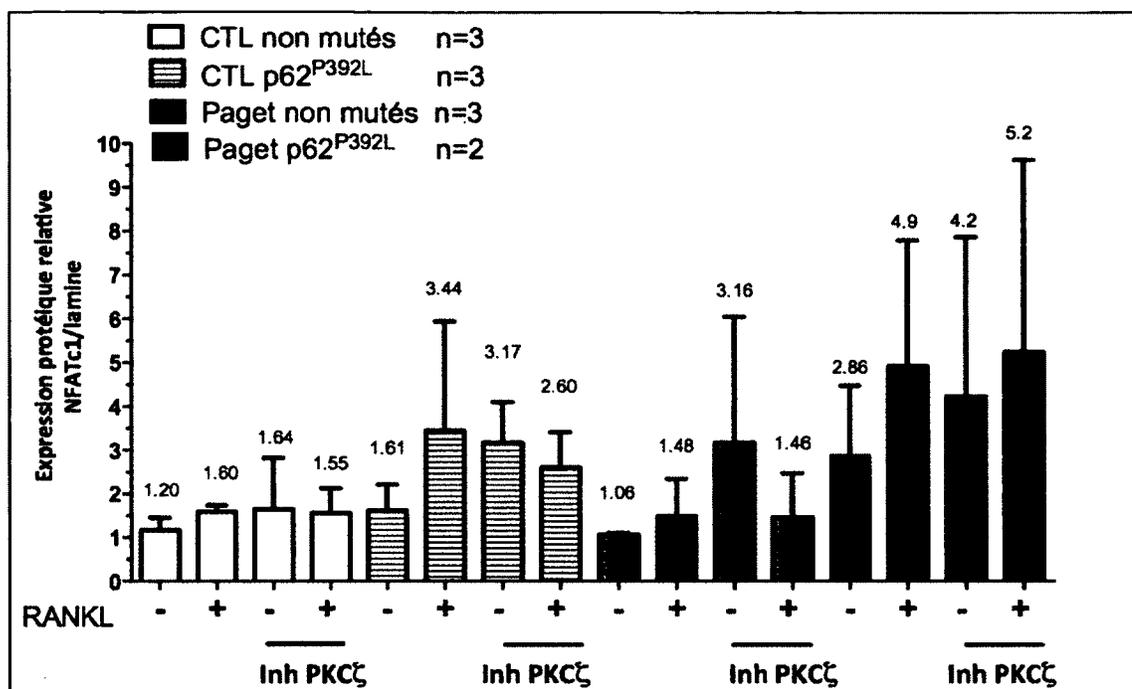


Figure 23. Effet de RANKL sur l'expression protéique de NFATc1 dans les OCs. À la fin des cultures, les OCs sont stimulés ou par RANKL (100 ng/ml), après pré-incubation avec un inhibiteur de PKCζ dans certains puits (10 μM 30 min). Les cultures d'OCs proviennent de sujets contrôles ou de patients ayant une maladie de Paget, tous génotypés pour la présence de la mutation *p62 p.P392L*. Par immunobuvardage, l'expression protéique de NFATc1 correspondant aux bandes de PM de 100-120 kDa visualisées par immunoblot a été quantifiée (ImageJ), et son expression a été rapportée à celle d'un contrôle interne (lamine) (moyenne +/- SD). Le «n» correspond au nombre de sujets par groupe.

On observe une tendance à l'augmentation de l'expression de NFATc1 en présence de RANKL, plus marquée chez les patients pagétiques, et globalement des taux d'expression de NFATc1 plus importants en présence de la mutation *p62 p.P392L*, sans impact significatif de l'inhibiteur de la protéine kinase Cζ. Ces résultats sont présentés comme préliminaires, l'analyse statistique n'étant pas concluante pour les raisons mentionnées ci-dessus.

Compte tenu des difficultés techniques rencontrées lors de l'étude des échantillons de patients disponibles lors de la réalisation de notre travail, et du temps de stimulation par RANKL non optimal d'après la littérature (stimulation de 24 à 48 heures nécessaires pour une modulation de l'expression de NFATc1 (TAKATSUNA, et al., 2005; TAKAYANAGI, et al., 2002)), la poursuite de travail a consisté à évaluer l'expression de NFATc1 au niveau mRNA et protéique dans les OCs dérivés de monocytes fœtaux (CBMs), et à déterminer les concentrations de RANKL et temps optimaux de stimulation pour l'analyse de ce facteur dans les OCs humains. Le but ayant été d'optimiser les conditions pour reprendre l'analyse de nouveaux échantillons protéiques de patients et contrôles dans des conditions optimales.

3. Expression génique de NFATc1 dans les OCs dérivés de CBMs : effet de RANKL

Afin de mieux caractériser l'effet de RANKL sur l'expression de NFATc1 dans les OCs humains, nous avons donc utilisé un modèle de différenciation OC validé dans notre laboratoire (FONG, et al., 2013; HOUDE, et al., 2009; McMANUS, et al., 2012), permettant l'obtention d'OCs humains à partir de monocytes du sang de cordon ombilical (CBMs), recueillis sur gradient de densité (§ II-2.3). Comme pour les PBMCs, les cultures sont faites en présence de RANKL et M-CSF pour la différenciation OC (§ II-3.2).

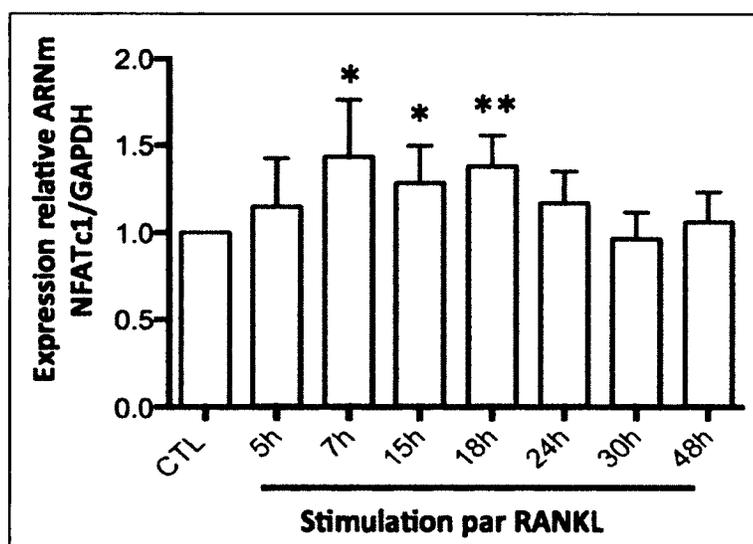
L'expression génique a été évaluée par PCR quantitative (Quantitative Polymerase Chain Reaction). L'ADNc est d'abord obtenu par transcription inverse de l'ARNm (RT), puis amplifié comme décrit (§ II-8). L'expression des ARN de NFATc1 a été normalisée à celle d'un contrôle interne, le gène de la GAPDH.

3.1- Expression génique de NFATc1 selon le temps de stimulation par RANKL

L'expression génique de NFATc1 dans les OCs matures a été évaluée à différents temps après stimulation par RANKL sur la base d'expériences antérieures faites chez la souris (TAKATSUNA, et al., 2005; TAKAYANAGI, et al., 2002). L'expression de NFATc1 a été évaluée à intervalles réguliers de 5 à 48 heures après stimulation par RANKL (100 ng/ml) (Fig. 24).

Figure 24. Expression relative de l'ARNm de NFATc1, après stimulation par RANKL pendant différents temps.

À la fin des cultures, les OCs matures ont été stimulés par RANKL (100ng/ml) et les ARNm ont été extraits des cultures après différents temps (0 (CTL non traité), 5 h, 7 h, 15 h, 18 h, 24 h, 30 h et 48 h). Après RT et amplification des ADNc avec des amorces spécifiques pour les gènes codant pour NFATc1 et GAPDH, l'expression de NFATc1 était rapportée sur celle de GAPDH (contrôle interne). Les résultats sont présentés comme l'expression relative du gène de NFATc1 normalisée à celle du contrôle (moyenne +/- SD). 3 expériences indépendantes ont été réalisées, chacune en duplicata. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, CTL (non traité) vs RANKL (t-test pairé).



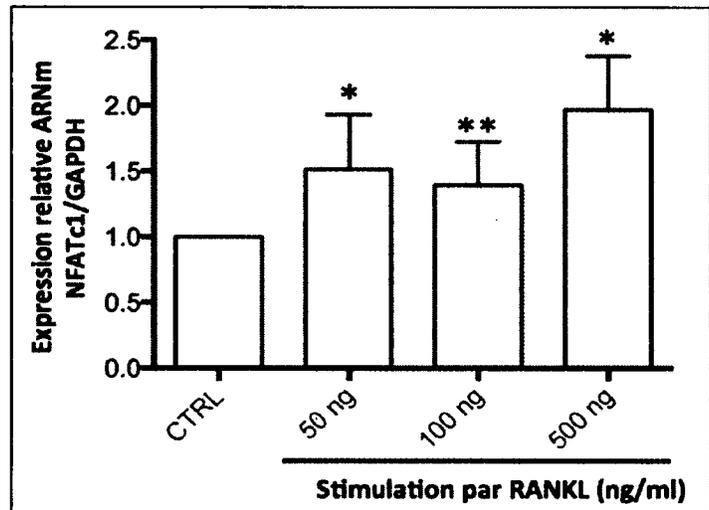
Suite à la stimulation par RANKL, on observe une augmentation significative de l'expression du gène de NFATc1 après 7, 15 et 18 heures comparativement au contrôle non traité, avec une augmentation de 1.44 après 7 h, 1.28 après 15 h et 1.38 après 18 h.

3.2- Expression génique de NFATc1 selon la concentration de RANKL

L'effet de RANKL sur l'expression génique de NFATc1 a également été évalué selon diverses concentrations de RANKL. Pour ce faire, le temps de stimulation de 18 heures a été utilisé, du fait des résultats optimaux obtenus à ce temps (§ III-3.1). Les concentrations de RANKL utilisées étaient de 50, 100, et 500 ng/ml (Fig. 25). L'expression génique de NFATc1 a été évaluée par Q-PCR comme précédemment, avec l'analyse concomitante de l'expression génique de la GAPDH (contrôle interne). Nous avons également évalué l'expression de l'ARNm de MMP-9 (contrôle positif).

Figure 25. Expression relative de l'ARNm de NFATc1, après stimulation par RANKL à différentes concentrations.

À la fin des cultures, les OCs matures ont été stimulés par RANKL (0, 50, 100 et 500 ng/ml) et les ARNm ont été extraits des cultures après 18 h. Après RTT et amplification des ADNc avec des amorces spécifiques pour les gènes codant pour NFATc1 et GAPDH, l'expression de NFATc1 était rapportée sur celle de GAPDH (contrôle interne). Les résultats sont présentés comme l'expression relative du gène de NFATc1 normalisée à celle du contrôle (moyenne \pm SDD). 5 expériences indépendantes ont été réalisées, chacune en duplicata. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, CTL (non traité) vs RANKL (t-test pairé).



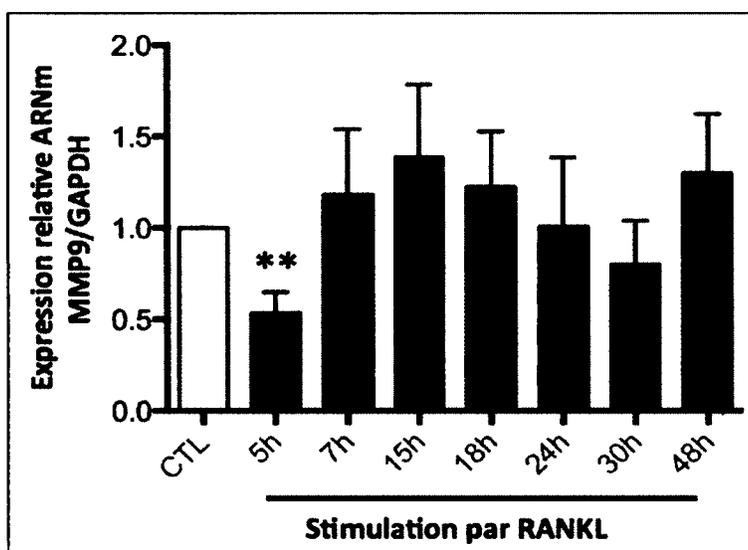
On observe une augmentation significative de l'expression génique de NFATc1 18 heures après stimulation par différentes concentrations de RANKL, sans effet dose notable (pas de différence significative entre les différentes concentrations). L'expression relative de l'ARNm de NFATc1 était de 1.5 pour 50 ng/ml, 1.4 pour 100 ng/ml et de 2 pour 500 ng/ml, comparativement aux cellules non traitées, et sont en accord avec nos premières données (Fig. 24). Donc ces résultats confirment que RANKL stimule l'expression génique de NFATc1.

3.3 Effet de RANKL sur l'expression génique de MMP-9

L'expression du gène de la métalloprotéinase matricielle-9 (MMP-9), exprimée par les précurseurs OC et les OCs matures, étant connue pour être stimulée par RANKL dans les précurseurs OC de souris (lignée RAW), nous avons utilisé ce gène comme contrôle positif de la technique utilisée pour l'étude de NFATc1, et évalué son expression génique dans les OCs matures en parallèle aux expériences sur NFATc1 (SUNDARAM, et al., 2007).

Figure 26. Expression relative de l'ARNm de MMP-9, après stimulation par RANKL à différents temps.

