

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

IMPLICATION DE ICAM-1 ET DE ICAM SOLUBLE DANS  
L'OSTÉOCLASTOGÉNÈSE

par

PATRICK LAVIGNE

DÉPARTEMENT DE SCIENCES BIOMÉDICALES

FACULTÉ DE MÉDECINE

THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE  
PHILOSOPHIAE DOCTOR (Ph.D.)  
(SCIENCES BIOMÉDICALES)

HIVER 2007

©Patrick Lavigne, 2007



W  
4  
USB  
2007  
v.114

Direction des bibliothèques

## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

**UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL**

**FACULTÉ DES ÉTUDES SUPÉRIEURES**

**Cette thèse intitulée :**

**IMPLICATION DE ICAM-1 ET DE ICAM SOLUBLE DANS  
L'OSTÉOCLASTOGÉNÈSE**

**Présentée par : LAVIGNE Patrick**

**En vue de l'obtention du diplôme de : Philosophiae Doctor**

**A été dûment acceptée par le jury d'examen constitué de :**

**Dr PARENT Stefan, MD, PhD, président**

**Dr FERNANDES Julio C., MD, M.Sc., membre du jury et directeur de recherche**

**Dr LAJEUNESSE Daniel, PhD, membre du jury et directeur de recherche**

**Dr REBOUL Pascal, PhD, membre du jury**

**Dr de BRUM-FERNANDES Artur, MD, PhD, évaluateur externe**

## RÉSUMÉ

**Introduction:** Dans l'os, la molécule d'adhésion intercellulaire (ICAM) -1 permet l'interaction entre l'ostéoblaste (Ob) et le pré-ostéoclaste (pré-Oc). Cette interaction de haute affinité permet la stabilisation des 2 types cellulaires, favorisant ainsi l'ostéoclastogénèse par la facilitation de la présentation du récepteur activator NF  $\kappa$ b (RANK) sur le pré-Oc et de son ligand (RANKL) sur l'Ob. Aucune autre fonction n'est décrite pour ICAM-1 dans l'os, pas plus que pour sa forme circulante ICAM soluble (sICAM). Par contre, l'engagement de ICAM-1 mène à la production de médiateurs de différenciation des Oc (ODF). Notre hypothèse est donc que ICAM-1, en plus de stabiliser le couple Ob/pré-Oc, favorise directement la différenciation des Oc par la production d'ODF. Aussi, nous voulons étudier le rôle de sICAM dans le métabolisme des Oc.

**Objectifs:** 1) Décrire le phénotype ICAM-1 à la surface des Ob dans l'ostéoarthrose (OA), l'ostéoporose (OP) et chez des individus sains. 2) Relier le profil de sICAM sérique avec la densité osseuse. 3) Démontrer que ICAM-1 et sICAM exercent un rôle actif dans l'ostéoclastogénèse.

**Méthodes :** Les spécimens osseux proviennent de patients OA, OP ou de donneurs d'organes sains (normaux) récupérés lors de chirurgies ou autopsies. Les monocytes proviennent du sang de donneurs sains. Les cultures d'Ob furent réalisées dans des conditions habituelles. L'expression membranaire de ICAM-1 fut évaluée par immunohistochimie. La concentration sérique de sICAM et de tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) 5b fut évaluée par ELISA chez 111 patientes OP chez qui une densitométrie osseuse avait été préalablement faite. La différenciation ainsi que la

fonction des Oc en mono/co-culture furent évaluées en dosant TRAP 5b et en mesurant l'aire de résorption osseuse en culture respectivement. La production de ODF par les Ob et les pré-Oc suite à la stimulation avec sICAM ou ICAM-1 fut évalué par RT-PCR.

**Résultats :** L'étude de l'expression de ICAM-1 a révélé une expression moyenne de ICAM-1 plus élevée chez l'Ob ostéoporotique que chez les normaux ( $p \leq 0.02$ ). La concentration sérique de sICAM était supérieure chez les patients OP non traités comparés aux normaux ( $p \leq 0.01$ ) alors qu'elle se normalisait chez les OP traités avec biphosphonates. Le profil sérique de sICAM était relié à celui de TRAP 5b. L'effet de ICAM-1 et de sICAM sur la différenciation et la fonction des Oc a révélé que sICAM augmentait de façon significative la résorption osseuse sans toutefois affecter leur différenciation. Par contre, l'engagement de ICAM-1 augmente l'expression de RANKL par l'Ob. De plus, sICAM favorise la survie des pré-Oc contrairement à ICAM-1, qui diminue la survie des Ob.

**Conclusion :** Cette étude démontre que l'expression de ICAM-1 ainsi que la concentration de sICAM sérique sont supérieures dans l'OP et semble refléter l'activité des Oc. Par ailleurs, nous décrivons pour la première fois une augmentation de l'expression de RANKL suite à l'engagement de ICAM-1 ainsi qu'une augmentation de la résorption osseuse suite à la présence de sICAM. Nous croyons donc que ICAM-1 et sICAM sont des joueurs clés dans la biologie des Oc ce qui pourrait faire d'eux des cibles thérapeutiques potentielles dans les maladies Oc-dépendantes.

**Mots-clés :** ICAM-1, ostéoclaste, ostéoblaste, métabolisme osseux, ostéoclastogénèse

## ABSTRACT

**Introduction:** In the context of osteoclastogenesis, intercellular adhesion molecule (ICAM) -1 is believed to provide a high affinity adhesion between the osteoblast (Ob) and the osteoclast (Oc) precursor thereby facilitating the interaction between receptor activator nuclear  $\kappa$ B ligand (RANKL) and its receptor RANK. Further, it has been reported that ICAM-1 cross-linking in various cell type leads to an increase production of mediators also known to be involved in Oc formation. ICAM-1 is also found as a soluble protein. However, there is no known role currently described for sICAM in bone metabolism. Therefore, our working hypothesis is that ICAM-1 contributes to Oc formation by providing a high affinity adhesion between the Ob and the pre-Oc, as previously described, but also by stimulating the production of Oc differentiation factors. We also want to evaluate the potential actions of sICAM in osteoclastogenesis.

**Objectives:** 1) To describe the pattern of expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) at the surface of human osteoblasts recovered from normal (control), osteoporotic (OP), and osteoarthritic (OA) bone. 2) To relate circulating sICAM concentration to TRAP 5b activity and bone mass. 3) To describe an active role for both sICAM and ICAM-1 in osteoclastogenesis.

**Materials and methods:** Bone specimens were taken from patients suffering from OA, OP or from healthy organ donors. Peripheral blood monocytes were isolated from blood of healthy donors. Bone explants and monocytes were cultured using standard methods. ICAM-1 expression was evaluated using immunohistochemistry while sICAM and TRAP 5b concentration were determined by ELISA. Oc formation and function were assessed by the dosage of TRAP 5b and the presence of resorption pit in bone slice culture.

**Results:** Average ICAM-1 expression was different between control and OP bone ( $p < 0.02$ ) while sICAM concentration was greater in non treated OP patients and paralleled that of TRAP 5b. sICAM significantly increased resorption area in culture without affecting the formation of Oc. On the other hand, ICAM-1 cross-linking resulted in an increase in RANKL expression. Further, sICAM increased pre-Oc survival as opposed to ICAM-1, who decreased Ob survival in vitro.

**Conclusion:** The results show that ICAM-1 expression in human bone and in the blood seem to be related to Oc activity and bone turnover. Further, we describe for the first an increased in RANKL expression related to ICAM-1 engagement and an increase in Oc activity in the presence of sICAM. We believe that ICAM-1 and sICAM are active, key regulators of osteoclastogenesis. The results of the present study could potentially lead to the generation of a new class of therapeutic targets.

**Key words :** ICAM-1, osteoclast, osteoblast, bone metabolism, osteoclastogenesis



## TABLE DES MATIÈRES

|   |           |
|---|-----------|
| Liste des tableaux  | xi        |
| Liste des figures   | xii       |
| Liste des abréviations  | xiii      |
| Remerciements   | xvi       |
| <b>CHAPITRE 1 – Introduction</b>  | <b>1</b>  |
| <b>CHAPITRE 2 – États des connaissances</b>                                       | <b>11</b> |
| <b>2.1 Ostéogénèse</b>  | <b>11</b> |
| 2.1.1 L'os macroscopique en formation   | 12        |
| 2.1.2 Mécanismes de contrôle centraux de la formation osseuse                     | 13        |
| 2.1.3 Mécanismes de contrôle locaux de la formation osseuse                       | 16        |
| 2.1.4 Mécanismes de contrôle intracellulaire de la formation osseuse              | 18        |
| <b>2.2 Structure et fonctions de l'os adulte</b>                                  | <b>19</b> |
| <b>2.3 Déterminant du métabolisme osseux</b>                                      | <b>21</b> |
| 2.3.1 La vitamine D   | 21        |
| 2.3.2 La PTH  | 23        |
| 2.3.3 Les hormones sexuelles  | 26        |
| 2.3.4 Autres facteurs impliqués dans l'homéostasie osseuse                        | 28        |
| <b>2.4 L'os au niveau cellulaire</b>  | <b>30</b> |
| 2.4.1 L'ostéoblaste   | 30        |
| 2.4.2 L'ostéoclaste   | 33        |
| 2.4.2.1 Régulation de la différenciation cellulaire : l'axe CSF-1 et c-fms        | 36        |
| 2.4.2.2 Régulation de la différenciation cellulaire : l'axe RANKL/RANK/OPG        | 36        |
| 2.4.2.3 Régulation de la différenciation cellulaire : l'axe NO et les oestrogènes | 45        |

|   |    |
|---|----|
| 2.4.2.4 <i>Régulation de la différenciation cellulaire : un nouvel axe?</i> | 47 |
| 2.4.3 Couplage entre la formation et la résorption osseuse                  | 47 |
| <b>2.5 ICAM-1</b>   | 50 |
| 2.5.1 Structure et fonction de ICAM-1 et de sICAM                           | 50 |
| 2.5.2 ICAM-1 et la physiologie osseuse                                      | 53 |
| 2.5.3 ICAM-1 dans les pathologies osseuses                                  | 55 |
| 2.5.3.1 <i>ICAM-1 dans RA</i>   | 55 |
| 2.5.3.2 <i>ICAM-1 dans OA</i>   | 57 |
| 2.5.3.3 <i>ICAM-1 dans OP</i>   | 58 |
| 2.5.4 ICAM-1 comme cible thérapeutique dans les pathologies squelettiques   | 59 |
| 2.5.5 ICAM-1 comme cible thérapeutique dans d'autres pathologies            | 62 |
| 2.5.5.1 <i>Les maladies auto-immunes et la transplantation</i>              | 62 |
| 2.5.5.2 <i>Les grands brûlés</i>  | 63 |
| <b>2.6 sICAM</b>  | 63 |
| <b>2.7 Apoptose</b>   | 66 |
| 2.7.1 L'apoptose et ses mécanismes de contrôle                              | 66 |
| 2.7.2 L'apoptose dans l'ostéoclaste   | 69 |
| 2.7.3 L'apoptose dans l'ostéoblaste   | 71 |
| 2.7.4 Rôles de ICAM-1 et de sICAM dans l'apoptose                           | 73 |
| <b>2.8 Hypothèse générale et objectifs spécifiques</b>                      | 74 |
| <b>CHAPITRE 3 – MATÉRIEL ET MÉTHODES</b>                                    | 77 |
| <b>3.1 Article 1 : Expression membranaire de ICAM-1</b>                     | 77 |
| 3.1.1 Provenance des échantillons   | 77 |
| 3.1.2 Préparation des échantillons  | 78 |
| 3.1.3 Culture cellulaire  | 78 |
| 3.1.4 Récupération des cellules   | 79 |
| 3.1.5 Évaluation de l'expression membranaire de ICAM-1                      | 79 |

|  |     |
|--|-----|
| 3.1.6 Détermination de la production de PGE <sub>2</sub>   | 80  |
| 3.1.7 Détermination de la production de IL-6   | 80  |
| 3.1.8 Analyse statistique  | 81  |
| <b>3.2 Article 2 : Évaluation des concentrations sériques de sICAM chez les patients ostéoporotiques</b>   | 81  |
| 3.2.1 Population   | 81  |
| 3.2.2 Ostéodensitométrie   | 82  |
| 3.2.3 Détermination des niveaux sériques de sICAM  | 82  |
| 3.2.4 Détermination des niveaux sériques de TRAP 5b  | 83  |
| 3.2.5 Analyse statistique  | 83  |
| <b>3.3 Article 3 : Effets de la présence de sICAM sur la fonction et la différenciation des ostéoclastes</b>                                     | 83  |
| 3.3.1 Provenance et isolement des monocytes humains  | 83  |
| 3.3.2 Production des facteurs de différenciation des ostéoclastes produits par les pré-ostéoclastes et les ostéoblastes                          | 84  |
| 3.3.3 Co-cultures ostéoblastes et pré-ostéoclastes   | 86  |
| 3.3.4 Évaluation de la formation des ostéoclastes  | 86  |
| 3.3.5 Évaluation de la fonction des ostéoclastes   | 86  |
| 3.3.6 Viabilité cellulaire   | 87  |
| 3.3.7 Analyse statistique  | 87  |
| <b>CHAPITRE 4 – RÉSULTATS</b>  | 88  |
| <b>4.1 Article 1 : Expression of ICAM-1 by osteoblasts in healthy individuals and in patients suffering from osteoarthritis and osteoporosis</b> | 88  |
| <b>4.2 Article 2: Increased serum sICAM levels in osteoporotic patients</b>  | 119 |
| <b>4.3 Article 3: sICAM increases osteoclast activity in vitro</b>   | 133 |
| <b>4.4 Article 4: Involvement of ICAM-1 in bone metabolism: a potential target in the treatment of bone diseases?</b>                            | 159 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>4.5 Résultats complémentaires</b>                   | 172 |
| <b>CHAPITRE 5 – DISCUSSION ET PERSPECTIVES FUTURES</b> | 174 |
| <b>5.1 Discussion générale</b>                         | 174 |
| <b>5.2 Conclusions</b>                                 | 183 |
| <b>CHAPITRE 6 – PERSPECTIVES FUTURES</b>               | 185 |
| <b>6.1 Conclusion</b>                                  | 189 |
| <b>RÉFÉRENCES</b>                                      | 190 |
| <b>ANNEXE I</b>  | 217 |

**LISTE DES TABLEAUX**

|   |    |
|---|----|
| <b>Tableau 1.</b> Stratégies thérapeutiques potentielles ayant pour cible l'axe<br>RANK/RANKL/OPG | 46 |
| <b>Tableau 2.</b> Facteurs influençant la concentration sérique de sICAM                          | 65 |
| <b>Tableau 3.</b> Activité des différentes caspases   | 69 |

## LISTE DES FIGURES

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figure 1.</b> Radiographie d'un fémur dans le plan coronal   | 20  |
| <b>Figure 2.</b> Actions et métabolisme de la vitamine D  | 24  |
| <b>Figure 3.</b> La vitamine D et l'ostéoclastogénèse   | 25  |
| <b>Figure 4.</b> Action de la PTH en réponse à une baisse de la calcémie  | 26  |
| <b>Figure 5.</b> Facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des Ob   | 32  |
| <b>Figure 6.</b> Configuration de l'ostéoclaste actif   | 35  |
| <b>Figure 7.</b> Signalisation intracellulaire de l'axe RANKL/RANK/OPG  | 39  |
| <b>Figure 8.</b> Résumé des différents facteurs affectant la différenciation et la fonction des ostéoclastes  | 42  |
| <b>Figure 9.</b> Structure de ICAM-1  | 52  |
| <b>Figure 10.</b> Représentation générale de la cascade apoptotique   | 68  |
| <b>Figure 11.</b> Action de différents médiateurs sur la cascade apoptotique des ostéoblastes   | 72  |
| <b>Figure 12.</b> Détermination de la Caspase-3 dans les monocytes humains après stimulation avec divers médiateurs   | 172 |
| <b>Figure 13.</b> L'engagement de ICAM-1 entraîne une augmentation de l'expression de la caspase-3 et une diminution de la viabilité cellulaire en présence d'un initiateur de l'apoptose | 173 |

**LISTE DES ABRÉVIATIONS**

- BMD – Densité Osseuse  
BMP – Bone Morphogenic Protein  
CFS – Colony Stimulating Factor  
DMEM – Dulbecco's Modified Eagles Medium  
ERK – E Receptor Kinase  
FAK – Focal Adhesion Kinase  
FBS – Sérum Bovin Fétal  
FGF – Fibroblast Growth Factor  
GC – Glucocorticoïde  
GH – Growth Hormone  
HNE – Hydroxynonéal  
ICAM – Intercellular Adhesion Molecule  
IGF – Facteur insulino-mimétique  
Ihh – Indian Hedgehog  
IKK – I Kappa B Kinase  
IL – Interleukine  
ITAM – Immune Tyrosine-based Activation Motif  
JNK – Jun amino terminal Kinase  
LFA – Leukocyte Function Antigen  
mAb – Anticorps monoclonaux  
M-CSF – Macrophage Colony Stimulating Factor  
MEM – Minimal Essential Medium  
MIP - Macrophage Inflammatory Protein  
MM – Myélome Multiple  
MSC – Mesenchymal Stem Cell  
NTX – N-télopeptide  
OA – Ostéoarthrose  
Ob – Ostéoblaste  
Oc – Ostéoclaste

ODF – Osteoclast Differentiation Factor

OP – Ostéoporose

OPG – Osteoprotégérine

OS – Ostéosarcome

PG – Prostaglandine

PBMC – Monocytes du Sang Périphérique

PS – Pénicilline/Streptomycine

PTH<sub>r</sub>P – Parathyroïde Hormone Receptor Protein

RA – Arthrite Rhumatoïde

RANKL – Receptor Activator Nuclear Factor kb Ligand

SD – Déviation Standard

SEM – Erreur Standard

T<sub>3</sub> – Thyroxine

TGF – Tumor Growth Factor

TNF – Tumor Necrosis Factor

TRAIL – Tumor Necrosis Factor Related Ligand

TRAP – Tartrate Resistant Acid Phosphatase

VDR – Vitamin D Receptor



**À Marie-josée, Xavier et Simon**

## REMERCIEMENTS

Il y déjà plus de 10 ans, je quittais le monde de la recherche pour débiter mes études de médecine. Au fil des ans, je me suis aperçu que la médecine était en fait une science fondée sur l'observation des humains, mais que beaucoup de choses restaient inconnues quant aux processus physiopathologiques sous-jacents aux maladies. Conscient de l'importance de la recherche pour l'avancement de la médecine, il aura tout de même fallu des événements déclencheurs pour que je me lance dans le cheminement un peu particulier du clinicien-chercheur.

Le premier événement fut sans aucun doute la rencontre du Dr Julio Fernandes, alors orthopédiste à l'hôpital Notre-Dame mais surtout clinicien-chercheur fondamentaliste. Il a su, suite à un stage de 3 mois dans son laboratoire, raviver mon intérêt pour la recherche. Le second événement fut la rencontre du Dr Stefan Parent, alors résident en orthopédie. Je m'en souviens comme si c'était hier. Il aura suffi d'une conférence sur la recherche à l'hôpital Sacré-Cœur suivie d'une longue discussion dans sa voiture pour que Stefan me convainque de débiter ma maîtrise. Un merci particulier à toi Stefan pour avoir ouvert les portes et avoir en quelque sorte guidé mon cheminement en recherche, mais aussi celui de plusieurs autres. Je suis et serai toujours reconnaissant pour tout ce que tu as fait pour moi.

Cela fait déjà plus de 6 ans mais je m'arrête aujourd'hui et je me rends compte combien la recherche au département d'orthopédie de l'université de Montréal a

progressé depuis. Il y avait bien quelques chercheurs établis « dans le temps », mais il aura fallu que quelqu'un fasse comprendre aux résidents et aux autres patrons du programme l'importance de la recherche. Sans les efforts des Drs Fernandes et Labelle entre autres, la recherche en orthopédie à l'université de Montréal ne serait pas ce qu'elle est aujourd'hui et je ne serais pas en train d'écrire ces lignes. Beaucoup de gens ont aussi contribué à ma formation et je prendrai les quelques lignes qui suivent pour les remercier.

Je voudrais remercier tout d'abord mes co-directeurs, les Drs Fernandes et Lajeunesse, pour m'avoir permis de réaliser ce projet et pour m'avoir soutenu et appuyé dans mes démarches. Je n'aurais pu réaliser ce parcours pour le moins inhabituel sans votre aide et votre compréhension. Merci pour tout.