À la fin des cultures, les OCs matures ont été stimulés par RANKL (100ng/ml) et les ARNm ont été extraits des cultures après différents temps (0 (CTL non traité), 5 h, 7 h, 15 h, 18 h, 24 h, 30 h et 48 h). Après RT et amplification des ADNc avec des amorces spécifiques pour les gènes codant pour MMP-9 et GAPDH, l'expression de MMP-9 était rapportée sur celle de GAPDH (contrôle interne). Les résultats sont présentés comme l'expression relative du gène de MMP-9 normalisée à celle du contrôle (moyenne +/- SD). 3 expériences indépendantes ont été réalisées, chacune en duplicata. ** $p < 0.01$, CTL (non traité) vs RANKL (paired t-test).

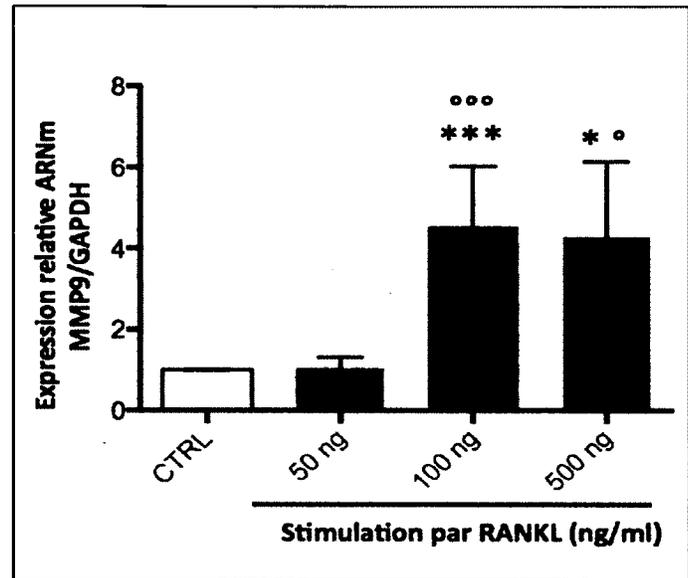


De manière surprenante, à la différence de ce qui est obtenu dans les précurseurs OC de souris, la stimulation par RANKL entraînait une diminution significative de l'expression génique de MMP-9 après 5 heures dans les OCs humains matures, avec une tendance à l'augmentation à des temps plus prolongés (15, 18 et 48 heures), mais non significative.

Les mêmes expériences ont été réalisées en étudiant l'expression génique de MMP-9 après stimulation par différentes concentrations de RANKL (Fig. 27).

Figure 27. Expression relative de l'ARNm de MMP-9, après stimulation par RANKL à différentes concentrations.

À la fin des cultures, les OCs matures ont été stimulés par RANKL (0, 50, 100 et 500 ng/ml) et les ARNm ont été extraits des cultures après 18 h. Après RT et amplification des ADNc avec des amorces spécifiques pour les gènes codant pour MMP-9 et GAPDH, l'expression de MMP-9 était rapportée sur celle de GAPDH (contrôle interne). Les résultats sont présentés comme l'expression relative du gène de MMP-9 normalisée à celle du contrôle (moyenne +/- SD). 5 expériences indépendantes ont été réalisées, chacune en duplicata. *** $p < 0.0001$, CTL (non traité) vs RANKL; °°° $p < 0.0001$, vs RANKL 50 ng/ml (paired t-test).



Ces résultats objectivent une stimulation de l'expression génique de MMP-9 après stimulation par RANKL à 18 heures aux plus fortes concentrations de RANKL. Le nombre restreint d'expériences pour l'évaluation du temps d'exposition à RANKL pourrait expliquer que l'effet n'est pas paru significatif dans les expériences précédentes (Fig. 26).

Nous avons réalisé ces expériences sur l'expression génique de MMP-9 pour valider la méthode utilisée, même si des résultats différents à ceux trouvés dans les précurseurs OC murins ont été retrouvés, en particulier une diminution de l'expression après 5 heures, l'augmentation de l'expression du gène de MMP-9 à des temps tardifs sont concordants avec ceux de la littérature et plausibles dans le contexte des OCs. Ceci permet raisonnablement de valider notre technique.

4. Effet de RANKL sur l'expression protéique de NFATc1 dans les ostéoclastes dérivés de CBMs

Après l'étude de l'expression génique de NFATc1 par Q-PCR, l'expression protéique de ce facteur et l'effet de RANKL sur cette expression ont été évalués dans les cultures d'OCs provenant de sang de cordon ombilical (CBMs), par immunobuvardage de type western. Notre but était là encore de définir les conditions optimales d'évaluation de ce facteur, en déterminant les concentrations et les temps d'exposition à RANKL pour lesquels la modulation de l'expression de NFATc1 est la plus importante.

L'analyse de NFATc1 en immunoblot est complexe du fait de la présence de plusieurs isoformes de différents poids moléculaires. L'expression des isoformes varie selon le type cellulaire. L'anticorps que nous avons utilisé pour les immunoblot est le monoclonal de souris 7A6 (§ III-2), qui permet d'identifier les isoformes A, B et C à des PM de 100-120 kDa. Par ailleurs, il a été montré que cet anticorps permettait également l'identification d'une bande de plus faible PM vers 60 kDa, exprimée à la fois dans les macrophages et les OCs, à la différence les isoformes de haut PM, isoformes B et C, principalement exprimées dans les OCs après leur différenciation en présence de RANKL et M-CSF (DAY, et al., 2005).

Nous avons donc réalisés des cultures OC à partir de CBMs, stimulés par M-CSF et RANKL au cours de leur différenciation, et stimulés ou non par RANKL à la fin des cultures. Après extraction protéique, l'analyse de l'expression de NFATc1 a été faite par immunoblot comme précédemment décrit (§ II-7).

4.1 Expression protéique de NFATc1 selon le temps de stimulation

L'expression protéique de NFATc1 dans les OCs matures a été évaluée à différents temps de stimulation par RANKL sur la base d'expériences faites dans des OCs murins (TAKAYANAGI, et al., 2002) et humains (KALLIOLIAS, et al., 2010). L'expression de NFATc1 a ainsi été étudiée 0, 18, 24 et 48 h après stimulation par RANKL (100 ng/ml) (Fig. 28).

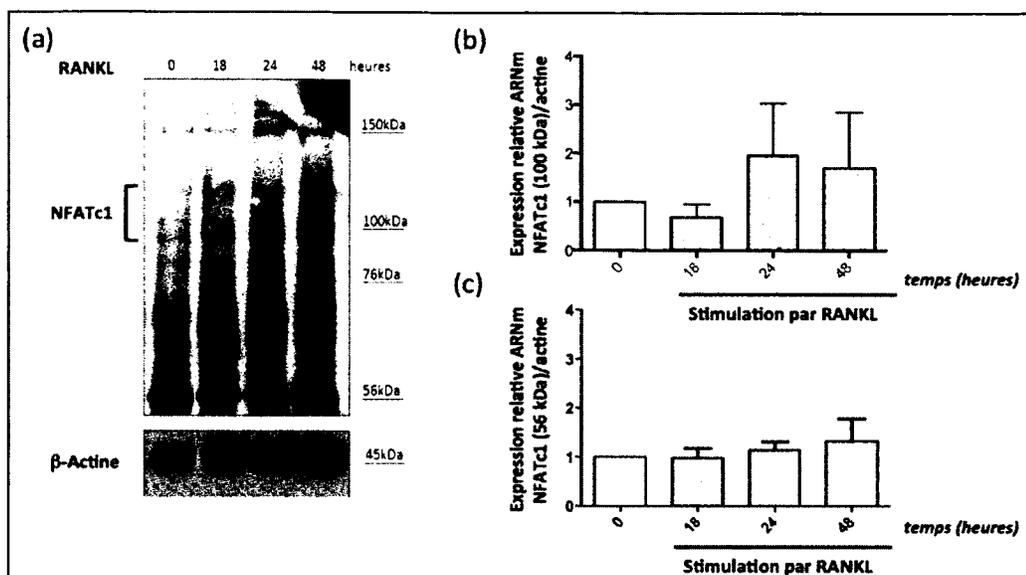


Figure 28. Effet de RANKL sur l'expression protéique NFATc1 selon la durée d'exposition.

À la fin des cultures, les OCs sont stimulés par RANKL (100 ng/ml), et les protéines sont extraites après différents temps (0, 18, 24 et 48 h). Après extraction protéique, migration sur gel et transfert sur membrane, l'expression de NFATc1 est évaluée par immunoblot. L'actine est utilisée comme contrôle interne de la charge protéique. (a) photo d'un immunobuvardage avec anti-NFATc1 et anti- β -actine. L'expression protéique de NFATc1 correspondant à la bande de PM 100 kDa (b) et à la bande de faible PM à 56 kDa (c) visualisées par immunoblot a été quantifiée (ImageJ), et son expression a été normalisée sur l'actine et rapportée à celle du contrôle non traité (moyenne \pm SD). Le nombre d'expériences indépendantes est de 3 (b) et 5 (c). (t-test païré)

L'expression de NFATc1 (isoforme 100 kDa) après différents temps d'exposition à RANKL semble augmenter à partir de 24 heures, mais les variations obtenues ne sont pas significatives (faible nombre d'échantillon, grande variabilité d'un échantillon à l'autre). Les résultats de l'analyse n'objective pas de variation significative des variations de l'expression de la bande à 56kDa après stimulation par RANKL, cette forme étant constitutive et peu inductible comme ce qui a été rapporté (DAY, et al., 2005).

4.2- Expression protéique de NFATc1 selon la concentration de RANKL

L'effet de RANKL sur l'expression protéique de NFATc1 a également été évalué selon diverses concentrations de RANKL. Pour ce faire, le temps de stimulation de 48 heures a été utilisé, la variation de l'expression protéique de NFATc1 apparaissant après des délais de plus de 24 heures, comme ce qui est le plus souvent rapporté dans la littérature, et comme le suggère nos résultats. Les concentrations de RANKL utilisées étaient de 10, 100, et 500 ng/ml (Fig. 29). L'expression protéique de NFATc1 a été évaluée par immunoblot comme précédemment, avec l'analyse concomitante de l'expression de l'actine (contrôle interne de charge protéique).

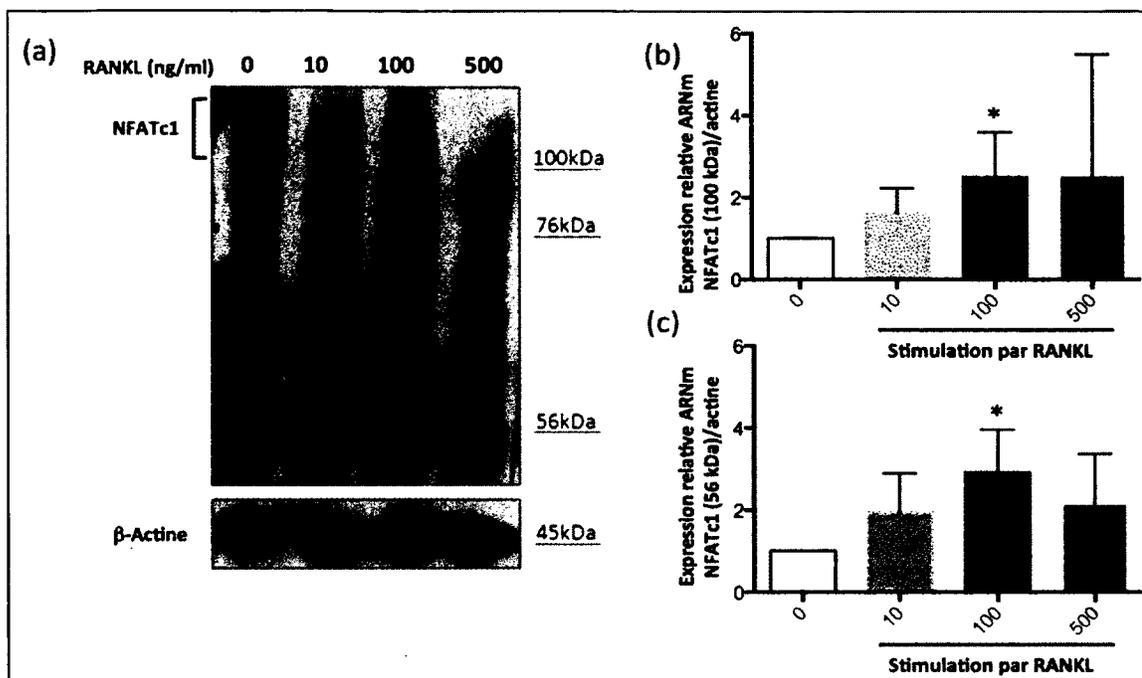


Figure 29. Effet de RANKL sur l'expression protéique de NFATc1 selon la concentration.

À la fin des cultures, les OCs matures ont été stimulés par RANKL (0, 10, 100 et 500 ng/ml) pendant 48 heures. Après extraction protéique, migration sur gel et transfert sur membrane, l'expression de NFATc1 est évaluée par immunoblot. L'actine est utilisée comme contrôle interne de la charge protéique. (a) photo d'un immunobuvardage avec anti-NFATc1 et anti- β -actine. L'expression protéique de NFATc1 correspondant à la bande de PM 100 kDa (b) et à la bande de faible PM à 56 kDa (c) visualisées par immunoblot a été quantifiée (ImageJ), et son expression a été normalisée sur l'actine et rapportée à celle du contrôle non traité (moyenne \pm SD). 5 expériences indépendantes ont été réalisées. * $p < 0.05$ vs CTL (pas de RANKL) (paired t-test).