À toute l'équipe du laboratoire, particulièrement Qin Shi et au Dr Mohamed Benderdour, pour leur aide technique, leur disponibilité et leurs conseils.

Je tiens aussi à remercier tous les chirurgiens qui ont pris le temps de prélever et d'envoyer au laboratoire des spécimens osseux essentiels pour nos projets. C'est un geste très apprécié.

Merci au FRSQ pour leur support financier durant la réalisation de ce projet. Un merci particulier au programme MENTOR et au Dr Hubert Labelle, pour leur soutien financier mais aussi pour l'encouragement et appui apporté au fil des ans.

À mes parents et mes frères qui m'ont toujours dit que je pouvais faire ce que je voulais dans la vie et qui m'ont appris très tôt à ne jamais lâcher pour atteindre mes objectifs.

Finalement, un merci tout spécial à toi Marie-Josée, pour ta grande patience et ton support inconditionnel dans tous mes projets. Tu m'as suivi à l'autre bout du monde pendant un an et tu m'as appuyé sans conditions ces dernières années même si mon horaire était débordé. À mes deux petits amours, Simon et Xavier. Quel plaisir de vous regarder grandir. Je vous aimerai toujours.

## CHAPITRE 1 INTRODUCTION

Le squelette humain, composé de plus de 200 os, est un tissu dynamique en perpétuel remaniement où la formation et la résorption osseuse sont étroitement régulées par divers mécanismes centraux et locaux. L'os est également un réservoir de minéraux, où l'absorption, l'excrétion et les échanges de minéraux entre le sang et l'os sont aussi soumis à ce contrôle étroit. En plus de permettre la mobilité, l'os a un rôle de soutien et de protection pour divers organes et est un centre hématopoïétique.

Le maintien d'un squelette osseux en santé dépend de l'équilibre entre la formation et la résorption osseuse. Toutes anomalies dans ce processus mènent à des pathologies du squelette. Au niveau cellulaire, le cycle de remodelage osseux comprend la résorption osseuse, qui est secondaire à l'action des ostéoclastes (Oc) d'origine hématopoïétique. Il comprend aussi la formation de l'os, soit le dépôt de matrice par les ostéoblastes (Ob) d'origine mésenchymateuse, matrice qui devient par la suite minéralisée. Outre des mécanismes de contrôle centraux et locaux, diverses interactions entre les cellules osseuses sont nécessaires pour la formation et le maintien de la masse osseuse. Par exemple dans l'embryon, le développement de l'os nécessite des contacts cellulaires qui régulent la migration, l'agrégation et la condensation des progéniteurs osseux. Essentiels chez le fœtus, les contacts cellule-cellule entre Ob, ostéocytes, Oc et cellules souches de la cavité médullaire régissent aussi à plusieurs niveaux le remodelage osseux de l'enfant et de l'adulte.

Les molécules d'adhésion cellulaire jouent donc un rôle primordial dans le métabolisme osseux en permettant non seulement ce contact cellule-cellule essentiel à la régulation de la masse osseuse, mais aussi le contact cellule-matrice. Ces molécules agissent en quelque sorte comme une « colle » entre les cellules ou la matrice, mais peuvent aussi réguler les fonctions cellulaires par la transmission de signaux intracellulaires. Par exemple, la formation osseuse est en partie dépendante de l'engagement des intégrines, présentes à la surface des Ob, avec la matrice environnante. La liaison de la matrice à la sous-unité  $\beta_1$  des intégrines induit chez l'Ob prolifération, différenciation et synthèse de matrice via l'activation de tyrosine kinase telle que la « focal adhesion kinase » (FAK) [1]. De même, la présence de molécules d'adhésion intercellulaire (ICAM) -1 à la surface des Ob peut déterminer une fonction cellulaire particulière. En effet, les Ob au phénotype ICAM-1<sup>-</sup> ont tendance à proliférer et à synthétiser la matrice osseuse, tandis que les Ob ICAM-1<sup>+</sup> sont plus susceptibles à l'apoptose et permettent également l'interaction avec les Oc [2].

L'adhésion cellulaire est donc aussi primordiale pour la formation et l'activité des Oc. Le "receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand" (RANKL) présent sur la surface des Ob se lie au récepteur RANK sur la surface des pré-Oc et mène à la maturation et l'activation de ces derniers, une étape essentielle dans l'ostéoclastogénèse [2, 3]. Cette interaction entre RANKL/RANK permet la transmission d'un signal intracellulaire activant la différenciation du pré-Oc en Oc. Par contre, pour que RANKL soit présenté de façon efficace à RANK, une adhésion cellulaire de haute affinité est requise entre le pré-

Oc et l'Ob pour générer le signal intracellulaire [1]. Cette adhésion de haute affinité est conférée au moins en partie par ICAM-1.

Depuis le premier article rapportant l'implication de ICAM-1 dans le recrutement des Oc en 1993, très peu d'études ont rapporté le rôle de cette molécule dans la physiologie osseuse. Le groupe de Kurachi et al en 1993 a été le premier à démontrer une réduction de la formation et de la fonction des Oc suite à l'addition d'anticorps dirigés contre ICAM-1 et son contre-récepteur, « leucocyte function antigen » (LFA) -1 dans un modèle de co-culture de cellules stromales et de rate provenant de la souris [4]. Quelques années plus tard, le groupe de Tanaka et al démontrait l'expression de ICAM-1 à la surface des Ob humains obtenus chez des patients OA. Ils décrivèrent aussi que l'engagement de ICAM-1 sur les Ob induisait la production de l'interleukine (IL) -6 et IL-1 $\beta$ . Ils conclurent à la transmission d'un signal intracellulaire suivant l'interaction ICAM-1/LFA-1 menant à la production par l'Ob de cytokines impliquées dans la résorption osseuse [5].

Ce même groupe démontra aussi que les Ob pouvaient être séparés en deux groupes selon leur phénotype ICAM-1. Le sous groupe Ob ICAM-1<sup>+</sup> était caractérisé par une forte adhésion aux pré-Oc ainsi qu'une production supérieure de facteur de différenciation des Oc (ODF) comparativement aux Ob ICAM-1<sup>-</sup>. De plus, les Ob ICAM-1<sup>+</sup> pouvait soutenir la formation des Oc, une propriété qui n'était pas partagée par le sous groupe ICAM-1<sup>-</sup>. Ils réussirent à mettre en évidence cette propriété en ajoutant des anticorps dirigés contre ICAM-1 en co-culture Ob/pré-Oc avec comme résultante une

inhibition de la formation des Oc. Cette découverte leur permis de conclure à l'importance d'une affinité de haute adhésion entre l'Ob et le pré-Oc de façon à maximiser l'effet de l'axe RANKL/RANK durant la maturation des Oc [6].

Finalement, le groupe de Kavanaugh et al, conscient de l'importance potentielle de l'axe ICAM-1/LFA-1 dans les pathologies inflammatoires et osseuses, ciblerent cet axe chez l'humain atteint d'arthrite rhumatoïde à l'aide d'anticorps spécifiques murins. Des résultats positifs sur les symptômes et l'activité osseuse de la maladie furent notés. Par contre, l'administration d'une seconde dose du médicament fut associée à des réactions allergiques qui justifèrent la discontinuation de l'utilisation de cet anticorps murin chez l'humain [219-221].

Toutes ces études ont démontré l'importance de l'axe ICAM-1/LFA-1 dans la formation des Oc ainsi que le potentiel du ciblage thérapeutique potentiel de ICAM-1 et/ou de LFA-1. À ce jour, aucune autre fonction que la stabilisation de l'Ob et du pré-Oc facilitant ainsi la présentation de RANK/RANKL n'a été avancée pour ICAM-1 dans le processus d'ostéoclastogénèse. Bien que plusieurs études aient rapporté des anomalies d'expression de ICAM-1 dans plusieurs types de pathologies squelettiques et extra-squelettiques, ces études demeurent malheureusement toutes de nature descriptive. Il en est de même pour la forme soluble de ICAM (sICAM), dont la présence locale et/ou systémique fut démontrée comme étant anormale dans une multitude de maladies, bien qu'aucun rôle pathophysiologique ne puisse être mis en évidence pour cette molécule.



Devant le manque de données dans la littérature face aux propriétés possibles de cette molécule dans le métabolisme osseux, nous avons tenté, dans cet ouvrage, de clarifier le rôle joué par ICAM-1 et sICAM dans la formation et l'activité des Oc. Plus particulièrement, nous voulions démontrer que ICAM-1 n'agissait pas simplement comme ancrage cellulaire permettant l'interaction de RANKL avec RANK, mais qu'il pouvait bien favoriser activement la formation des Oc soit par le biais du contrôle de la production de facteurs pro-ostéoclastogéniques, soit par un mécanisme jusqu'ici non encore décrit. De plus, le rôle de sICAM dans l'os restant incompris, nous voulions aussi étudier si cette molécule exerçait une action particulière dans le processus de différenciation et/ou de fonction des Oc.

Tout d'abord, nous avons posé la question suivante : « Si ICAM-1 est impliqué dans le processus de formation/activation des Oc, son expression membranaire devrait être plus importante chez les patients atteints de pathologies avec remodelage osseux accru ». Pour ce faire, nous avons étudié l'expression de ICAM-1 à la surface des Ob provenant de différentes pathologies. Suite aux articles ayant décrit que seuls les Ob ICAM-1<sup>+</sup> pouvaient favoriser la différenciation des Oc, nous avons posé l'hypothèse que l'expression de ICAM-1 devrait être plus importante à la surface des Ob provenant de pathologies Oc-dépendantes comparés aux Ob provenant de l'os de patients sains. Nous avons donc étudié l'expression de ICAM-1 à la surface des Ob normaux, ostéoarthrosiques (OA) et ostéoporotiques (OP) obtenus chez l'humain lors de chirurgie ou chez des donneurs d'organes sains. Démontrer un phénotype ICAM-1<sup>+</sup> à la surface des Ob qui pouvait être relié aux pathologies Oc-dépendantes pouvait non seulement

suggérer l'importance de ICAM-1 dans un contexte de différenciation des Oc, mais aussi en faire une cible thérapeutique potentielle dans le traitement de ces maladies.

Dans un second temps, puisqu'il est décrit que la présence de sICAM dans le milieu extracellulaire est proportionnelle à l'expression membranaire de ICAM-1 et grâce à nos résultats préliminaires *in vitro*, nous nous sommes demandés si une expression accrue de ICAM-1 dans l'os pouvait se traduire *in vivo* par une augmentation de la concentration sérique de sICAM. Et comme ICAM-1 était surexprimé dans l'os de patients OP, nous voulions étudier la capacité de sICAM de devenir un marqueur du turnover osseux dans cette maladie.

La seconde portion de l'expérience visait donc à déterminer si la présence de sICAM dans le sang pouvait être reliée à l'activité des Oc chez l'humain. Notre hypothèse de recherche était que la concentration sérique de sICAM provenait au moins en partie de l'os et qu'elle pouvait être affectée par l'activité des Oc. Utiliser une pathologie osseuse systémique comme l'OP avait plusieurs avantages, le plus important étant de pouvoir suivre l'activité de la maladie à l'aide de la densité osseuse. Nous pouvions aussi obtenir un contrôle sérique en dosant l'enzyme tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) 5b, qui reflète l'activité des Oc, mais aussi suivre l'effet du traitement par les biphosphonates, un inhibiteur des Oc utilisé pour le traitement de l'OP. Pour ce faire, nous avons dosé les concentrations sériques de sICAM et de TRAP 5b chez 111 femmes ménopausées suivies en clinique d'OP. Les sujets étaient ensuite séparés en 4 groupes selon la valeur de la densité osseuse, soit normaux, ostéopéniques et OP traité

ou non par biphosphonates (Fosamax). Les valeurs sériques pouvaient alors être comparées selon les groupes et être reliées à l'activité des Oc par le biais de la densité osseuse.

Ces deux premières études voulaient établir l'importance de sICAM et de ICAM-1 dans les pathologies osseuses pour s'assurer de la pertinence de pousser plus loin l'étude de cette molécule d'adhésion dans un contexte physiologique d'ostéoclastogénèse. Les résultats positifs de ces deux premières expériences, comme j'en ferai état plus loin, justifiaient l'étude de l'implication de sICAM et de ICAM-1 dans le recrutement et la fonction des Oc au niveau cellulaire.

Jusqu'ici, les études portant sur le rôle de ICAM-1 dans l'activité des Oc avaient été conduites en co-culture. Dans le but d'isoler l'effet de sICAM et de ICAM-1 dans le processus d'ostéoclastogénèse sans avoir à tenir compte des variables inhérentes à un système pluricellulaire, nous avons utilisé séparément Ob et monocytes. L'idée était de créer un système monocellulaire dans lequel sICAM mimerait l'effet de ICAM-1 sur les pre-Oc, tandis que l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre ICAM-1 mimerait l'effet d'un engagement de ICAM-1 membranaire à la surface des Ob. De cette façon, nous pouvions plus facilement déceler les changements spécifiques potentiels dans chaque type cellulaire après co-incubation avec soit sICAM ou ICAM-1.

Nous avons donc prélevé des monocytes humains dans le sang de donneurs sains et les avons placés en culture. Nous avons fait de même avec les Ob humains. Après co-

incubation avec différents médiateurs, la formation d'ARN messenger codant pour les ODF tels que RANK, RANKL, osteoprotégerin (OPG), IL-1 et IL-6 fut vérifiée dans les 2 types cellulaires. Puisqu'il a déjà été décrit qu'en co-culture que les Ob ICAM-1<sup>+</sup> produisait plus de ODF, cette partie voulait déterminer si l'engagement de ICAM-1 sur l'Ob ou de LFA-1 sur le pré-Oc pouvait induire directement l'expression d'ODF.

Nous voulions ensuite déterminer si sICAM exerçait un effet sur la différenciation et la fonction des Oc. En utilisant toujours un système unicellulaire, nous avons stimulé les monocytes humains avec sICAM en espérant mimer la liaison ICAM-1/LFA-1 normalement retrouvé en co-culture. Nous avons alors déterminé l'effet de sICAM sur la différenciation des Oc en dosant TRAP 5b dans le surnageant, un enzyme qui reflète spécifiquement la présence d'Oc dans le milieu de culture. L'activité des Oc fut quant à elle vérifiée en évaluant la surface de résorption osseuse grâce à des cultures sur feuilles d'os. Pour s'assurer que sICAM produisait un effet similaire en co-culture, un système de culture plus représentatif de ce qu'on retrouve *in vivo*, nous avons répété les mêmes expériences en utilisant en co-culture à la fois Ob et monocytes. Encore une fois, les résultats obtenus dans cette partie de l'expérience nous ont forcés à pousser plus loin le projet pour tenter de mieux cerner l'effet de cette molécule dans les processus de formation et de fonction des Oc.

Puisque plusieurs rapports dans la littérature suggèrent que sICAM et ICAM-1 jouent un rôle dans l'initiation ou l'inhibition de la cascade apoptotique, nous avons étudié l'effet de la présence de sICAM et de ICAM-1 sur l'apoptose dans un contexte de

résorption osseuse. Nous avons donc ici vérifié si l'effet de ICAM-1 et de sICAM observé dans l'activité des Oc pouvait être expliqué par une protection ou une propension contre l'apoptose. L'effet individuel de sICAM sur la cascade apoptotique chez les pré-Oc ainsi que l'effet de la liaison d'anticorps dirigés contre ICAM-1 à la surface des Ob sur cette même cascade a été étudié. L'expression de la caspase-3 fut évaluée dans ces deux types cellulaires à la suite de la co-incubation de médiateurs pro-apoptotiques et de sICAM ou de anti-ICAM-1. Cette section est couverte plus brièvement et seuls des résultats préliminaires y seront présentés puisque cette nouvelle avenue de recherche constitue la base de mon programme de recherche proposé en tant que chercheur autonome.

Les résultats obtenus de ces diverses expériences nous permettront donc de clarifier le rôle de ICAM-1 dans l'activité des Oc et d'établir le rôle de sICAM dans le métabolisme osseux. Une meilleure compréhension de la physiologie de l'axe ICAM-1/sICAM/LFA-1 dans l'os devrait ouvrir la porte au ciblage thérapeutique potentiel de cet axe dans les pathologies osseuses Oc-dépendantes telles que l'OP et les cancers osseux primaires et/ou secondaires.

Cette thèse est rédigée à l'aide d'articles qui sont déjà publiés ou sont soumis pour publication dans des journaux scientifiques. Pour mieux comprendre l'étendue des connaissances actuelles sur l'ostéoclastogénèse, le chapitre qui suit fera un survol de la littérature en insistant particulièrement sur la régulation du métabolisme osseux, la différenciation des OC, ICAM-1, sICAM et l'apoptose. Une partie de ce chapitre a été

écrit avec l'aide d'un premier manuscrit déjà publié dans le journal « Expert Opinion in Biological Therapy, 5 (3) : 313-320; 2005» et dont je suis le premier auteur. Ce manuscrit a été divisé pour les besoins de la rédaction mais est joint dans sa version originale dans la section résultats (article 4) puisqu'elle met en contexte les données obtenues grâce aux trois premiers articles. Ce même article a aussi servi à la rédaction de la section cinq (discussion, conclusions et perspectives futures). Le chapitre trois quant à lui présentera la méthodologie utilisée pour réaliser les diverses expériences. Les résultats seront présentés sous forme de quatre articles scientifiques au chapitre quatre, en plus de résultats préliminaires sur l'apoptose, résultats qui ouvriront la porte sur la discussion et les perspectives futures de cet axe de recherche. Le premier article, intitulé "Expression of ICAM-1 by osteoblasts in healthy individuals and in patients suffering from osteoarthritis and osteoporosis" est déjà publié dans le journal « Bone, 35: 463-470; 2004 ». Le second, intitulé "sICAM serum levels are increased in osteoporotic patients" sera soumis sous peu au journal "Climacteric". Le dernier article intitulé "sICAM increases osteoclast activity in vitro" sera soumis au "Journal of Bone and Mineral Research". Au chapitre cinq, on retrouvera une discussion générale ainsi que les conclusions, tandis que les perspectives futures dans ce champ de recherche seront présentées au chapitre 6.

## CHAPITRE 2 ÉTAT DES CONNAISSANCES

Ce chapitre se veut un résumé des connaissances actuelles portant sur le métabolisme osseux, ICAM-1, sICAM et l'ostéoclastogénèse. Dans un premier temps, les processus généraux de formation de l'os et de régulation du métabolisme osseux seront couverts, en portant une attention particulière à la formation et la fonction des Oc. Ensuite, les propriétés inhérentes à ICAM-1 et sICAM dans l'organisme seront rapportées, ainsi que leurs rôles respectifs dans la physiopathologie osseuse. Finalement, je résumerai l'association décrite entre ICAM-1, sICAM et les mécanismes régulateurs de l'apoptose.

### 2.1 Ostéogénèse

Au cours du développement l'os peut être formé de 2 façons : 1) par ossification intramembraneuse pour les os plats (crâne, face et clavicule), ainsi que 2) par ossification enchondrale (os longs et squelette appendiculaire). Ces 2 types d'os, quoique macroscopiquement similaires présentent des différences de régulation comme en fait foi l'absence d'OP de type II (sénile) dans les os plats. De plus, alors que l'ossification intramembraneuse se produit suite à la condensation de cellules mésenchymateuses (MSC) sans intermédiaires cartilagineux, l'ossification enchondrale quant à elle, inclut une phase cartilagineuse dont la formation est étroitement régulée. Dans les pages qui suivent, je décrirai dans un premier temps l'arrangement macroscopique de l'os en formation, pour ensuite insister sur les facteurs de croissance osseuse et sur leurs effets au niveau cellulaire.

### 2.1.1 L'os macroscopique en formation

Dans l'ossification enchondrale, les molécules d'adhésion cellulaire permettent aux MSC de former un amas de cellules indifférenciées qui sécrètent la matrice cartilagineuse et/ou forment des chondrocytes [7]. La matrice se minéralise progressivement et avec l'apparition de bourgeons vasculaires, les cellules ostéoprogénitrices apparaissent. Le développement des Oc permet ensuite la digestion de la matrice et son remplacement par l'os, sous la gouverne des Ob.