L'étude de l'effet de diverses concentrations de RANKL (10, 100 et 500 ng/ml) sur l'expression protéique de NFATc1 à 48 heures dans les cultures d'OCs provenant de sang de CBMs objective une augmentation significative de cette expression avec la dose de 100 ng/ml, tant pour l'isoforme de 100 kDa (expression relative de 2.5, $p < 0.05$) que pour celle de 56 kDa (expression relative de 2.9, $p < 0.05$). Ainsi la concentration de 100 ng/ml de RANKL semble la plus appropriée pour stimuler l'expression de NFATc1 dans les OCs humains. Cette concentration est efficace pour stimuler l'expression de NFATc1 dans différents modèles cellulaires rapportés dans la littérature, dans les cellules T humaines, et les OC murins dérivés de moelle osseuse ou de la lignée RAW (HWANG et PUTNEY, 2012; TAKATSUNA, et al., 2005; TAKAYANAGI, et al., 2002). Nos résultats permettent donc d'objectiver un effet de RANKL sur l'expression protéique de NFATc1 dans les OCs humains.

Afin d'optimiser la stimulation par RANKL, certaines expériences ont été réalisées après une double stimulation par RANKL (100 ng/ml), initiale et à 24 heures. L'expression protéique de NFATc1 a été analysée à 48 heures. Le but de cette expérience était d'évaluer l'effet d'une concentration élevée de RANKL mais répartie dans le temps.

Après double stimulation par RANKL, l'expression relative de NFATc1/actine (isoforme 100 kDa) augmente de manière significative à 48 heures, passant de 1.2 en l'absence de RANKL à 2.47 après stimulation ($p < 0.01$). Par ailleurs les taux d'augmentation ne semble pas différer de ceux obtenus après une stimulation unique de RANKL 100 ng/ml (Fig. 29), même si la réalisation de ces 2 types d'expérience sur les mêmes échantillons aurait seule permis de conclure. En revanche l'expression de l'isoforme de bas PM (56 kDa) tend à augmenter, passant de 1.2 à 2.13, mais ne varie pas de manière significative ($p = 0.07$) (Fig. 30).

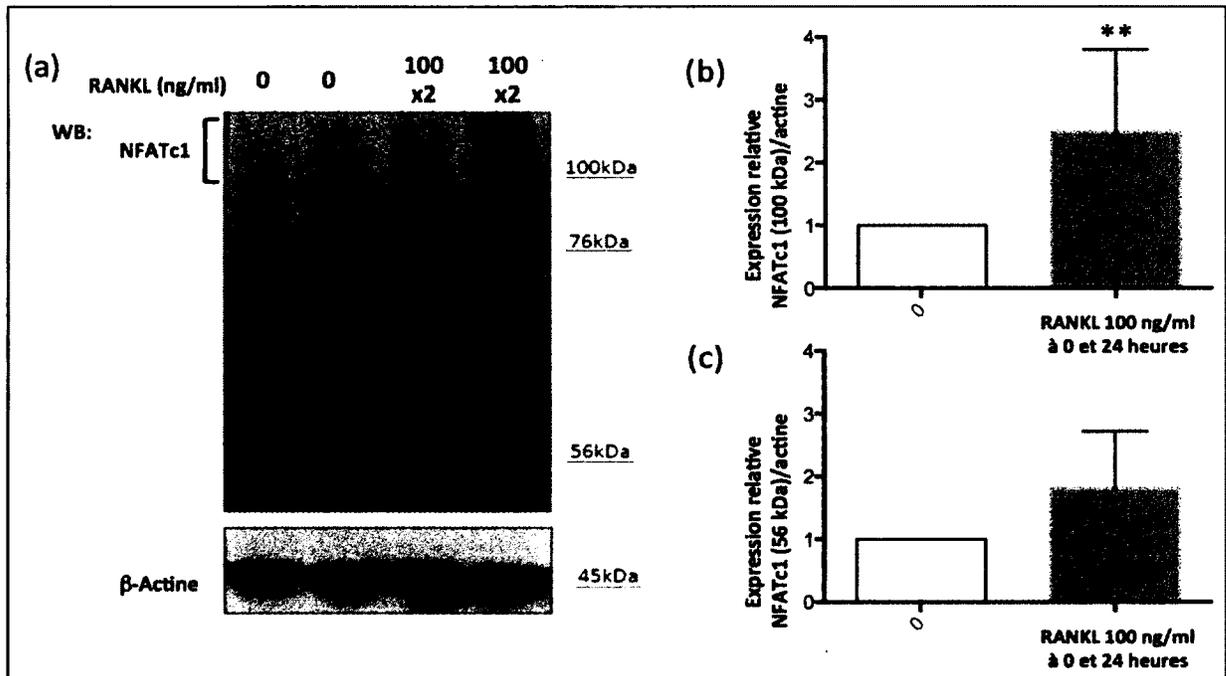


Figure 30. Effet de RANKL sur l'expression protéique de NFATc1 après double stimulation.

À la fin des cultures, les OCs matures ont été stimulés par RANKL (100 ng/ml) initialement et à 24 heures, et ont été arrêtés à 48 heures. L'expression de NFATc1 est évaluée par immunoblot tel que décrit. (a) photo d'un immunobuvardage avec anti-NFATc1 et anti- β -actine. L'expression protéique de NFATc1 correspondant à la bande de PM 100 kDa (b) et à la bande de faible PM à 56 kDa (c) visualisées par immunoblot a été quantifiée (ImageJ), et son expression a été normalisée sur l'actine et rapportée à celle du contrôle non traité (moyenne \pm SD). 6 (c) à 10 (b) expériences indépendantes ont été réalisées. ** $p < 0.01$ vs CTL (pas de RANKL) (paired t-test).

4.3- Conclusion sur l'expression protéique de NFATc1

L'étude de l'expression protéique de NFATc1 par immunoblot s'est heurtée à des difficultés techniques, l'expression de NFATc1 étant complexe de part la présence de plusieurs isoformes, et la qualité des films était sous-optimale pour une quantification adéquate, avec souvent beaucoup de bruit de fonds et une exposition prolongée qui entraînait l'apparition de multiples bandes non spécifiques. De grandes variations ont été observées d'un échantillon à l'autre, reflet probable de ces difficultés techniques, en plus du faible nombre d'échantillons pour certaines expériences. Toutefois, nos résultats démontrent une augmentation de l'expression de NFATc1 par RANKL, avec une dose optimale de 100 ng/ml et un temps optimal de 48 heures pour l'analyse.

5. Effet de RANKL sur l'activité de NFATc1 et NF- κ B dans les ostéoclastes dérivés de CBMs

Afin d'approfondir notre étude sur l'effet de RANKL sur la voie NFATc1, après l'étude de l'expression génique et protéique, nous avons complété nos travaux en évaluant l'effet de RANKL sur l'activité fonctionnelle de NFATc1 dans les OCs. Nos premiers travaux sur l'activation de NFATc1 dans les OCs de patients pagétiques et de sujets contrôles ont évalué l'activation de NFATc1 par sa translocation nucléaire (§ III-1). Une autre approche consiste à évaluer l'activité transcriptionnelle de NFATc1, qui en tant que facteur de transcription se lie au promoteur de gènes cibles sur une séquence consensus, et module ainsi l'expression de ces gènes. Afin d'évaluer cette activité, il est possible d'étudier l'expression d'un gène rapporteur (luciférase) placé sous contrôle d'un promoteur exprimant la séquence consensus nécessaire à la liaison et l'activité de NFATc1 (Essai Luciférase § II-9).

Afin de mettre la technique au point dans le laboratoire, nous avons ainsi établi un protocole pour l'essai luciférase, comportant une stimulation par RANKL (100 ng/ml) des OCs dérivés de CBMs, et leur transfection par un plasmide contenant le gène rapporteur *luc* codant pour la luciférase sous contrôle d'un promoteur possédant les éléments de réponse spécifiques du facteur d'intérêt (NF- κ B ou NFATc1) (§ II-9).

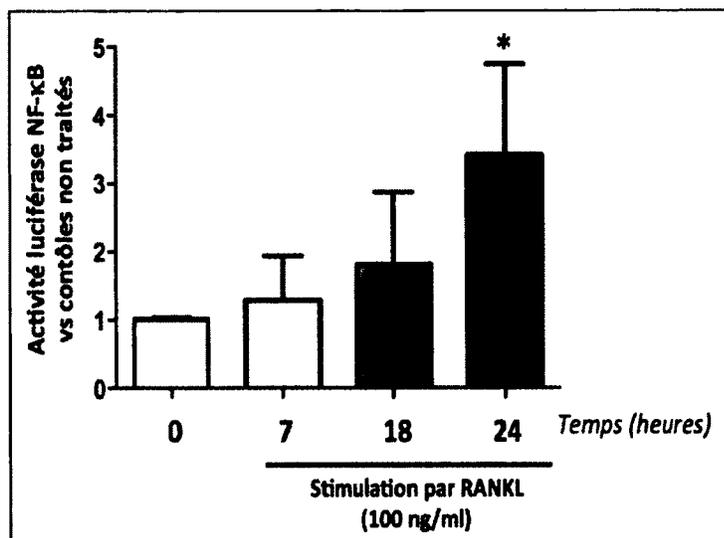
5.1 Effet de RANKL sur l'activité de NF- κ B

Nous avons débuté notre analyse en étudiant l'activité de NF- κ B induite par RANKL dans les OCs, sur la base de nos travaux antérieurs objectivant l'activation de NF- κ B par translocation nucléaire de la sous-unité p50 de NF- κ B et la phosphorylation de la sous-unité

p65, toutes 2 induites par RANKL dans les OCs humains (CHAMOIX, et al., 2009; CHAMOIX, et al., 2013). L'analyse de l'activité de NF- κ B par essai luciférase nous a permis de nous familiariser avec la technique, pour l'appliquer ensuite à l'étude de l'activité de NFATc1. Les temps choisis pour l'analyse sont de 7, 18 et 24 heures (Fig. 31).

Figure 31. Effet de RANKL sur l'activité de NF- κ B.

À la fin des cultures, les OCs matures dérivés de CBMs sont transfectés par un plasmide contenant le gène rapporteur *luc* sous contrôle d'un promoteur contenant les séquences consensus pour la liaison et l'activité de NF- κ B, puis ont été stimulés par RANKL (100 ng/ml), et les protéines extraites après 7, 18 et 24 heures. On mesure l'activité du facteur de transcription de NF- κ B en détectant avec un luminomètre la luminosité émise par la luciférase. L'activité de NF- κ B est calculée et rapportée à la quantité de protéine obtenue de chaque extrait cellulaire. Les résultats représentent l'activité de NF- κ B normalisée sur celle des cellules non traitées (CTL) (moyenne \pm SD). 5 expériences indépendantes ont été réalisées. * $p < 0.01$, CTL (non traité) vs RANKL (paired t-test).



Comme attendu, l'activité de NF- κ B mesurée par essai luciférase est induite par RANKL dans les OCs matures différenciés à partir de CBMs. On observe une augmentation de l'activité de NF- κ B après stimulation par RANKL à 18 heures ($\times 1.8$, ns), augmentant avec le temps, de manière significative à 24 heures ($\times 3.4$, $p < 0.01$ vs contrôles).

NF- κ B est classiquement activé par RANKL dans les OCs, et le temps de stimulation pour l'activation de ce facteur évalué par un essai luciférase correspond à ce qui est retrouvé dans la littérature, allant de 18 à 48 heures (KIM, et al., 2010; SUNDARAM, et al., 2011; TAKATSUNA, et al., 2005; TAKAYANAGI, et al., 2002).

5.2 Effet de RANKL sur l'activité de NFATc1

Dans le but d'évaluer l'activité de NFATc1 dans les OCs différenciés à partir de CBMs, les mêmes expériences ont été réalisées, en utilisant un gène luciférase sous contrôle d'un promoteur contenant les éléments de réponse de NFAT (construction NFAT-Luc). La construction NFAT-Luc a été produite par le laboratoire de J.D Molkenhain (Department of Pediatrics, University of Cincinnati). Neuf copies de la séquence de liaison commune aux

protéines de la famille des NFATs (5'-TGGAAAATT-3') ont été insérées au promoteur minimal de la chaîne lourde de la myosine- α , ce promoteur ayant été placé en amont du gène luciférase pour générer la construction NFAT-Luc (WILKINS, et al., 2004). Cette construction permet d'étudier l'activité des NFATs dans divers types cellulaires et dans diverses espèces (dont l'homme et la souris) (ARGUIN, et al., 2010; MORANCHO, et al., 2008).

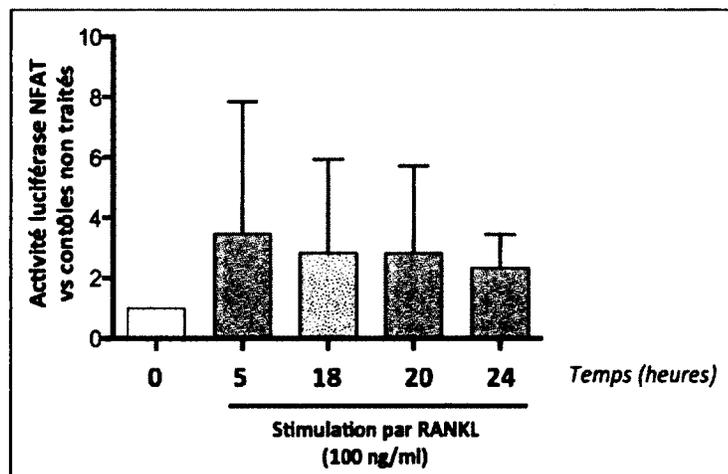
L'expression de la luciférase obtenue reflète l'activité de toutes les protéines NFATs présentes dans l'OC (NFATc1, NFATc2, NFATc3 et NFATc4). NFATc1 étant le plus abondant dans les OCs, et ayant une plus grande capacité à répondre à RANKL chez la souris et chez l'homme comparativement aux autres NFATs (DAY, et al., 2005; ISHIDA, et al., 2002; TAKAYANAGI, et al., 2002), l'activité luciférase mesurée à l'aide de cette construction sera majoritairement celle de NFATc1.