Dans l'embryon, l'amas de MSC est généralement présent à 6 semaines et l'angiogénèse permet ensuite la formation du centre d'ossification primaire à 8 semaines. Le modèle cartilagineux croît en longueur et en diamètre, et la cavité médullaire se forme par résorption de la portion centrale. Cette cavité devient vite peuplée de cellules myéloïdes (précurseurs) amenées par les capillaires médullaires. Parallèlement, les centres d'ossification secondaires se forment aux extrémités (plaque de croissance), responsables de la croissance des os immatures. La plaque de croissance est composée de 3 zones (réserve, prolifération et hypertrophique) chacune reflétant un degré de différenciation différent des chondrocytes ainsi qu'une composition différente de la matrice. Dans la zone de réserve, on trouve les chondrocytes germinaux qui, entre autre chose, sécrètent un facteur crucial non identifié pour l'orientation cellulaire et la croissance unidirectionnelle [8]. Dans la zone de prolifération, les chondrocytes sécrètent une abondance de collagène (type II, IX et XI) et des protéoglycanes. Les chondrocytes s'alignent en colonnes et entrent alors dans un cycle de division actif. Sous l'effet d'un stimulus indéterminé ou d'un nombre préprogrammé de division, les chondrocytes se



différencient et s'hypertrophient pour former la zone hypertrophique, où les chondrocytes produisent le collagène de type X [9, 10]. Le chondrocyte hypertrophique est la cellule régulatrice de la minéralisation et de l'angiogénèse. Elle possède des vésicules riches en calcium et métalloprotéases (MMP), ce qui permet la minéralisation de la matrice [11]. Elle attire aussi le chondroclaste, cellule responsable de la digestion de la matrice, et assure la différenciation des Ob produisant la matrice osseuse, qui coïncide avec la mort apoptotique du chondrocyte hypertrophique [12]. La structure osseuse s'allonge donc longitudinalement dans ce cycle répétitif de prolifération et production de matrice, hypertrophie et mort des chondrocytes.

La matrice qui baigne les chondrocytes est quant à elle composée essentiellement de collagène et de protéoglycanes. La portion de collagène permet de séquestrer les facteurs nécessaires à la croissance et la différenciation cellulaire, mais aussi à l'arrangement des cellules de façon ordonnée grâce à la présence à la surface des chondrocytes d'intégrines qui assurent un lien avec la matrice [13]. Les protéoglycanes permettent quant à eux le "cross-link" des fibres de collagène entre-elles tandis que les MMP sont responsables du remodelage de la matrice et jouent un rôle dans l'angiogénèse [14, 15].

### **2.1.2 Mécanismes de contrôle central de la formation osseuse**

Une partie des mécanismes de régulation de la formation osseuse est sous contrôle hormonal. En effet, on assiste à 3 phases de croissances distinctes de la naissance à la maturité. La première phase correspond à la croissance rapide de 0 à 3 ans, qui est suivi

d'un ralentissement graduel de cette croissance menant à la dernière phase, soit le pic de croissance pubertaire et la fermeture subséquente des physes [16]. Les hormones principales impliquées dans la croissance sont l'hormone de croissance (GH), le « insulin growth factor » (IGF) -1, les glucocorticoïdes (GC), les hormones thyroïdiennes ( $T_3$  et  $T_4$ ) et les hormones sexuelles (androgènes et oestrogènes).

Chez l'embryon et jusqu'à la naissance, IGF-1 et IGF-2 semblent être les médiateurs hormonaux principaux, bien que leur mode d'action soit toujours obscur. En effet, l'absence de ces 2 facteurs chez l'embryon conduit à un rejeton de petite taille, ce qui n'est pas le cas pour la GH [17]. Par contre, après la naissance, l'absence de GH mène à un enfant de petite taille alors que l'absence de IGF-1 a moins d'effet sur la taille résiduelle. La GH agit sur la croissance soit directement ou par l'action de IGF-1. GH affecte les chondrocytes de la zone de réserve et est responsable de la production locale de IGF-1 qui stimule à son tour la prolifération et l'expansion clonale des chondrocytes de façon auto/paracrine [18]. Bien que la localisation et l'action exacte de IGF-1 soient controversées, les études humaines sur le nanisme tendent à démontrer un rôle important pour ce facteur.

Un autre axe hormonal impliqué dans la croissance est l'axe thyroïdien par l'entremise de  $T_3$  et de  $T_4$ . En effet, alors que l'hypothyroïdie congénitale mène à un retard important de la croissance, l'hyperthyroïdie cause initialement une croissance accélérée mais aussi une fermeture précoce des physes, ce qui a comme effet résiduel d'engendrer une personne de petite taille [19, 20]. Les cibles des hormones thyroïdiennes

sont multiples : augmentation de la GH, effet direct sur les cellules de la zone de réserve menant à la prolifération cellulaire (démontré par la présence du récepteur de  $T_3$  à la surface cellulaire), augmentation de la production de collagène II et X par la  $T_4$  et modulation de la formation vasculaire [21-24]. Que son effet soit secondaire à la modulation de GH/IGF-1 ou directement sur la cellule, il n'en demeure pas moins que les hormones thyroïdiennes jouent un rôle important dans la croissance.

La présence des GC affecte aussi affectent la physe en favorisant l'arrêt de la croissance. Il a été démontré qu'un traitement à haute dose de dexaméthasone, un GC, inhibe la croissance [25]. Puisque la présence du récepteur de GC a été démontrée sur les chondrocytes de la zone proliférative et hypertrophique [26], il en a été déduit que les GC ont un effet négatif sur la croissance en favorisant l'apoptose dans la zone hypertrophique tout en modifiant l'activité des axes GH/IGF (au niveau hypophysaire et dans la plaque de croissance pré et post-transcriptionnel) et thyroïdien [27, 28].

Les hormones sexuelles telles que l'androgène et l'œstrogène influencent aussi la croissance, particulièrement dans la période pubertaire. En effet, principalement chez la femme mais aussi chez l'homme, les niveaux faibles d'œstrogène pré-pubertaire permettent un pic de croissance suivi de la fermeture de la plaque de croissance coïncidant avec l'augmentation du taux d'œstrogène [29]. L'effet inhibiteur de cette hormone sexuelle sur la plaque de croissance se veut principalement direct, comme en témoigne la présence de récepteurs œstrogène à la surface des chondrocytes [30]. Les androgènes, eux, ont un effet positif sur la croissance, bien que leur effet soit moindre

comparé aux oestrogènes. D'ailleurs tout comme les oestrogènes, des récepteurs androgènes sont présents à la surface des chondrocytes de la zone hypertrophiques [31].

Malgré l'identification de nombreux facteurs hormonaux interagissant directement et indirectement sur la croissance, la complexité du mécanisme d'ossification enchondral fait que les actions individuelles de ces médiateurs sur les chondrocytes ne sont pas complètement élucidées. De plus, une multitude de facteurs locaux sont déjà identifiés ayant tous leur effet propre sur les différentes zones de la plaque de croissance rendant difficile l'évaluation de l'effet isolé de chaque médiateur sur la croissance.

### **2.1.3 Mécanismes de contrôle locaux de la formation osseuse**

Plusieurs facteurs agissent localement sur les chondrocytes de la plaque de croissance dans le processus d'ossification enchondrale. Ces facteurs sont le « Indian hedgehog » (Ihh), le « parathyroid hormone related protein » (PTHrP), la famille des « fibroblast growth factor » (FGF) et des « bone morphogenic protein » (BMP). Ihh est un médiateur important dans le processus puisqu'il contrôle les étapes de prolifération, de différenciation en chondrocytes préhypertrophiques et permet la maturation des Ob dans la zone d'ossification adjacente à la plaque. L'action de Ihh sur les chondrocytes se fait par la liaison au récepteur Ptc-1, ce qui se traduit en l'activation de la protéine membranaire Smo menant à l'expression des gènes de prolifération cellulaire. Ce mécanisme est d'ailleurs confirmé par une anomalie d'ossification des os longs chez les souris  $Ihh^{-/-}$  [32]. Une partie de l'action de Ihh est aussi médiée par PTHrP, qui permet de garder les chondrocytes dans la phase proliférative, retardant ainsi leur passage en phase

hypertrophique [33]. Cette régulation commune de la plaque de croissance permet aussi l'arrangement colonnaire des chondrocytes et la démarcation entre les 3 zones dans la plaque [34]. Ihh joue également un rôle primordial dans l'ossification juxta épiphysaire en régulant la formation des Ob périchondraux. De façon intéressante, ce contrôle d'ossification par Ihh n'a lieu qu'autour des chondrocytes hypertrophiés. En effet, l'implantation de chondrocytes hypertrophiés dans divers endroits sur l'os animal mène à une ossification uniquement dans les zones où les chondrocytes ont été réimplantés [34].

Un autre médiateur local important est de la famille des FGF, qui ont un effet d'inhibition de la prolifération cellulaire dans la plaque de croissance favorisant la différenciation terminale des chondrocytes hypertrophiques, effet possiblement médié en partie par la suppression de Ihh [35]. Les médiateurs intermédiaires dans cette cascade sont toutefois toujours inconnus mais FGF-18 et FGFR3 semblent impliqués. Finalement, la famille des BMP participe aussi à la régulation de la plaque de croissance et du développement des membres à de multiples niveaux. Leur implication est démontrée dans la condensation des MSC par l'entremise de BMPR1B et de BMP-5, alors que la présence de BMP-2, -3, -4, -5 et -7 est retrouvée dans les cellules périchondriales [36, 37]. BMP2 est aussi produite par les chondrocytes hypertrophiques et retarde leur différenciation terminale. La signalisation induite par la famille BMP accroît les niveaux de Ihh et donc aussi la prolifération cellulaire de façon indirecte, s'opposant du même coup à l'axe FGF [35].

#### 2.1.4 Mécanismes de contrôle intracellulaire de la formation osseuse

Au niveau intracellulaire, 2 facteurs de transcription sont présentement décrits, soit SOX9 et Runx2 (aussi appelé *cbfa1*), avec des rôles à plusieurs étapes dans la formation des os longs. SOX9 est présent dans la phase de condensation et dans la zone de prolifération mais pas dans la zone hypertrophique. Sa présence est indispensable à la différenciation et à la survie cellulaire, mais aussi pour la synthèse des protéines matricielles, comme en fait foi son action sur les gènes *col2a1* et *colla2* et la production d'agrécan [38]. Runx2 quant à lui favorise la maturation cellulaire. Son expression est accrue dans la phase de condensation, dans les cellules de la zone hypertrophique, péri-chondriale et dans les Ob adjacents, alors qu'elle est diminuée dans la zone proliférative [39]. La présence de Runx2 est aussi essentielle à la minéralisation de la matrice, effet possiblement traduit par son action sur MMP13.