Les cultures d'OCs matures ont donc été transfectées avec le plasmide contenant le gène luciférase sous contrôle du promoteur liant les NFATs. Les OCs dérivés de CBMs ont ensuite été stimulés par RANKL (100 ng/ml) pendant 5, 18, 20 et 24 h (Fig. 32).

L'activité luciférase modulée par NFAT variait avec le temps de stimulation par RANKL (100 ng/ml), avec une augmentation plus soutenue de l'activité NFAT après 5 heures et jusqu'à 24 heures. La variabilité de l'activité de NFAT d'un échantillon à l'autre, reflétée par les grands écart-types obtenus et le petit nombre d'expériences, rend difficile l'interprétation des résultats. Un nombre plus important d'expériences aurait pu permettre d'atténuer ce problème. Toutefois, on observe une tendance de RANKL à augmenter l'activité de NFAT après 5 heures dans les OCs matures.

Figure 32. Effet de RANKL sur l'activité de NFATc1 dans les OCs : étude à différents temps de stimulation.

À la fin des cultures, les OCs matures dérivés de CBMs sont transfectés par un plasmide contenant le gène rapporteur NFAT-Luc, puis ont été stimulés par RANKL (100 ng/ml), et les protéines ont été extraites après différentes périodes de 5 à 24 heures. L'activité de NFAT est détectée avec un luminomètre déterminant la luminosité émise par la luciférase. L'activité de NFAT est calculée et rapportée à la quantité de protéine obtenue dans chaque extrait cellulaire. Les résultats représentent l'activité de NFATc1 normalisée sur celle des cellules contrôles (non traitées) (moyenne \pm SD). 3 expériences indépendantes ont été réalisées.



5.3- Effet de RANKL sur l'activité de NFATc1 mesurée par essai luciférase dans des ostéoclastes exprimant les variants de *p62*

Les OCs de sujets pagétiques étant difficiles à obtenir en quantité suffisante pour les études nécessitant une quantité importante de lysats cellulaires, nous avons utilisés des OCs matures dérivés de CBMs et infectés par des constructions virales exprimant les variants de *p62* (EV, *p62wt*, *p62 p.P392L*) pour étudier l'effet de la mutation *p62 p.P392L* sur l'activation de NFATc1 induite par RANKL évaluée par essai luciférase dans les OCs humains.

L'interaction entre RANKL et RANK induit la formation d'un complexe de signalisation incluant *p62*, PKC ζ et TRAF6. La protéine *p62* est mutée dans le domaine UBA dans un grand nombre de sujets ayant une maladie de Paget. Dans notre laboratoire, nous étudions l'impact de la mutation *p62 p.P392L* sur le phénotype OC, et nous avons montré qu'en sa présence l'activité du facteur de transcription NF- κ B est augmentée (CHAMOUX, et al., 2009). L'effet de cette mutation sur l'activation de NFATc1, le deuxième facteur de transcription impliqué dans la formation et l'activation des OCs, était un des objectifs de notre travail. Les techniques de transfections étant difficiles dans ces cellules, avec des taux de transfection souvent faibles, la technique d'infection virale (lentivirus) des OCs est en cours de développement dans le laboratoire (Stephen McManus, étudiant au doctorat, et Dr Gino Laberge).

Des lentivirus exprimant différents variants de *p62*, *p62* de type sauvage (*p62wt*) ou *p62* mutée (*p62 p.P392L*), ou la GFP (green fluorescent protein), ou sans construction ajoutée (vecteur vide), ont été générés.

L'infection par lentivirus a tout d'abord été réalisée dans des cultures primaires d'OCs provenant de CBMs, en utilisant des lentivirus comportant la séquence de la protéine GFP fluorescente. Une fois exprimée dans la cellule la protéine GFP est facilement visible au microscope à fluorescence, ce qui permet de valider la technique d'infection. Dans les conditions utilisées, 85% des OCs étaient fluorescents après infection par pLenti6/GFP (Fig. 33).

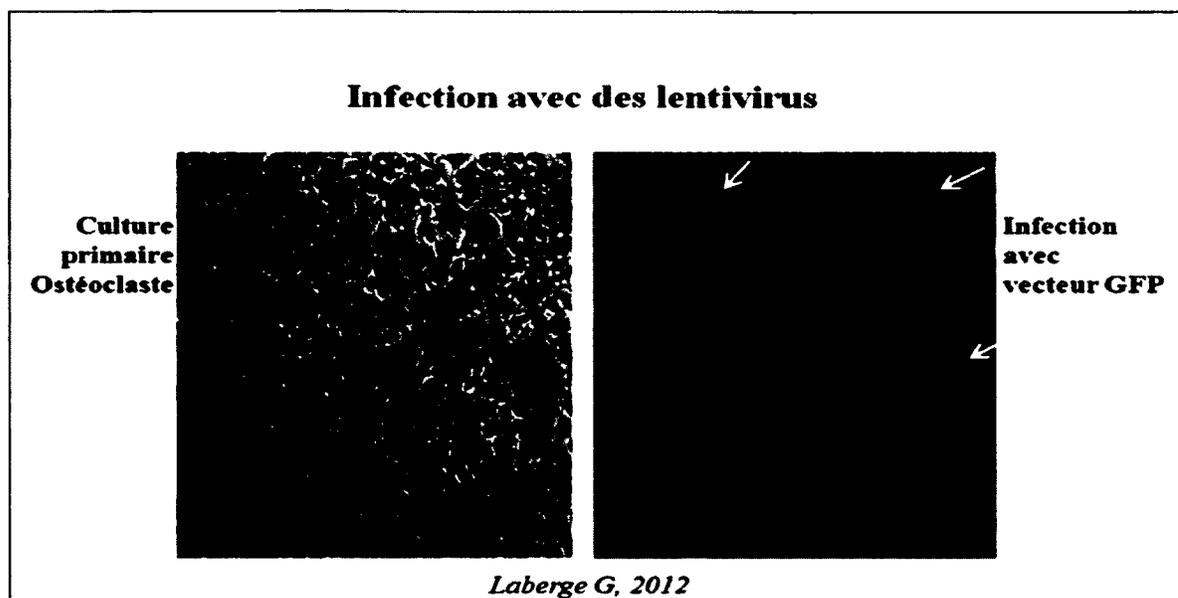


Figure 33. Culture d'OCs, différenciés à partir de CBM, et infectés par lentivirus exprimant GFP (Green Fluorescent Protein).

La photo de gauche correspond à une culture d'OCs en microscopie de phase. La photo de droite correspond à l'immunofluorescence obtenue après infection par pLenti6/GFP. L'infection par lentivirus a été effectuée sur des cellules non encore différenciées (monocytes et macrophages), incubées pendant 4 heures avec la construction virale. La différenciation des cellules en OCs a ensuite été réalisée pendant 14 jours en présence de RANKL et M-CSF. Les photos ont été prises au J14 (20X).

Afin d'évaluer l'effet de RANKL sur l'activité de NFATc1, et l'impact de la mutation *p62* p.P392L, l'activité de NFATc1 a été évaluée par essai luciférase dans des OCs matures préalablement infectés par lentivirus exprimant *p62wt*, *p62* p.P392L, ou par un vecteur vide. Des OCs non infectés par lentivirus sont également utilisés comme contrôles. La transfection du gène rapporteur NFAT-Luc a été réalisée deux jours après l'infection, pour une durée de 18 heures. Après transfection, les cellules ont été stimulées ou non par RANKL (100 ng/ml) pendant 24 heures (Fig. 34).

Dans les cultures d'OCs infectés avec vecteur vide, on n'observe pas d'effet de la stimulation par RANKL sur l'activité NFAT. Il en est de même pour les cellules infectées par lentivirus exprimant *p62wt* ou *p62* p.P392L. De plus la présence d'une surexpression de *p62* ou la présence de *p62* p.P392L ne modifient pas l'activité basale de NFATc1, voire même ont tendance à la diminuer.

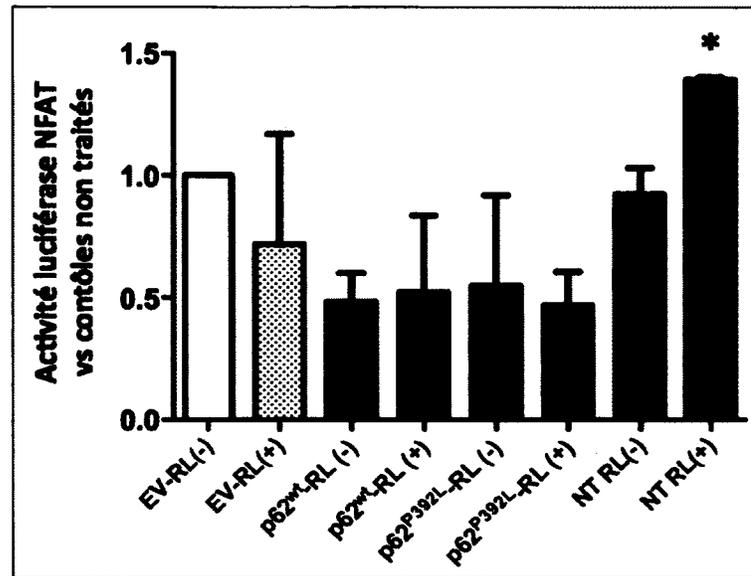


Figure 34. Effet de RANKL sur l'activité de NFATc1 dans les OCs exprimant les variants de p62

À la fin des cultures, les OCs dérivés de CBMs ont été infectés par lentivirus exprimant p62 de type sauvage, p62 p.P392L, ou un vecteur vide, et certaines cultures n'ont pas été infectées (NT). Par la suite le gène rapporteur NFAT-Luc a été transfecté, et les cultures ont été stimulées ou non avec RANKL (RL) (100 ng/ml) pendant 24 heures. Les extraits cellulaires ont été analysés avec un luminomètre, afin de mesurer la luminosité de la luciférase. L'activité de NFAT est calculée et rapportée à la quantité de protéine obtenue dans chaque extrait cellulaire. Les résultats représentent l'activité de NFATc1 normalisée sur celle des cellules infectées par le vecteur vide (moyenne +/- SEM). 4 expériences indépendantes ont été réalisées. * $p < 0.05$, non traité vs RANKL (paired t-test).

En revanche, dans les cultures d'OCs non infectés, RANKL stimule de manière significative l'activité de NFAT. Ce dernier résultat suggère que l'essai luciférase a bien fonctionné. En revanche, il est possible que le traitement des cellules par infection, suivi d'une transfection du gène rapporteur NFAT-Luc soient toxiques pour les cultures primaires d'OCs. Ceci expliquerait l'absence de réponse à RANKL.

IV- DISCUSSION

ÉTUDE DES EFFETS DE RANKL SUR L'ACTIVATION ET L'EXPRESSION DE NFATc1 DANS LES OSTÉOCLASTES HUMAINS

L'OC est impliqué dans la résorption osseuse et le remodelage du tissu osseux, et sa régulation est cruciale pour l'homéostasie osseuse. Un déséquilibre de l'activité de résorption osseuse OC est impliqué dans diverses pathologies osseuses dont la maladie osseuse de Paget. L'hyperactivation de l'OC observée dans cette maladie s'associe à une augmentation de la signalisation dans ces cellules. RANKL est un des facteurs majeurs impliqués dans la différenciation, la survie et l'activité des OCs, et stimule l'activation de plusieurs cascades de signalisation dans ces cellules, dont la voie NF- κ B (BOYLE, et al., 2003).

NFATc1 est un autre facteur de transcription dont l'expression et l'activation sont stimulées par RANKL dans les OCs (NEGISHI-KOGA et TAKAYANAGI, 2009). La plupart des études sur l'induction de NFATc1 et son rôle dans l'ostéoclastogénèse ont été réalisées dans des modèles murins. Ce facteur de transcription induit l'expression de plusieurs protéines indispensables à la différenciation et à l'activité de résorption des OCs comme les enzymes TRAP et cathepsine K impliquées dans la dégradation de la matrice osseuse, le récepteur OSCAR impliqué dans la voie de co-stimulation des OCs conduisant à la signalisation calcique, ou encore l'intégrine β 3 impliquée dans l'adhésion de ces cellules (NEGISHI-KOGA et TAKAYANAGI, 2009; SONG, et al., 2009). Une augmentation de l'activité transcriptionnelle de NFATc1 pourrait ainsi favoriser l'hyperrésorption osseuse et participer à diverses maladies osseuses.

Dans notre travail, nous avons étudié l'impact de RANKL sur l'expression (génique et protéique) et l'activation de NFATc1 dans des cultures primaires d'OCs humains. Si le rôle de NFATc1 dans la formation et l'activation des OCs chez la souris a largement été étudié, aucune étude fonctionnelle n'a été réalisée dans les OCs humains. L'importance d'évaluer ce facteur dans un modèle humain comporte plusieurs intérêts. D'une part, des différences peuvent être observées dans les voies de signalisation selon les espèces, et l'étude chez l'homme est donc complémentaire aux résultats obtenus chez la souris. L'autre intérêt du projet est d'avoir étudié l'expression et l'activation de NFATc1 dans un contexte de pathologie osseuse (la maladie de Paget). À l'instar de l'activation de la voie NF- κ B

démontrée dans les OCs pagétiques (CHAMOIX, et al., 2009), celle de NFATc1, deuxième facteur de transcription d'importance majeure dans la formation et l'activation des OCs, pourrait également contribuer au phénotype de ces cellules. Enfin, compte tenu du rôle des mutations du gène *SQSTM1* codant pour le sequestosome 1/p62 dans le phénotype des OCS pagétiques et la signalisation de ces cellules (CHAMOIX, et al., 2009; CHAMOIX, et al., 2013), l'impact de la mutation *p62* p.P392L, la plus répandue au Québec (MORISSETTE, et al., 2006), sur la signalisation NFATc1 était un de nos objectifs, et l'accessibilité à des OCs provenant de patients ou de sujets contrôles porteurs de *p62* p.P392L est un outil essentiel.

Dans notre laboratoire, nous travaillons avec deux modèles d'OCs humains différenciés à partir de précurseurs OC en présence des facteurs de croissance M-CSF et RANKL. Les précurseurs OC proviennent soit des monocytes de sang périphérique (PBMCs) de sujets ayant une maladie de Paget ou de sujets contrôles, tous génotypés pour la présence de la mutation *p62* p.P392L, soit de monocytes fœtaux isolés de sang de cordon ombilical (CBMs). Les cultures primaires d'OCs humain comportent plusieurs difficultés. Le temps de différenciation des OCs est de 21 jours, ce qui est long pour des cultures primaires, avec tous les aléas possibles de ce type de cultures (infections en particulier) et délai important avant de pouvoir effectuer les expérimentations. La disponibilité des cellules dépend du recrutement de patients (dans le cas du sang périphérique) et des femmes en procédure d'accouchement (pour le sang de cordon ombilical). À la fin des cultures, on obtient des cellules multinucléées ayant les caractéristiques phénotypiques des OCs (CHAMOIX, et al., 2009; FONG, et al., 2013), mais également des cellules mononucléées du lignage monocyte-macrophage (HODGE, et al., 2004), ce qui peut être une source de variabilité de nos résultats.

Nous avons ainsi étudié l'expression et l'activation de NFATc1 dans ces cultures d'OCs humains, et sa régulation par RANKL. L'étude de cultures d'OCs provenant de PBMCs nous a permis de comparer l'expression, l'activation et la régulation par RANKL de NFATc1 dans les OCs pagétiques et les OCs normaux. Dans un premier temps nous avons confirmé que RANKL stimulait l'activation de NFATc1, augmentant sa translocation nucléaire (étude d'IF). Nous avons également montré que RANKL stimulait l'expression du gène de NFATc1 (régulation transcriptionnelle) évaluée par Q-PCR, son expression protéique (immunobuvardage) ainsi que son activité (essai luciférase). Ces résultats nous permettent de confirmer que dans l'OC humain (différenciés à partir de monocytes de sang périphérique ou de CBMs), RANKL interagissant avec son récepteur RANK induit une signalisation cellulaire

qui stimule l'activité de NFATc1 et son expression. Ceci avait déjà été rapporté dans les OCs de rongeurs *in vivo* ou *in vitro* (KOMAROVA, et al., 2005; TAKATSUNA, et al., 2005; TAKAYANAGI, et al., 2002), mais uniquement pour l'expression de NFATc1 dans les OCs humains (DAY, et al., 2005; KALLIOLIAS, et al., 2010). Ceci nous permet de valider notre modèle pour l'étude de NFATc1, en démontrant en plus un effet de RANKL sur l'activation de NFATc1 dans les OCs humains.

Lors des diverses expérimentations, quelques difficultés ont été rencontrées. L'analyse de la protéine NFATc1 en immunobuvardage est complexe, car cette protéine contient plusieurs isoformes de différents poids moléculaires (PM). Les PM des isoformes de NFATc1 varient d'un type cellulaire à l'autre et d'une espèce à l'autre. Sept isoformes de NFATc1 ont été identifiées dans les lymphocytes T humains et de souris (SERFLING, et al., 2006). L'anticorps monoclonal de souris anti-NFATc1 utilisé (7A6) permet d'identifier plusieurs isoformes de PM 100-120 kD (BD Pharmingen). Par ailleurs, cet anticorps permet également l'identification d'une bande de plus faible PM vers 60 kDa, exprimée à la fois dans les macrophages et les OCs, à la différence des isoformes de haut PM, isoformes B et C, principalement exprimées dans les OCs après leur différenciation en présence de RANKL et M-CSF (DAY, et al., 2005). Comme nous l'avons souligné, l'analyse de NFATc1 par immunobuvardage a également été difficile dans les études utilisant des PBMCs, en partie du fait du faible nombre de sujets par groupe et de la grande variabilité des résultats.

La cinétique de l'expression de NFATc1 réalisée dans les OCs provenant de CBMs a permis de montrer une augmentation de l'expression de NFATc1 après 24 heures de stimulation par RANKL, avec une augmentation significative obtenue à 48 heures de traitement par RANKL 100 ng/ml dans les expériences réalisées à différentes concentrations de RANKL (Fig. 28). Ces données sont importantes à considérer compte tenu de nos premiers résultats sur les OCs de sujets pagétiques ou contrôles. En effet les échantillons de sujets contrôles et pagétiques disponibles initialement provenaient de cultures d'OCs traités par RANKL pendant une période limitée (45 min), et une stimulation plus prolongée semble essentielle pour l'étude de l'expression génique et protéique de NFATc1, à la différence de son activation après stimulation par RANKL. Cette information est essentielle pour la poursuite des travaux sur la signalisation NFATc1 dans les OCs humains, en particulier pour l'étude du rôle du complexe de signalisation p62/TRAF6/PKC ζ et de la voie NF- κ B sur l'expression de NFATc1 dans ces cellules.

La stimulation par RANKL peut conduire à l'activation de nombreuses voies de signalisation, et donc à la modulation de l'expression d'un grand nombre de protéines. Par PCR quantitative et immunoblot, nous avons également évalué l'expression de la MMP-9, dont l'expression est connue pour être modulée par RANKL (HONG, et al., 2013). Nous avons réalisé cette analyse en parallèle à celle de NFATc1 à titre de contrôle positif pour évaluer l'effet de RANKL. Nous avons confirmé que l'expression génique de *MMP-9* est stimulée par RANKL dans les OCs humains. Par ailleurs, la stimulation de l'expression génique de *MMP-9* était deux fois plus importante que celle de NFATc1. Il est possible que certaines voies de signalisation stimulées par RANKL aient un impact préférentiel sur l'expression génique de *MMP-9*. Ainsi, l'expression génique de MMP-9 est stimulée par p38 MAPK, ERK et NF- κ B. Par ailleurs, NFATc1 stimule l'expression de son propre gène, de même que celle de *MMP-9* (SUNDARAM, et al., 2007).

MALADIE DE PAGET ET IMPACT DE LA MUTATION *p62 p.P392L*

La maladie de Paget est caractérisée par un remodelage osseux très augmenté, et en particulier la première phase de la maladie débute par une large résorption osseuse, faisant de l'OC un élément clé dans la pathogénie de cette maladie. Le phénotype des OCs pagétiques a été bien caractérisé : les OCs sont plus gros, comportent plus de noyaux que les OCs normaux, et ont une augmentation de leur activité de résorption osseuse. Par ailleurs ils ont une sensibilité accrue aux facteurs impliqués dans l'ostéoclastogénèse tels que RANKL, et ils sont résistants à l'apoptose (CHAMOIX, et al., 2009; GOODE et LAYFIELD, 2010; HELFRICH et HOCKING, 2008). Comme nous l'avons détaillé dans l'introduction, l'étiologie de la maladie de Paget semble multifactorielle, avec une forte composante génétique. Plusieurs loci de susceptibilité ont été associés à la maladie de Paget, mais des mutations n'ont été rapportées que dans le seul gène *SQSTM1/p62*, codant pour la protéine p62, la plus fréquente étant la substitution P392L (CHUNG et VAN HUL, 2012).

Afin de comprendre les mécanismes de l'hyperactivation des OCs dans la maladie de Paget, et le rôle de la mutation *p62 p.P392L* dans ce phénotype, les travaux de notre laboratoire se sont axés sur la voie NF- κ B, RANKL étant un puissant stimulateur de cette voie. De fait nous avons pu démontrer une augmentation de l'activation de NF- κ B dans les OCs pagétiques, après stimulation par RANKL et également de manière constitutive en présence de la mutation *p62 p.P392L* (CHAMOIX, et al., 2009; CHAMOIX, et al., 2013).

Notre objectif a été de poursuivre l'étude de la signalisation dans les OCs, en évaluant l'expression et l'activation de NFATc1, un autre facteur de transcription d'importance majeure dans la signalisation OC. L'activation de NFATc1 reflétée par sa translocation nucléaire a été évaluée en immunofluorescence (IF) dans des OCs matures provenant de sujets sains (contrôles) et de sujets ayant une maladie de Paget. De manière importante tous les sujets ont été génotypés pour la présence de la mutation *p62 p.P392L* par séquençage des exons 7 et 8, permettant également d'éliminer toute autre mutation décrite dans la maladie de Paget.

Nous avons observé que l'activation basale (en absence de stimulation par RANKL) était significativement plus élevée dans les OCs pagétiques qui ont une activation constitutive de NFATc1, et cette activation est encore augmentée par RANKL. Comme NFATc1 est l'un des facteurs de transcription importants dans l'activité et la différenciation des OCs, une augmentation de son activation pourrait participer au phénotype de l'OC pagétique. Le rôle de la mutation *p62 p.P392L* a également été évaluée en comparant dans ces expériences les sujets porteurs ou non de la mutation (comparaison groupes contrôles avec et sans mutation, et des groupes Paget avec ou sans mutation). L'analyse n'a toutefois pas permis de retrouver un impact de la mutation *p62 p.P392L* sur l'activation de NFATc1 basale ou stimulée par RANKL dans les OCs, mais les effectifs sont trop peu nombreux, avec des écart-types importants, pour permettre de conclure.

L'activation de NFATc1 par RANKL avait déjà été rapportée dans des OCs de rongeurs. La translocation nucléaire de NFATc1 induite par RANKL était observée après une stimulation de 45 min, et était stimulée par l'inhibition pharmacologique des kinases p38 et GSK3 β (KOMAROVA, et al., 2005).

Nous avons déjà mentionné les travaux antérieurs du laboratoire ayant démontré une activation constitutive de la voie NF- κ B dans les OCs pagétiques (CHAMOIX, et al., 2009). Si l'activation de NFATc1 dépend de la signalisation calcique via la calcineurine, NF- κ B peut également intervenir en augmentant l'expression de NFATc1. Il a été montré que les sous-unités p50 et p65 de NF- κ B, de même que le facteur de transcription AP-1 pouvaient se lier au promoteur de NFATc1 (ZHOU, et al., 2002), et l'activation de NF- κ B induite par RANKL pourrait de ce fait stimuler l'expression génique de NFATc1 (TAKAYANAGI, et al., 2002), et augmenter son expression protéique (ISHIDA, et al., 2002). Nous avons donc complété notre étude en évaluant l'expression génique et protéique de NFATc1.

Concernant l'expression génique de *NFATc1*, Un travail antérieur du laboratoire n'a pas objectivé d'augmentation basale de l'expression du gène de *NFATc1* dans les OCs pagétiques comparativement aux OCs de sujets sains, ni d'impact de la mutation *p62 p.P392L* dans cette expression. Toutefois, dans ces expériences, seule l'expression basale était étudiée, sans stimulation par RANKL (MICHOU, et al., 2010).

Dans les extraits protéiques de cultures d'OCs dérivés de PBMCs de patients avec maladie de Paget ou de contrôles, une tendance à l'augmentation de l'expression de *NFATc1* était observée en présence de RANKL, plus marquée chez les patients pagétiques, et globalement des taux d'expression de *NFATc1* plus importants en présence de la mutation *p62 p.P392L*. Toutefois, l'expression protéique de *NFATc1* par immunoblot est difficile d'interprétation compte tenu du faible nombre de sujets analysés par groupe (n de 2 à 3), de la faible quantité de protéines disponible pour chaque échantillon (20 à 30 µg), et de la grande variabilité des résultats obtenus (écart-types). Nous avons également utilisé la lamine A/C comme contrôle de la charge protéique des extraits protéiques totaux, ce qui n'a pas été judicieux, la lamine A/C étant un composant de l'enveloppe nucléaire. Ce marqueur pourrait être utilisé pour quantifier l'expression nucléaire de *NFATc1* après fractionnement des protéines nucléaires et cytoplasmiques. Le but d'une telle expérience serait d'évaluer l'effet de RANKL sur l'activation (translocation nucléaire) de *NFATc1*, en plus de son expression. Enfin, les films obtenus à partir des gels n'étaient pas optimaux, avec beaucoup de bruit de fonds, ne permettant pas une visualisation adéquate des bandes d'intérêt. Compte tenu de difficultés techniques, et d'un temps de stimulation par RANKL non optimal (45 min pour les échantillons disponibles), l'analyse de l'expression protéique de *NFATc1* dans les OCs pagétiques (et contrôles) sera reprise par le laboratoire, sur la base de la mise au point de l'expression de *NFATc1* que nous avons réalisée sur les OCs de monocytes fœtaux, et sur un nombre plus grand de sujets (une nouvelle cohorte de patients avec maladie de Paget étant en cours de constitution dans le laboratoire).