Bien que le rôle de ces facteurs de transcription soit primordial dans l'ossification enchondrale, on connaît peu de chose sur les facteurs en amont ainsi que sur les événements extracellulaires menant à leur activation. Plusieurs acteurs sont identifiés, autant sur le plan hormonal que dans la signalisation inter et intracellulaire. Tous ces facteurs interagissent entre eux de façon encore mal comprise et entraînent la production de facteurs intermédiaires encore non identifiés.

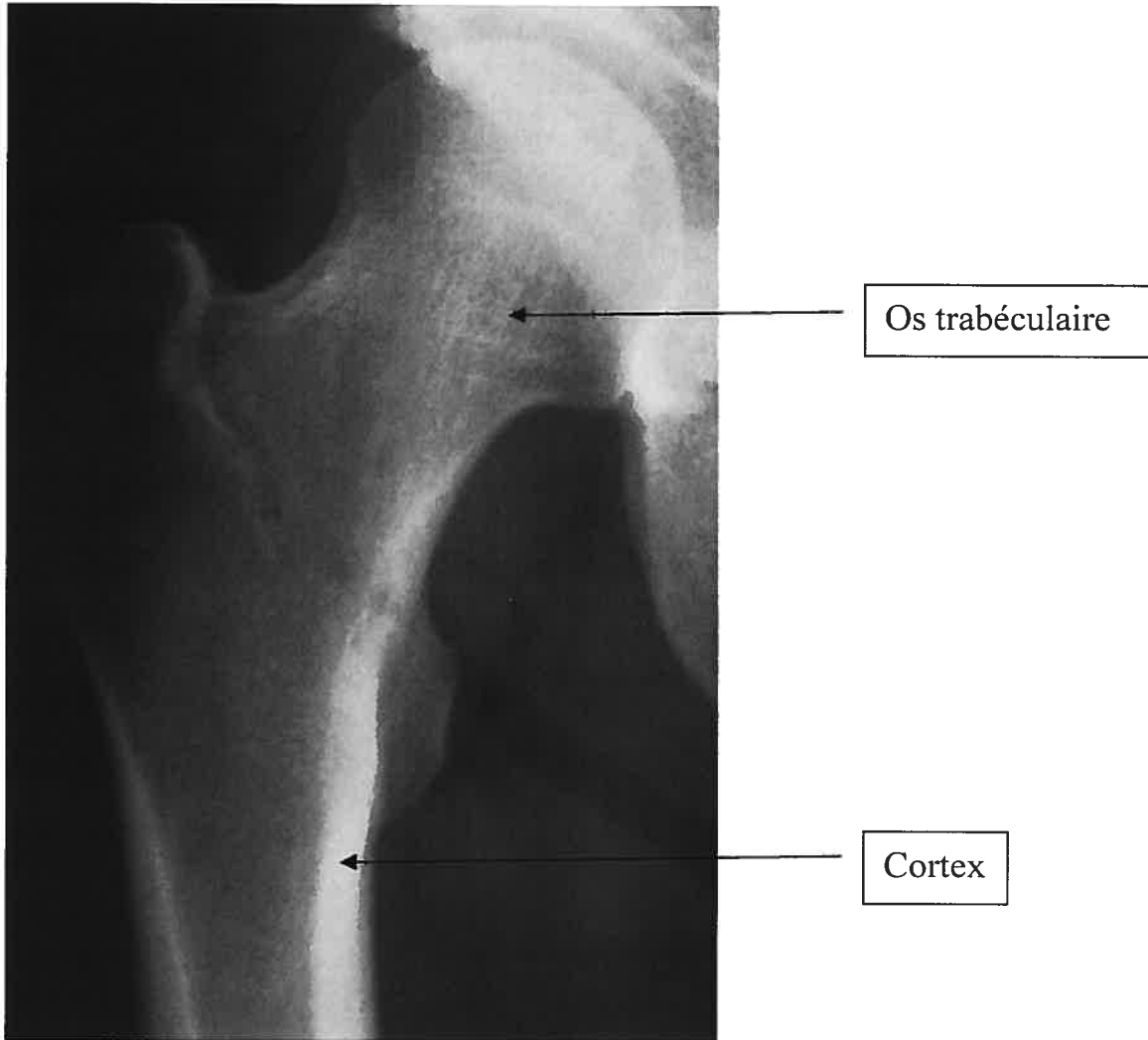
#### 2.2 Structure et fonctions de l'os adulte

De la naissance jusqu'à la mort, l'os demeure un tissu physiologiquement actif en perpétuel remaniement, ayant de multiples rôles dans l'organisme. Une des principales

fonctions de l'os consiste en la protection des organes, dont le cerveau, la moelle épinière ainsi que les organes de la cavité thoracique. Le squelette permet aussi le maintien de la posture et la mobilité puisqu'il sert de levier aux muscles et de support aux tissus mous. En plus, l'os constitue un réservoir de minéraux permettant le contrôle de la concentration sérique en minéraux, soit principalement le calcium et le phosphate. Il est aussi un centre hématopoïétique, quoique moins actif à l'âge adulte.

Le squelette humain reçoit 10% du débit cardiaque et l'association de matières solides et organiques permet à l'os d'accomplir son rôle particulier de structure et mobilité dans l'organisme. La portion externe de l'os, le cortex, est solide et dense et la portion interne, l'os trabéculaire ou spongieux, est constitué de minces travées osseuses (Figure 1).

L'os compact en périphérie présente une structure annulaire concentrique. Les vaisseaux sanguins du périoste traversent l'os par les canaux de Volkmann. Ces canaux sont connectés aux canaux de Havers, parallèles à l'axe longitudinal de l'os. Les canaux sont entourés de lamelles concentriques dures et minéralisées. Entre les lamelles se trouvent les ostéoplastes, logettes renfermant les ostéocytes. Ces derniers sont responsables de l'échange des nutriments au niveau de l'os. Le canal de Havers, la lamelle, l'ostéoplaste et l'ostéocyte forme l'ostéon, unité fonctionnelle de base de l'os. L'os spongieux se trouve au centre de l'os et son réseau de trabécules ressemble à une éponge. C'est entre les travées osseuses que l'on retrouve la moelle.



**Figure 1. Radiographie d'un fémur dans le plan coronal.**  
Les extrémités sont composées d'os trabéculaire formé par de minces travées osseuse. L'os trabéculaire se retrouve surtout au niveau de l'épiphyse et de la métaphyse.  
L'os cortical est solide, dense et fortement minéralisé. Il se retrouve surtout dans la portion de la diaphyse.



L'os est constitué principalement de trois types cellulaires, l'Ob favorisant la formation osseuse, l'ostéocyte qui est en fait un Ob cloisonné dans la matrice qui ne produit plus d'os et l'Oc, responsable de la résorption osseuse dans l'organisme. Les cellules sont imbriquées dans une matrice organique composée à 95% de collagène de type 1, le reste de la matrice étant composée par des protéines venant du sang. C'est l'Ob qui est responsable du dépôt de la matrice organique. Sur cette matrice se dépose la portion minérale solide de l'os composée principalement de calcium et de phosphore, mais contenant également du magnésium et du sodium. Les composés organiques comptent pour 30% du poids sec de l'os alors que la portion inorganique représente 70% de ce poids.

### **2.3 Déterminant du métabolisme osseux**

Au niveau cellulaire, l'os répond aux stimuli hormonaux, mécaniques, autocrines/paracrines et neurogènes influençant alors les échanges de minéraux avec le sang, l'hématopoïèse ainsi que le maintien de la masse osseuse par la régulation locale et centrale de la formation et de la résorption osseuse. Toute anomalie dans le contrôle du remodelage osseux résulte généralement en un déséquilibre entre l'activité des Oc et des Ob affectant par conséquent la masse osseuse. La section qui suit fait part des déterminants de la masse osseuse.

#### **2.3.1 La vitamine D**

La présence de la vitamine D, la vitamine soleil, est reconnue depuis longtemps pour être essentielle au maintien d'un squelette en santé. La vitamine D ainsi permet au

squelette de bénéficier d'une quantité suffisante de calcium et de phosphore pour se développer sainement. Une carence en vitamine D, que ce soit par un manque d'apport ou une anomalie métabolique, entraîne une panoplie de pathologies squelettiques du type ostéomalacie, caractérisées par des anomalies de formation et de croissance des os.

Le principal apport en vitamine D pour l'humain provient de la diète. Elle doit par contre subir plusieurs transformations pour être active. Une fois absorbée de l'intestin et circulant dans le sang, elle est transformée à la peau après exposition au soleil ou aux rayons UV, pour devenir la vitamine D<sub>3</sub> (cholécalférol). Cette dernière subit ensuite une transformation au foie et aux reins, par le biais de réaction enzymatiques, pour obtenir sa forme active, le 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>.