Afin d'évaluer l'effet de RANKL sur l'activité *NFATc1*, nous avons utilisé un essai fonctionnel (essai luciférase). Les constructions utilisées nous ont permis d'évaluer l'activité de NF-κB, et celle de *NFATc1*. RANKL induit l'activité de NF-κB après 18 heures, et stimule également l'activité de *NFATc1* dans les OCs contrôles après 24 heures. Afin d'évaluer l'impact de la mutation *p62 p.P392L*, nous avons utilisé des OCs dérivés de CBMs infectés par lentivirus exprimant les variants de *p62* couplés à la GFP. L'efficacité de l'infection a été

vérifiée par la présence de GFP (IF) dans les cellules multinucléées. Nous avons réalisé un essai luciférase sur ces cellules, nécessitant une transfection par lipofectamine LTX avec le vecteur exprimant la construction NFAT-Luc. De faibles taux d'activité NFATc1 ont été détectés dans les cellules infectées, avec ou sans RANKL. La réponse obtenue dans les cellules non infectées suggère que l'essai luciférase a bien fonctionné, mais il est possible que le traitement des cellules par infection, suivi d'une transfection du gène rapporteur NFAT-Luc soient toxiques pour les cultures primaires d'OCs. Nous n'avons donc pas pu évaluer l'impact de la mutation *p62* p.P392L sur l'activité de NFATc1 basale ou induite par RANKL.

Ces données justifient de poursuivre la mise au point de la technique d'infection couplée à l'essai luciférase dans ces cellules, et une vérification de la viabilité des OCs au cours de ces procédures doit être réalisée. Les techniques d'infection par lentivirus et de transfection par LTX du gène rapporteur NFAT-Luc réalisées séparément ne modifient pas l'aspect des cellules, mais les 2 techniques ajoutées altèrent la morphologie et l'adhérence des cellules. Une solution serait d'adapter l'infection par lentivirus à l'essai luciférase, car l'infection est bien plus facile et mieux tolérée par les OCs que la transfection (LAITALA-LEINONEN, 2005).

Globalement, nos travaux ont permis de démontrer une activation de NFATc1 plus importante dans les OCs pagétiques comparativement aux OCs de sujet contrôles, objectivée par sa localisation nucléaire. Ce résultat obtenu par immunolocalisation n'a pu être confirmé par d'autres approches compte tenu de problèmes expérimentaux, mais souligne néanmoins que NFATc1 pourrait contribuer au phénotype des OCs pagétiques, au même titre que l'activation de la voie NF- κ B. Il s'agit d'une donnée majeure de notre travail, originale car n'ayant jamais été démontrée dans des OCs de patients ayant une maladie de Paget, et qui justifie la poursuite des investigations de cette voie et de sa régulation dans cette maladie. L'impact de la mutation *p62* p.P392L revêt ici toute son importance et sera à déterminer. Il a en effet été montré dans des cellules murines RAW que les mutations de *p62* associées à la maladie de Paget, dont la *p62* p.P392L, stimulaient l'expression et l'activation de NFATc1 (REA, et al., 2006; SUNDARAM, et al., 2011).

RÔLE DE LA PROTÉINE KINASE C ζ DANS L'ACTIVATION ET L'EXPRESSION DE NFATc1

La stimulation des OCs par RANKL entraîne la formation d'un complexe de signalisation comportant TRAF6, p62 et PKC ζ (DURAN, et al., 2004). Un travail antérieur de notre laboratoire a montré l'association de p62 avec PKC ζ , et également PDK1, dont PKC ζ peut être un

substrat. Cette association est induite par RANKL dans les OCs normaux, et avant toute stimulation dans les OCs pagétiques (CHAMOIX, et al., 2009). Les études faites dans les OCs transfectés avec les variants de *p62* ont également montré l'impact de la mutation *p62* p.P392L dans cette liaison qu'elle favorise (CHAMOIX, et al., 2009). Ces données suggéraient un rôle de PKC ζ dans la signalisation *p62*-dépendante induite par RANKL. D'autres travaux ont par la suite montré que l'induction de NF- κ B induite par RANKL dans les OCs était dépendante de PKC ζ , qui pourrait agir comme une kinase pour la phosphorylation de la sous-unité *p65* de NF- κ B, particulièrement en présence de la mutation *p62* p.P392L (CHAMOIX, et al., 2013). Ainsi, la mutation *p62* p.P392L modifierait les interactions protéiques qui prennent place autour de *p62*, augmentant la liaison des kinases PDK1 et PKC ζ , avec pour conséquence l'induction de l'activation de NF- κ B via *p65*, de manière indépendante de IKK, le complexe responsable de l'activation de NF- κ B par phosphorylation et inactivation de l'inhibiteur I κ B (CHAMOIX, et al., 2013).

Lors de notre travail sur NFATc1 nous nous sommes donc demandé si l'augmentation de l'activation de NFATc1, objectivée par la translocation nucléaire de NFATc1 dans les OCs pagétiques, pouvait dépendre de PKC ζ . PKC ζ est connue pour interagir avec NFATc1, et pourrait moduler son activité de transactivation dans les cellules Jurkat (lignée de lymphocytes T) (SAN-ANTONIO, et al., 2002). Dans les OCs contrôles, RANKL induit l'activation de NFATc1 évaluée par sa translocation nucléaire (IF), et la présence d'un inhibiteur de PKC ζ prévenait cette augmentation. L'activation de NFATc1 par RANKL dépend des oscillations du Ca²⁺ intracellulaire induite par la PLC γ dont l'activation dépend de GPCRs (G protein coupled receptors) (HOGAN, et al., 2003). La kinase Akt, fortement activée par RANKL dans les OCs, phosphoryle et inhibe l'activité de la kinase GSK3 β (JANG, et al., 2013). GSK3 β pourrait être impliquée dans l'inactivation de NFATc1 en phosphorylant ce facteur, et Akt pourrait ainsi favoriser la translocation nucléaire de NFATc1 dans les OCs (JANG, et al., 2011 ; MOON, et al., 2012). Nos résultats objectivent pour la première fois la contribution de PKC ζ dans l'activation de NFATc1 induite par RANKL. Akt pourrait être une cible de PKC ζ , soit directement soit via la kinase Src, située en amont de Akt et capable d'interagir avec PKC ζ (SEIBENHENER, et al., 1999). Ces résultats ouvrent ainsi des perspectives d'investigation dans l'étude de NFATc1 dans les OCs, ce d'autant que des résultats préliminaires de notre laboratoire ont montré une augmentation de l'activation de la voie Akt dans les OCs pagétiques.

Dans les OCs pagétiques, nous avons observé une activation constitutive de NFATc1, encore augmentée par RANKL, avec une perte de cette activation en présence d'un inhibiteur de PKC ζ suggérant que PKC ζ contribue à l'activation basale de NFATc1 dans les OCs pagétiques. De plus, lorsque PKC ζ est inhibée, RANKL avait un effet inhibiteur avec une diminution significative de l'activation de NFATc1 dans les OCs pagétiques, phénomène qui n'était pas observé pas dans les OCs contrôles. Ce résultat suggère que dans les OCs pagétiques, RANKL induit un facteur inhibiteur de l'activation de NFATc1, dont l'action pourrait être bloquée par la PKC ζ . Ce facteur reste à déterminer, mais certaines kinases dont l'activation est stimulée par RANKL dans les OCs, comme les MAP kinases p38 ou JNK, les caséine kinases (CK1/2), ou GSK3 β , pourraient intervenir dans l'inactivation de NFATc1 par phosphorylation, prévenant ainsi sa localisation nucléaire. PKC ζ pourrait avoir un rôle dans l'activation induite par RANKL de ces kinases, dans le contexte de maladie de Paget, dans lequel les interactions entre PKC ζ et p62 sont renforcées, particulièrement en présence de la mutation *p62 p.P392L*, et modifient les voies de signalisation activées par RANKL (CHAMOIX, et al., 2013). L'impact de la mutation *p62 p.P392L* sur la contribution de PKC ζ dans l'activation de NFATc1 observée dans les OCs pagétiques sera bien sûr important à évaluer.

V- CONCLUSION

Dans le but d'évaluer les effets de RANKL sur le facteur de transcription NFATc1 dans les OCs humains et le phénotype des OCs de maladie de Paget, nous avons utilisé plusieurs techniques pour étudier son activation soit par translocation nucléaire (IF), soit par test fonctionnel (essai luciférase), et l'expression de NFATc1 a été étudiée au niveau transcriptionnelle (PCR quantitative) et protéique (Immunoblot).

Nos résultats démontrent pour la première fois dans des OCs humains que RANKL stimulait l'activation, et l'expression génique et protéique de NFATc1. De manière tout à fait originale, nous avons également montré que la PKC ζ contribuait à l'activation de NFATc1 induite par RANKL. Dans les OCs provenant de sujets avec maladie de Paget, et à l'instar de ce que les résultats de notre laboratoire avaient montré pour l'activation de la voie NF- κ B, la signalisation NFATc1 est augmentée dans ces OCs, après stimulation par RANKL, mais également dans les conditions basales. D'autres expériences seront nécessaires pour évaluer l'impact de la mutation *p62 p.P392L*, et apprécier le rôle de PKC ζ sur l'expression de NFATc1.

Les résultats obtenus dans notre travail, même s'ils sont incomplets du fait de problèmes techniques et d'effectifs largement discutés, ont permis d'entreprendre un volet très important dans l'étude de la pathogénie de la maladie de Paget, concernant l'activation de la voie NFATc1. La poursuite de l'étude de NFATc1 dans les OCs humains est également essentielle, toutes celles rapportées jusqu'à présent ayant été réalisées dans des lignées ou des modèles murins.

VI- PERSPECTIVES

Nos résultats ont permis une avancée considérable dans la compréhension des phénomènes impliqués dans le phénotype de l'OC pagétique. Des travaux de notre laboratoire avaient montré le rôle des interactions entre p62 et les kinases PKC ζ et PDK1. Nous montrons ici la contribution de l'activation de la voie NFATc1 dans laquelle PKC ζ est également impliquée. Les liens mécanistiques entre le complexe de signalisation p62/TRAF6/PKC ζ induit par RANKL et l'activation de la voie NFATc1 restent à définir, et pourraient faire intervenir la signalisation calcique et les kinases associées (Akt, GSK3 β). La contribution de ces différentes kinases dont l'activité est induite par RANKL a été discutée, selon un profil qui pourrait varier dans les OCs pagétiques et/ou en présence de la mutation *p62* p.P392L. La PKC ζ pourrait directement ou indirectement moduler l'activation de kinases agissant sur la phosphorylation de NFATc1. L'impact de ces différentes kinases sur l'activation de NFATc1 pourra être évaluée en utilisant des stimulations ou inhibitions pharmacologiques ou dans des expériences de délétions géniques (si ou shRNA) ciblant les gènes des kinases incriminées. L'impact sur le phénotype OC sera au mieux exploré dans des essais de résorption osseuse.

Dans le but de déterminer l'effet de la mutation de *p62* p.P392L sur l'expression/activation de NFATc1 dans les CBMs, des mises au point de la méthodologie de l'infection par lentivirus des variants de *p62* seront nécessaires. Compte tenu des difficultés à évaluer les cellules infectées par transfection pour l'essai luciférase, l'utilisation de lentivirus pourra également être adaptée aux essais luciférase, en utilisant des lentivirus exprimant les constructions NF κ B-Luc ou NFAT-Luc.

Une nouvelle cohorte de patients ayant une maladie de Paget et de sujets contrôles est en cours de constitution dans le laboratoire, ce qui permettra très certainement de poursuivre ces investigations, dans les conditions optimales que nos expériences sur les CBMs ont permis de définir.

VII- REMERCIEMENTS

Tout d'abord, j'aimerais remercier Dre Sophie Roux qui m'a accueillie dans son laboratoire pour ma maîtrise et qui m'a confié un projet très passionnant. Elle a su me guider tout au long de ma maîtrise, avec ses compétences et sa passion pour son domaine. Elle m'a également permis de parfaire mes compétences scientifiques, telle que de bien faire des présentations écrites et orales dans ce milieu. Je repars du laboratoire avec une expertise formidable et qui me servira tout au cours de ma future carrière.

Pendant les deux années passées dans le laboratoire, j'ai côtoyé des gens formidables qui m'ont aidé à compléter cette maîtrise. Je veux remercier tous les membres du laboratoire, en commençant par Dr Gino Laberge pour ses conseils et son expertise en recherche. Il m'a donné des nouvelles ressources dans mon cheminement. Je tiens à remercier Stephen McManus qui a su m'aider lors de mes différentes problématiques théoriques ou expérimentales durant ma maîtrise. Un merci particulier à Martine Bisson qui m'a suivie tout au long de mes expérimentations. Elle a su bien m'expliquer les manipulations nécessaires à mon cheminement, ainsi que répondre à toutes mes questions. Elle a toujours été disponible pour moi et a été une bonne source de motivation. Les dîners à la cafétéria n'auraient pas été les mêmes sans elle. D'ailleurs, ils m'ont tous montré que l'entraide et le travail d'équipe est efficace en recherche et contribue à l'avancement du laboratoire. Je repars remplie de nouvelles connaissances scientifiques et de personnes qui resteront des amis très chers. Également, je tiens à remercier les anciens membres du laboratoire : Dre Estelle Chamoux, David Fong et Caitline Porter qui ont répondu à mes différentes questions et ont su m'intéresser au projet de recherche.

J'aimerais remercier Dr Guillaume Grenier, Dre Nathalie Fauchoux, ainsi que les membres de leurs laboratoires. Ils ont proposé différentes techniques et ont répondu à différentes problématiques, lors de nos réunions et de nos présentations orales en groupe.

Je remercie les professeurs Nathalie Perreault et Guillaume Grenier qui ont accepté de donner du temps pour la révision et la correction de ce mémoire.

Pour finir, je tiens à remercier ma famille. Ma mère Maryse Boulay qui m'a toujours réconfortée et ma incitée à me surpasser. Mon père Denis Jean qui m'a toujours encouragée dans mes études. Sans mes parents, je n'aurais pas pu réaliser tout ça. Je vous remercie du fond du cœur. Je veux remercier mes deux sœurs Jessy et Émélie qui m'ont apporté beaucoup de soutien moral durant mes études. Étant leur petite sœur, elles ont toujours été fières de mes accomplissements. Je tiens à remercier mon conjoint David Lepage qui m'a supportée et aidée tout au long de mon cheminement. Étant lui-même à l'étude, il a pu m'apporter beaucoup de réconfort et de support moral.

Merci à vous tous.

VIII- RÉFÉRENCES

- Al-Daraji, W. I., Malak, T. T., Prescott, R. J., Abdellaoui, A., Ali, M. M., Dabash, T., Zelger, B. G. et Zelger, B. (2009) Expression, localisation and functional activation of NFAT-2 in normal human skin, psoriasis, and cultured keratocytes. *Int J Clin Exp Med*, **2**(2), 176-192.
- Albagha, O. M., Visconti, M. R., Alonso, N., Langston, A. L., Cundy, T., Dargie, R., Dunlop, M. G., Fraser, W. D., Hooper, M. J., Isaia, G., Nicholson, G. C., del Pino Montes, J., Gonzalez-Sarmiento, R., di Stefano, M., Tenesa, A., Walsh, J. P. et Ralston, S. H. (2010) Genome-wide association study identifies variants at CSF1, OPTN and TNFRSF11A as genetic risk factors for Paget's disease of bone. *Nat Genet*, **42**(6), 520-524.
- Albagha, O. M., Wani, S. E., Visconti, M. R., Alonso, N., Goodman, K., Brandi, M. L., Cundy, T., Chung, P. Y., Dargie, R., Devogelaer, J. P., Falchetti, A., Fraser, W. D., Gennari, L., Gianfrancesco, F., Hooper, M. J., Van Hul, W., Isaia, G., Nicholson, G. C., Nuti, R., Papapoulos, S., Montes Jdel, P., Ratajczak, T., Rea, S. L., Rendina, D., Gonzalez-Sarmiento, R., Di Stefano, M., Ward, L. C., Walsh, J. P. et Ralston, S. H. (2011) Genome-wide association identifies three new susceptibility loci for Paget's disease of bone. *Nat Genet*, **43**(7), 685-689.
- Aliprantis, A. O., Ueki, Y., Sulyanto, R., Park, A., Sigrist, K. S., Sharma, S. M., Ostrowski, M. C., Olsen, B. R. et Glimcher, L. H. (2008) NFATc1 in mice represses osteoprotegerin during osteoclastogenesis and dissociates systemic osteopenia from inflammation in cherubism. *J Clin Invest*, **118**(11), 3775-3789.
- Arguin, G., Caron, A. Z., Elkoreh, G., Denault, J. B. et Guillemette, G. (2010) The transcription factors NFAT and CREB have different susceptibilities to the reduced Ca²⁺ responses caused by the knock down of inositol trisphosphate receptor in HEK 293A cells. *Cell Physiol Biochem*, **26**(4-5), 629-640.
- Asagiri, M., Sato, K., Usami, T., Ochi, S., Nishina, H., Yoshida, H., Morita, I., Wagner, E. F., Mak, T. W., Serfling, E. et Takayanagi, H. (2005) Autoamplification of NFATc1 expression determines its essential role in bone homeostasis. *J Exp Med*, **202**(9), 1261-1269.
- Asagiri, M. et Takayanagi, H. (2007) The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone*, **40**(2), 251-264.
- Boyce, B. F. et Xing, L. (2008) Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys*, **473**(2), 139-146.
- Boyle, C. et Kim, I. Y. (2011) Three-dimensional micro-level computational study of Wolff's law via trabecular bone remodeling in the human proximal femur using design space topology optimization. *J Biomech*, **44**(5), 935-942.
- Boyle, W. J., Simonet, W. S. et Lacey, D. L. (2003) Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, **423**(6937), 337-342.
- Brisson, L., Reshkin, S. J., Gore, J. et Roger, S. (2012) pH regulators in invadosomal functioning: proton delivery for matrix tasting. *European journal of cell biology*, **91**(11-12), 847-860.

- Cavey, J. R., Ralston, S. H., Sheppard, P. W., Ciani, B., Gallagher, T. R., Long, J. E., Searle, M. S. et Layfield, R. (2006) Loss of ubiquitin binding is a unifying mechanism by which mutations of SQSTM1 cause Paget's disease of bone. *Calcif Tissue Int*, **78**(5), 271-277.
- Chamoux, E., Couture, J., Bisson, M., Morissette, J., Brown, J. P. et Roux, S. (2009) The p62 P392L mutation linked to Paget's disease induces activation of human osteoclasts. *Mol Endocrinol*, **23**(10), 1668-1680.
- Chamoux, E., McManus, S., Laberge, G., Bisson, M. et Roux, S. (2013) Involvement of kinase PKC-zeta in the p62/p62(P392L)-driven activation of NF-kappaB in human osteoclasts. *Biochim Biophys Acta*, **1832**(3), 475-484.
- Chen, G., Deng, C. et Li, Y. P. (2012) TGF-beta and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *Int J Biol Sci*, **8**(2), 272-288.
- Chung, P. Y. et Van Hul, W. (2012) Paget's Disease of Bone: Evidence for Complex Pathogenetic Interactions. *Semin Arthritis Rheum*, **41**(5), 616-641.
- Clarke, B. (2008) Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol*, **3** Suppl 3, S131-139.
- Daroszewska, A., van 't Hof, R. J., Rojas, J. A., Layfield, R., Landao-Basonga, E., Rose, L., Rose, K. et Ralston, S. H. (2011) A point mutation in the ubiquitin-associated domain of SQSTM1 is sufficient to cause a Paget's disease-like disorder in mice. *Hum Mol Genet*, **20**(14), 2734-2744.
- Day, C. J., Kim, M. S., Lopez, C. M., Nicholson, G. C. et Morrison, N. A. (2005) NFAT expression in human osteoclasts. *J Cell Biochem*, **95**(1), 17-23.
- Diaz-Meco, M. T. et Moscat, J. (2012) The atypical PKCs in inflammation: NF-kappaB and beyond. *Immunological reviews*, **246**(1), 154-167.
- Diaz-Meco, M. T. et Moscat, J. (2012) The atypical PKCs in inflammation: NF-kappaB and beyond. *Immunol Rev*, **246**(1), 154-167.
- Duran, A., Serrano, M., Leitges, M., Flores, J. M., Picard, S., Brown, J. P., Moscat, J. et Diaz-Meco, M. T. (2004) The atypical PKC-interacting protein p62 is an important mediator of RANK-activated osteoclastogenesis. *Dev Cell*, **6**(2), 303-309.
- Edwards, J. R. et Mundy, G. R. (2011) Advances in osteoclast biology: old findings and new insights from mouse models. *Nat Rev Rheumatol*, **7**(4), 235-243.
- Eriksen, E. F. (2010) Cellular mechanisms of bone remodeling. *Rev Endocr Metab Disord*, **11**(4), 219-227.
- Fong, D., Bisson, M., Laberge, G., McManus, S., Grenier, G., Faucheux, N. et Roux, S. (2013) Bone Morphogenetic Protein-9 Activates Smad and ERK Pathways and Supports Human Osteoclast Function and Survival in vitro. *Cell Signal*,
- Garneau, H., Paquin, M. C., Carrier, J. C. et Rivard, N. (2009) E2F4 expression is required for cell cycle progression of normal intestinal crypt cells and colorectal cancer cells. *J Cell Physiol*, **221**(2), 350-358.

- Geetha, T. et Wooten, M. W. (2002) Structure and functional properties of the ubiquitin binding protein p62. *FEBS Lett*, **512**(1-3), 19-24.
- Goode, A. et Layfield, R. (2010) Recent advances in understanding the molecular basis of Paget disease of bone. *J Clin Pathol*, **63**(3), 199-203.
- Guo, D. et Bonewald, L. F. (2009) Advancing our understanding of osteocyte cell biology. *Ther Adv Musculoskelet Dis*, **1**(2), 87-96.
- Hayden, M. S. et Ghosh, S. (2004) Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev*, **18**(18), 2195-2224.
- Helfrich, M. H. et Hocking, L. J. (2008) Genetics and aetiology of Pagetic disorders of bone. *Arch Biochem Biophys*, **473**(2), 172-182.
- Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J (2007) qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol* **8**: R19.
- Hirai, T. et Chida, K. (2003) Protein kinase Czeta (PKCzeta): activation mechanisms and cellular functions. *J Biochem (Tokyo)*, **133**(1), 1-7.
- Hocking, L. J., Herbert, C. A., Nicholls, R. K., Williams, F., Bennett, S. T., Cundy, T., Nicholson, G. C., Wuyts, W., Van Hul, W. et Ralston, S. H. (2001) Genomewide search in familial Paget disease of bone shows evidence of genetic heterogeneity with candidate loci on chromosomes 2q36, 10p13, and 5q35. *Am J Hum Genet*, **69**(5), 1055-1061.
- Hocking, L. J., Lucas, G. J., Daroszewska, A., Mangion, J., Olavesen, M., Cundy, T., Nicholson, G. C., Ward, L., Bennett, S. T., Wuyts, W., Van Hul, W. et Ralston, S. H. (2002) Domain-specific mutations in sequestosome 1 (SQSTM1) cause familial and sporadic Paget's disease. *Hum Mol Genet*, **11**(22), 2735-2739.
- Hodge, J. M., Kirkland, M. A., Aitken, C. J., Waugh, C. M., Myers, D. E., Lopez, C. M., Adams, B. E. et Nicholson, G. C. (2004) Osteoclastic potential of human CFU-GM: biphasic effect of GM-CSF. *J Bone Miner Res*, **19**(2), 190-199.
- Hogan, P. G., Chen, L., Nardone, J. et Rao, A. (2003) Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes & development*, **17**(18), 2205-2232.
- Hong, H., Shi, Z., Qiao, P., Li, H., McCoy, E. M., Mao, P., Xu, H., Feng, X. et Wang, S. (2013) Interleukin-3 plays dual roles in osteoclastogenesis by promoting the development of osteoclast progenitors but inhibiting the osteoclastogenic process. *Biochemical and biophysical research communications*,
- Houde, N., Chamoux, E., Bisson, M. et Roux, S. (2009) Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) induces human osteoclast apoptosis by up-regulating Bim. *J Biol Chem*, **284**(35), 23397-23404.
- Hwang, S. Y. et Putney, J. W. (2012) Orai1-mediated calcium entry plays a critical role in osteoclast differentiation and function by regulating activation of the transcription factor NFATc1. *Faseb J*, **26**(4), 1484-1492.

- Iotsova, V., Caamano, J., Loy, J., Yang, Y., Lewin, A. et Bravo, R. (1997) Osteopetrosis in mice lacking NF-kappaB1 and NF-kappaB2. *Nat Med*, **3**(11), 1285-1289.
- Ishida, N., Hayashi, K., Hoshijima, M., Ogawa, T., Koga, S., Miyatake, Y., Kumegawa, M., Kimura, T. et Takeya, T. (2002) Large scale gene expression analysis of osteoclastogenesis in vitro and elucidation of NFAT2 as a key regulator. *J Biol Chem*, **277**(43), 41147-41156.
- Jang, H. D., Noh, J. Y., Shin, J. H., Lin, J. J. et Lee, S. Y. (2013) PTEN regulation by the Akt/GSK-3beta axis during RANKL signaling. *Bone*, **55**(1), 126-131.
- Jang, H.D., Shin, J.H., Park, D.R., Hong, J.H., Yoon, K., Ko, R., Ko, C.Y., Kim, H.S., Jeong, D., Kim, N., Lee, S.Y. (2011) Inactivation of glycogen synthase kinase-3beta is required for osteoclast differentiation. *The Journal of biological chemistry* **286**: 39043-39050
- Kalliolias, G. D., Zhao, B., Triantafyllopoulou, A., Park-Min, K. H. et Ivashkiv, L. B. (2010) Interleukin-27 inhibits human osteoclastogenesis by abrogating RANKL-mediated induction of nuclear factor of activated T cells c1 and suppressing proximal RANK signaling. *Arthritis Rheum*, **62**(2), 402-413.
- Kim, K., Kim, J. H., Youn, B. U., Jin, H. M. et Kim, N. (2010) Pim-1 regulates RANKL-induced osteoclastogenesis via NF-kappaB activation and NFATc1 induction. *J Immunol*, **185**(12), 7460-7466.
- Komarova, S. V., Pereverzev, A., Shum, J. W., Sims, S. M. et Dixon, S. J. (2005) Convergent signaling by acidosis and receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) on the calcium/calcieneurin/NFAT pathway in osteoclasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**(7), 2643-2648.
- Kurihara, N., Reddy, S. V., Araki, N., Ishizuka, S., Ozono, K., Cornish, J., Cundy, T., Singer, F. R. et Roodman, G. D. (2004) Role of TAFII-17, a VDR binding protein, in the increased osteoclast formation in Paget's Disease. *J Bone Miner Res*, **19**(7), 1154-1164.
- Laitala-Leinonen, T. (2005) Unsatisfactory gene transfer into bone-resorbing osteoclasts with liposomal transfection systems. *J Negat Results Biomed*, **4**, 5.
- Lamothe, B., Webster, W. K., Gopinathan, A., Besse, A., Campos, A. D. et Darnay, B. G. (2007) TRAF6 ubiquitin ligase is essential for RANKL signaling and osteoclast differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*, **359**(4), 1044-1049.
- Laurin, N., Brown, J. P., Lemainque, A., Duchesne, A., Huot, D., Lacourciere, Y., Drapeau, G., Verreault, J., Raymond, V. et Morissette, J. (2001) Paget disease of bone: mapping of two loci at 5q35-qter and 5q31. *Am J Hum Genet*, **69**(3), 528-543.
- Laurin, N., Brown, J. P., Morissette, J. et Raymond, V. (2002) Recurrent mutation of the gene encoding sequestosome 1 (SQSTM1/p62) in Paget disease of bone. *Am J Hum Genet*, **70**(6), 1582-1588.
- Luxenburg, C., Geblinger, D., Klein, E., Anderson, K., Hanein, D., Geiger, B. et Addadi, L. (2007) The architecture of the adhesive apparatus of cultured osteoclasts: from podosome formation to sealing zone assembly. *PLoS One*, **2**(1), e179.
- Macian, F. (2005) NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol*, **5**(6), 472-484.