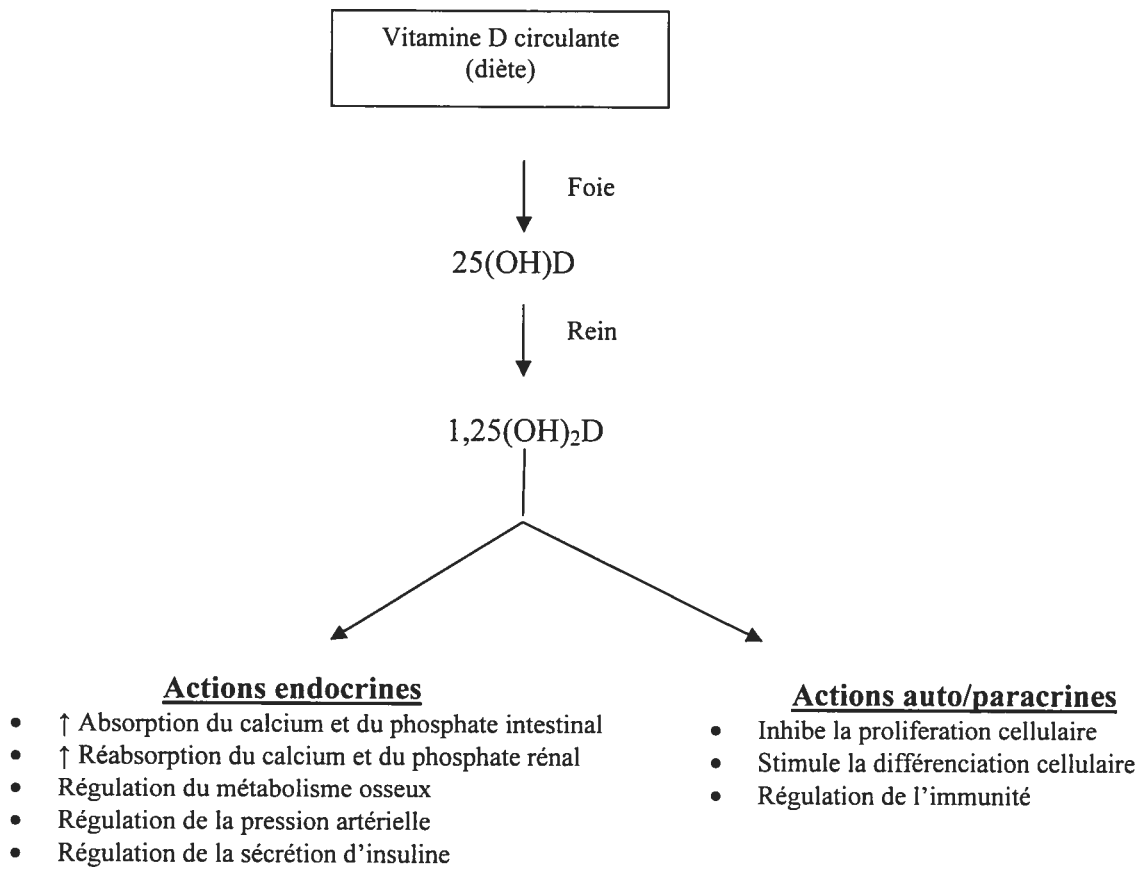
Le 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> coordonne les interactions entre l'intestin, la glande thyroïde, le rein et l'os pour réguler la balance calcique. Ce contrôle étroit est essentiel pour le maintien de la fonction cellulaire et de l'intégrité du squelette. Au niveau de l'intestin, l'interaction entre la vitamine D et son récepteur (VDR) induit à la hausse l'absorption intracellulaire de calcium et active les mécanismes de transport [40]. Cette interaction entraîne aussi des modifications dans la fluidité de la membrane menant à une absorption accrue du phosphate par des mécanismes de transports actifs et passifs [41, 42]. L'action du 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> est similaire au niveau du rein, où il accroît la réabsorption du calcium et du phosphate [43]. La concentration circulante de la Vitamine D affecte aussi négativement la sécrétion de PTH par la glande parathyroïde et est capable de moduler la

réponse de la glande face à des concentrations changeantes de calcium [44, 45]. Globalement donc, la vitamine D augmente le calcium et le phosphore sérique (Figure 2).

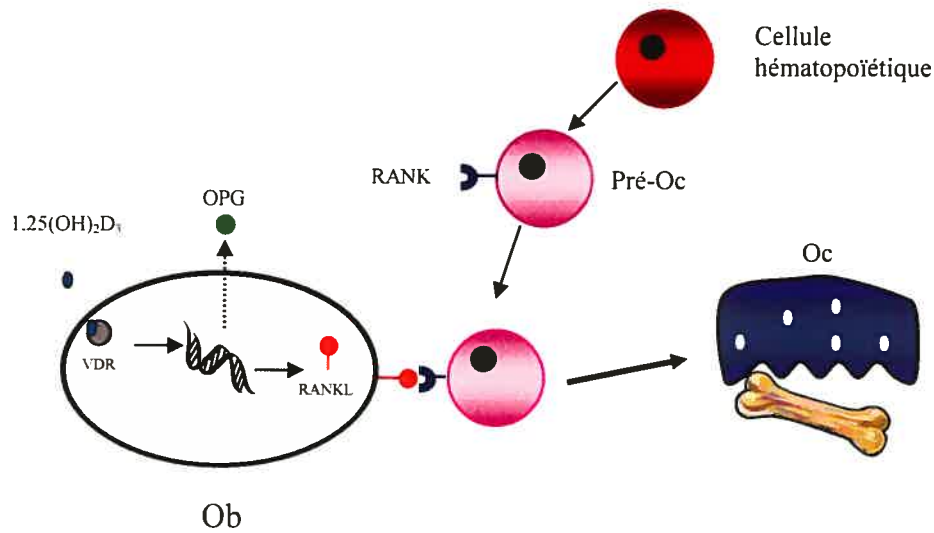
Au niveau du squelette, la vitamine D contrôle le développement de l'os et le maintien de la minéralisation osseuse. Le développement adéquat de la plaque de croissance, la formation osseuse suite à l'activité des Ob et la résorption de l'os par les Oc nécessitent tous l'action coordonnée de l'axe  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  VDR [46]. Cet axe permet entre autre un couplage adéquat de la formation et de la résorption osseuse en stimulant la production de RANKL (facteur de maturation et d'activation des Oc) par l'Ob et en inhibant celle d'OPG (un ligand « decoy » pour RANK ayant pour action l'inhibition de la maturation et de l'activité des Oc) [47, 48]. L'augmentation du ratio RANKL/OPG favorise donc la résorption osseuse (Figure 3).

### 2.3.2 La PTH

La PTH, produite au niveau des glandes parathyroïdes exerce aussi un contrôle sur la masse osseuse. Elle a comme cible le rein, les intestins ainsi que l'os et est sécrétée en réponse à une baisse du calcium extracellulaire ou à une hausse de phosphate. La présence de la PTH circulante a pour effet l'augmentation de la concentration sérique de calcium. Cette action est due à la stimulation de l'activité ostéoclastique dans l'os, à une diminution de l'excrétion rénale et à une absorption accrue de calcium dans le tube digestif. L'effet de la PTH s'exerce positivement sur les enzymes responsables de la transformation de la vitamine D.

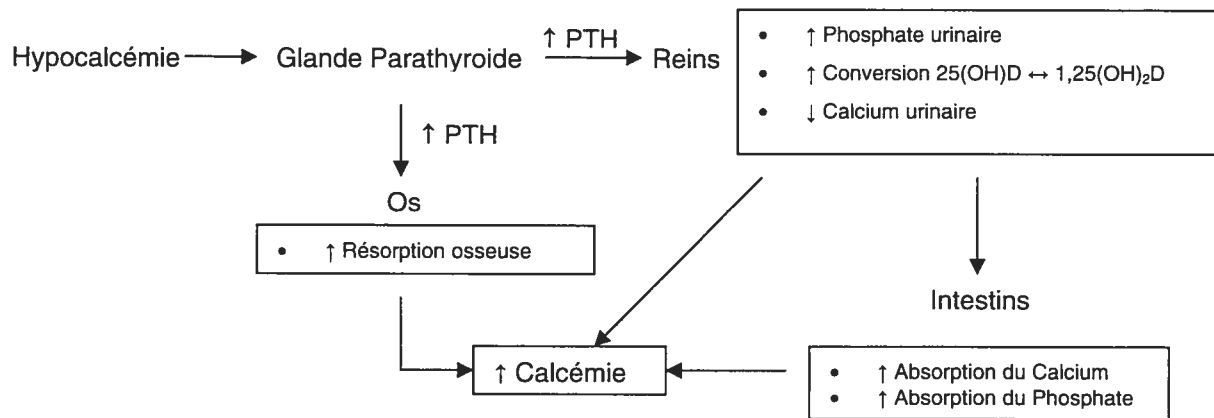


**Figure 2. Actions et métabolisme de la vitamine D**



**Figure 3. La Vitamine D et l'ostéoclastogénèse.** 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> régule l'ostéoclastogénèse par l'intermédiaire de VDR. L'exposition à la Vitamine D activée résulte en l'augmentation de l'expression de RANKL par les Ob et en la diminution de l'expression de OPG, augmentant ainsi la résorption osseuse.

Contrairement aux Ob, les Oc n'ont pas de récepteurs à la PTH sur leur surface cellulaire. L'effet de la PTH sur les Oc est donc indirect et médié par l'Ob, qui transmet son effet par l'interaction avec les Oc. La PTH stimule aussi l'expression de RANKL et diminue celle de OPG, avec un effet net de perte de masse osseuse [49]. Elle diminue aussi la réabsorption de phosphore au niveau du rein. Son action globale est donc une augmentation de la quantité de calcium sérique et une diminution du phosphore sérique (Figure 4).



**Figure 4. Actions de la PTH en réponse à une baisse de la calcémie.**

La baisse du calcium sérique entraîne dans l'organisme une sécrétion de PTH qui agit sur l'os, le rein et l'intestin pour provoquer une hausse de la calcémie ainsi qu'une baisse concomitante de la phosphatémie.

### 2.3.3 Les hormones sexuelles

Les hormones sexuelles stéroïdiennes comme l'estrogène et l'androgène sont aussi des déterminants de la masse osseuse. Ces hormones jouent un rôle clé non seulement dans le développement et le maintien du squelette [50], mais aussi dans la reproduction, assurant un apport calcique suffisant durant la grossesse et l'allaitement.

Chez la femme, la baisse d'estrogène associée à la ménopause est majoritairement responsable de la perte de la masse osseuse observée dans l'OP. Cette diminution dans

les niveaux hormonaux amène un accroissement de la formation et de la destruction osseuse principalement dans l'os trabéculaire mais aussi dans l'os cortical. Par contre, l'effet sur la lyse osseuse étant plus grand, la baisse d'estrogène résulte en une perte nette de la masse osseuse [50].

Chez l'homme par contre, l'arrivée de l'andropause mène à une baisse plus lente de la testostérone. Jusqu'à récemment, l'effet de la diminution de cette hormone sur l'os était mal compris. Des études récentes sur un groupe d'homme castré pour délit sexuel ainsi que chez des hommes traités pour cancer de la prostate avec un inhibiteur des hormones sexuelles démontrent qu'une diminution de la masse osseuse se produit aussi chez l'homme suite à la perte des hormones sexuelles [51, 52]. Par contre, il a aussi été démontré que l'estrogène était essentielle et plus importante que la testostérone pour le fonctionnement adéquat du couplage osseux chez l'homme [53].