- Macian, F. (2005) NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nature reviews. Immunology*, **5**(6), 472-484.
- Manolagas, S. C. (2000) Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev*, **21**(2), 115-137.
- McManus, S., Chamoux, E., Bisson, M. et Roux, S. (2012) Modulation of tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptors in a human osteoclast model in vitro. *Apoptosis*, **17**(2), 121-131.
- McManus S, Bissonnette L, Roux S. Osteoclast biology in Paget's disease of bone. In: *Osteoclasts: Morphology, Functions and Clinical Implications* - A.J. Brown and J. S. Walker (Eds.), Nova Science Publishers, Hauppauge, NY, 2012; pp. 77-94.
- McManus, S. et Roux, S. (2012) The adaptor protein p62/SQSTM1 in osteoclast signaling pathways. *J Mol Signal*, **7**, 1.
- Menea, C., Barsony, J., Reddy, S. V., Cornish, J., Cundy, T. et Roodman, G. D. (2000) 1,25-Dihydroxyvitamin D3 hypersensitivity of osteoclast precursors from patients with Paget's disease. *J Bone Miner Res*, **15**(2), 228-236.
- Menea, C., Reddy, S. V., Kurihara, N., Maeda, H., Anderson, D., Cundy, T., Cornish, J., Singer, F. R., Bruder, J. M. et Roodman, G. D. (2000) Enhanced RANK ligand expression and responsiveness of bone marrow cells in Paget's disease of bone. *J Clin Invest*, **105**(12), 1833-1838.
- Michou, L., Chamoux, E., Couture, J., Morissette, J., Brown, J. P. et Roux, S. (2010) Gene expression profile in osteoclasts from patients with Paget's disease of bone. *Bone*, **46**(3), 598-603.
- Moon, J.B., Kim, J.H., Kim, K., Youn, B.U., Ko, A., Lee, S.Y., Kim, N. (2012) Akt induces osteoclast differentiation through regulating the GSK3beta/NFATc1 signaling cascade. *Journal of immunology* **188**: 163-169
- Morancho, B., Minguillon, J., Molkenin, J. D., Lopez-Rodriguez, C. et Aramburu, J. (2008) Analysis of the transcriptional activity of endogenous NFAT5 in primary cells using transgenic NFAT-luciferase reporter mice. *BMC Mol Biol*, **9**, 13.
- Morissette, J., Laurin, N. et Brown, J. P. (2006) Sequestosome 1: mutation frequencies, haplotypes, and phenotypes in familial Paget's disease of bone. *J Bone Miner Res*, **21 Suppl 2**, P38-44.
- Moscat, J., Diaz-Meco, M. T. et Wooten, M. W. (2009) Of the atypical PKCs, Par-4 and p62: recent understandings of the biology and pathology of a PB1-dominated complex. *Cell Death Differ*, **16**(11), 1426-1437.
- Moscat, J. et Diaz-Meco, M. T. (2012) p62: a versatile multitasker takes on cancer. *Trends Biochem Sci*, **37**(6), 230-236.
- Murphy, L. L. et Hughes, C. C. (2002) Endothelial cells stimulate T cell NFAT nuclear translocation in the presence of cyclosporin A: involvement of the wnt/glycogen synthase kinase-3 beta pathway. *J Immunol*, **169**(7), 3717-3725.

- Nakamura, K., Kimple, A. J., Siderovski, D. P. et Johnson, G. L. (2010) PB1 domain interaction of p62/sequestosome 1 and MEKK3 regulates NF-kappaB activation. *J Biol Chem*, **285**(3), 2077-2089.
- Negishi-Koga, T. et Takayanagi, H. (2009) Ca²⁺-NFATc1 signaling is an essential axis of osteoclast differentiation. *Immunological reviews*, **231**(1), 241-256.
- Negishi-Koga, T. et Takayanagi, H. (2009) Ca²⁺-NFATc1 signaling is an essential axis of osteoclast differentiation. *Immunol Rev*, **231**(1), 241-256.
- Novack, D. V. (2011) Role of NF-kappaB in the skeleton. *Cell Res*, **21**(1), 169-182.
- Parfitt, A. M., Mundy, G. R., Roodman, G. D., Hughes, D. E. et Boyce, B. F. (1996) A new model for the regulation of bone resorption, with particular reference to the effects of bisphosphonates. *J Bone Miner Res*, **11**(2), 150-159.
- Poor, G., Donath, J., Fornet, B. et Cooper, C. (2006) Epidemiology of Paget's disease in Europe: the prevalence is decreasing. *J Bone Miner Res*, **21**(10), 1545-1549.
- Porter, C. M., Havens, M. A. et Clipstone, N. A. (2000) Identification of amino acid residues and protein kinases involved in the regulation of NFATc subcellular localization. *J Biol Chem*, **275**(5), 3543-3551.
- Raisz, L. G. (1999) Physiology and pathophysiology of bone remodeling. *Clin Chem*, **45**(8 Pt 2), 1353-1358.
- Ralston, S. H. et Layfield, R. (2012) Pathogenesis of Paget disease of bone. *Calcif Tissue Int*, **91**(2), 97-113.
- Rao, A., Luo, C. et Hogan, P. G. (1997) Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol*, **15**, 707-747.
- Rea, S. L., Walsh, J. P., Ward, L., Yip, K., Ward, B. K., Kent, G. N., Steer, J. H., Xu, J. et Ratajczak, T. (2006) A novel mutation (K378X) in the sequestosome 1 gene associated with increased NF-kappaB signaling and Paget's disease of bone with a severe phenotype. *J Bone Miner Res*, **21**(7), 1136-1145.
- Reyland, M. E. (2009) Protein kinase C isoforms: Multi-functional regulators of cell life and death. *Front Biosci*, **14**, 2386-2399.
- Robling, A. G., Castillo, A. B. et Turner, C. H. (2006) Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annu Rev Biomed Eng*, **8**, 455-498.
- Robling, A. G., Castillo, A. B. et Turner, C. H. (2006) Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annual review of biomedical engineering*, **8**, 455-498.
- Roux, S. et Orcel, P. (2000) Bone loss. Factors that regulate osteoclast differentiation: an update. *Arthritis Res*, **2**(6), 451-456.
- Salo, J., Lehenkari, P., Mulari, M., Metsikko, K. et Vaananen, H. K. (1997) Removal of osteoclast bone resorption products by transcytosis. *Science*, **276**(5310), 270-273.

San-Antonio, B., Iniguez, M. A. et Fresno, M. (2002) Protein kinase Czeta phosphorylates nuclear factor of activated T cells and regulates its transactivating activity. *J Biol Chem*, **277**(30), 27073-27080.

Seibenhener, M. L., Roehm, J., White, W. O., Neidigh, K. B., Vandenplas, M. L. et Wooten, M. W. (1999) Identification of Src as a novel atypical protein kinase C-interacting protein. *Mol Cell Biol Res Commun*, **2**(1), 28-31.

Seibenhener, M. L., Babu, J. R., Geetha, T., Wong, H. C., Krishna, N. R. et Wooten, M. W. (2004) Sequestosome 1/p62 is a polyubiquitin chain binding protein involved in ubiquitin proteasome degradation. *Mol Cell Biol*, **24**(18), 8055-8068.

Seibenhener, M. L., Geetha, T. et Wooten, M. W. (2007) Sequestosome 1/p62--more than just a scaffold. *FEBS Lett*, **581**(2), 175-179.

Seitz, S., Priemel, M., Zustin, J., Beil, F. T., Semler, J., Minne, H., Schinke, T. et Amling, M. (2009) Paget's disease of bone: histologic analysis of 754 patients. *J Bone Miner Res*, **24**(1), 62-69.

Serfling, E., Chuvpilo, S., Liu, J., Hofer, T. et Palmethofer, A. (2006) NFATc1 autoregulation: a crucial step for cell-fate determination. *Trends Immunol*, **27**(10), 461-469.

Seton, M., Moses, A. M., Bode, R. K. et Schwartz, C. (2011) Paget's disease of bone: the skeletal distribution, complications and quality of life as perceived by patients. *Bone*, **48**(2), 281-285.

Singer, F. R. (2009) Paget disease: when to treat and when not to treat. *Nat Rev Rheumatol*, **5**(9), 483-489.

Smith, D. W., Gardiner, B. S. et Dunstan, C. (2012) Bone balance within a cortical BMU: local controls of bone resorption and formation. *PLoS One*, **7**(7), e40268.

Song, I., Kim, J. H., Kim, K., Jin, H. M., Youn, B. U. et Kim, N. (2009) Regulatory mechanism of NFATc1 in RANKL-induced osteoclast activation. *FEBS Lett*, **583**(14), 2435-2440.

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.

Sundaram, K., Nishimura, R., Senn, J., Youssef, R. F., London, S. D. et Reddy, S. V. (2007) RANK ligand signaling modulates the matrix metalloproteinase-9 gene expression during osteoclast differentiation. *Exp Cell Res*, **313**(1), 168-178.

Sundaram, K., Shanmugarajan, S., Rao, D. S. et Reddy, S. V. (2011) Mutant p62P392L stimulation of osteoclast differentiation in Paget's disease of bone. *Endocrinology*, **152**(11), 4180-4189.

Takahashi, N., Maeda, K., Ishihara, A., Uehara, S., Kobayashi, Y. (2011) Regulatory mechanism of osteoclastogenesis by RANKL and Wnt signals. *Front Biosci (Landmark Ed)* **16**: 21-30

Takatsuna, H., Asagiri, M., Kubota, T., Oka, K., Osada, T., Sugiyama, C., Saito, H., Aoki, K., Ohya, K., Takayanagi, H. et Umezawa, K. (2005) Inhibition of RANKL-induced osteoclastogenesis by (-)-DHMEQ, a novel NF-kappaB inhibitor, through downregulation of NFATc1. *J Bone Miner Res*, **20**(4), 653-662.

- Takayanagi, H., Kim, S., Koga, T., Nishina, H., Isshiki, M., Yoshida, H., Saiura, A., Isobe, M., Yokochi, T., Inoue, J., Wagner, E. F., Mak, T. W., Kodama, T. et Taniguchi, T. (2002) Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell*, **3**(6), 889-901.
- Takayanagi, H. (2007) The role of NFAT in osteoclast formation. *Ann N Y Acad Sci*, **1116**, 227-237.
- Takayanagi, H. (2007) The role of NFAT in osteoclast formation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1116**, 227-237.
- Takeshita, S., Namba, N., Zhao, J. J., Jiang, Y., Genant, H. K., Silva, M. J., Brodt, M. D., Helgason, C. D., Kalesnikoff, J., Rauh, M. J., Humphries, R. K., Krystal, G., Teitelbaum, S. L. et Ross, F. P. (2002) SHIP-deficient mice are severely osteoporotic due to increased numbers of hyper-resorptive osteoclasts. *Nat Med*, **8**(9), 943-949.
- Vaananen, H. K. et Laitala-Leinonen, T. (2008) Osteoclast lineage and function. *Arch Biochem Biophys*, **473**(2), 132-138.
- Vihma, H., Pruunsild, P. et Timmusk, T. (2008) Alternative splicing and expression of human and mouse NFAT genes. *Genomics*, **92**(5), 279-291.
- Wilkins, B. J., Dai, Y. S., Bueno, O. F., Parsons, S. A., Xu, J., Plank, D. M., Jones, F., Kimball, T. R. et Molkentin, J. D. (2004) Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy. *Circ Res*, **94**(1), 110-118.
- Winslow, M. M., Pan, M., Starbuck, M., Gallo, E. M., Deng, L., Karsenty, G. et Crabtree, G. R. (2006) Calcineurin/NFAT signaling in osteoblasts regulates bone mass. *Dev Cell*, **10**(6), 771-782.
- Wong, B. R., Besser, D., Kim, N., Arron, J. R., Vologodskaya, 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.
- Xiong, J., Onal, M., Jilka, R. L., Weinstein, R. S., Manolagas, S. C. et O'Brien, C. A. (2011) Matrix-embedded cells control osteoclast formation. *Nat Med*, **17**(10), 1235-1241.
- Yip, K. H., Feng, H., Pavlos, N. J., Zheng, M. H. et Xu, J. (2006) p62 ubiquitin binding-associated domain mediated the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand-induced osteoclast formation: a new insight into the pathogenesis of Paget's disease of bone. *Am J Pathol*, **169**(2), 503-514.
- Zhao, B. et Ivashkiv, L. B. (2011) Negative regulation of osteoclastogenesis and bone resorption by cytokines and transcriptional repressors. *Arthritis Res Ther*, **13**(4), 234.
- Zhou, B., Cron, R. Q., Wu, B., Genin, A., Wang, Z., Liu, S., Robson, P. et Baldwin, H. S. (2002) Regulation of the murine Nfatc1 gene by NFATc2. *J Biol Chem*, **277**(12), 10704-10711.
- Zuo, C., Huang, Y., Bajis, R., Sahih, M., Li, Y. P., Dai, K. et Zhang, X. (2012) Osteoblastogenesis regulation signals in bone remodeling. *Osteoporos Int*, **23**(6), 1653-1663.