Au niveau cellulaire, l'estrogène exerce un effet suppressif sur les progéniteurs des Ob et des Oc [54]. La baisse d'estrogène mène à une augmentation du nombre d'Ob et d'Oc, expliquant ainsi l'augmentation de l'activité métabolique de l'os à la ménopause. En plus d'affecter le recrutement cellulaire, cette hormone exerce un effet sur la maturation, l'activité et l'apoptose des Oc. Les estrogènes agissent en inhibant l'expression de RANKL à la surface des Ob et en stimulant la production d'OPG [55, 56], menant ainsi à une diminution de l'activité des Oc. La testostérone est aussi capable d'inhiber RANKL mais diminue aussi les niveaux d'OPG [57, 58]. Cette différence dans l'effet entre ces deux hormones sur la production d'OPG pourrait ainsi expliquer le rôle

déterminant de l'estrogène par rapport à la testostérone dans la régulation de l'activité osseuse. En plus de son effet sur l'axe RANK/RANKL/OPG, l'estrogène peut supprimer l'activité des Oc de façon paracrine en modifiant les niveaux de cytokines pro-ostéoclastogènes produits par les Ob et leurs précurseurs (IL-1 et 6, tumor necrosis factor (TNF) - $\alpha$ , macrophage colony stimulating factor (M-CSF) et les prostaglandines (PG)). De plus, la baisse des hormones sexuelles accroît la destruction de l'os par la perte du rôle protecteur contre l'apoptose des Ob [59]. Il en résulte donc un effet net de baisse de la masse osseuse.

#### **2.3.4 Autres facteurs impliqués dans l'homéostasie osseuse**

La mécanotransduction se définit par la conversion au niveau cellulaire de forces physiques exercées sur le squelette en signaux biochimiques générant une réponse cellulaire [60]. Cette propriété du squelette est essentielle pour assurer son rôle de support et de locomotion de l'organisme. Les variations de forces auxquelles le squelette est soumis mènent à une modification conséquente de la densité osseuse. Ces forces mécaniques accroissent la prolifération des Ob et chondrocytes ainsi que le dépôt de matrice [61, 62]. Il en résultera alors une augmentation de la densité osseuse à la fois corticale et trabéculaire dans les zones où les charges biomécaniques sont les plus importantes.

La calcitonine est produite au niveau des cellules parafolliculaires thyroïdiennes lorsque la concentration sérique de calcium est à la hausse. Elle a les mêmes cibles que la



PTH mais à un effet contraire à cette dernière en favorisant la formation osseuse, diminuant l'absorption au niveau du tube digestif et l'excrétion de calcium aux reins.

L'hypothalamus exerce un contrôle sur la masse osseuse en réponse à la leptine. Cette hormone, produite par les adipocytes a pour effet l'inhibition de la formation osseuse [63]. Une fois sécrétée, la leptine est transportée au système nerveux central par le sang où elle se lie aux récepteurs situés au niveau de l'hypothalamus [64]. Il résulte de cette liaison une activation du système nerveux sympathique, dont les fibres adrénergiques affectent l'activité des Ob [65]. Par contre, la leptine est aussi capable d'une action directe sur l'Ob, en faisant ainsi un médiateur ayant à la fois un effet central et local sur l'os. En effet, la leptine et son récepteur sont exprimés chez l'Ob. L'engagement de la leptine avec son récepteur induit chez l'Ob l'expression de TGF- $\beta$ , de IGF-1, du collagène 1 $\alpha$ , de la phosphatase alcaline et de l'ostéocalcine, tous des médiateurs impliqués dans l'activité anabolique des Ob. De plus, la leptine accroît la production de OPG et de IL-6, 2 facteurs diminuant l'activité de résorption des Oc. Finalement, la leptine agit aussi en diminuant l'apoptose chez les Ob. L'effet net local de la leptine est donc de stimuler la synthèse de collagène, la prolifération des Ob et la minéralisation de la matrice, tout en minimisant l'apoptose des Ob et l'activité des Oc [290].

Les corticostéroïdes par leur effet d'inhibition général sur la synthèse de protéines peuvent aussi avoir un effet négatif sur l'équilibre osseux de même que les hormones thyroïdiennes qui, bien qu'elles aient un effet stimulant à la fois la formation et la

résorption osseuse, entraînent une résorption osseuse nette de par l'effet plus grand sur les ostéoclastes que sur les Ob.

## **2.4 L'os au niveau cellulaire**

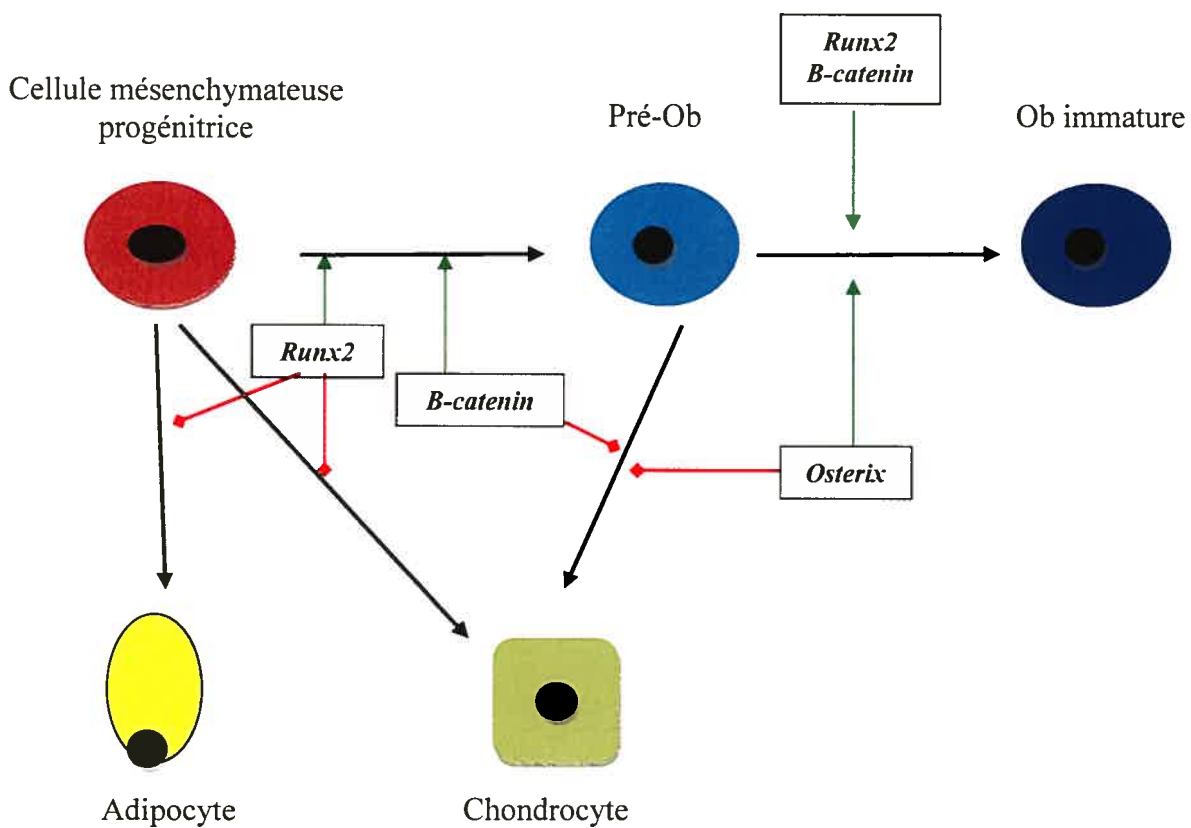
Le remodelage osseux est constitué de cycles consécutifs de résorption et de formation de l'os. Chaque année, environ 10% de la masse osseuse est renouvelée par ce processus. La phase d'activation débute par le recrutement des pré-Oc qui, une fois différenciés en Oc fonctionnels, enclenchent le cycle de résorption. Une fois la résorption terminée, les Oc, par des signaux directs et indirects, stimulent le recrutement des Ob qui initient ainsi la phase de formation osseuse. La phase de résorption ne dure que deux semaines contre 4 à 6 mois pour la phase de formation, différence explicable en partie par la durée de vie courte des Oc [66, 67]. La section qui suit couvrira les mécanismes moléculaires de ce processus au niveau de l'Ob et de façon plus détaillée, au niveau de l'Oc.

### **2.4.1 L'ostéoblaste**

L'ostéoblaste est la cellule responsable du dépôt de la matrice osseuse et dérive des cellules mésenchymateuses. En culture, l'Ob est presque identique aux fibroblastes avec comme seule différence morphologique une matrice extracellulaire minéralisée. Cependant, la cascade d'événements menant à la différenciation et à la maturation des Ob est très peu décrite par rapport aux Oc. Tous les gènes exprimés chez l'Ob le sont aussi chez le fibroblaste, sauf pour ce qui est de *osterix*, spécifique aux Ob. Par contre,

contrairement aux fibroblastes, seuls les Ob sont capable de former de l'os sous l'effet de la vitamine D.

Les facteurs de transcription Runx2, osterix et  $\beta$ -catenin sont les principaux facteurs de transcription des Ob et sont essentiels à leur formation [68, 291]. Ces facteurs contrôlent de façon conjointe les voies qui mènent de la cellule progénitrice jusqu'à la formation des Ob (Figure 5). Le mécanisme d'action de Runx2 est mal compris mais son rôle comme facteur de différenciation des Ob ne fait pas de doute. Les études animales avec des souris knock out pour le gène Runx2 montrent que ces animaux naissent avec un squelette mature mais constitué exclusivement de cartilage, sans aucune différenciation des précurseurs en Ob [39, 69]. De plus, ces souris ne démontrent pas de formation d'Oc puisque les Ob sont nécessaires dans leur différenciation, comme nous le verrons plus loin. Runx2 semble donc être le médiateur pivot pour mener la cellule progénitrice vers la lignée des Ob, alors que osterix et  $\beta$ -catenin seraient essentiels au passage du pré-Ob à l'Ob immature [291].



**Figure 5. Facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des Ob.**

La détermination de la lignée cellulaire des Ob implique l'action conjointe de Runx2, de osterix et de  $\beta$ -catenin. L'activation de Runx2 résulte en l'inhibition de la différenciation vers les chondrocytes et les adipocytes, favorisant ainsi la lignée des Ob. L'action combinée de Runx2, de osterix et de  $\beta$ -catenin vient ensuite permettre le passage du pré-Ob vers l'Ob immature, éliminant du même coup la possibilité de différenciation en chondrocyte.

Il est par contre connu que d'autres facteurs de croissance sont impliqués dans le développement embryonnaire des Ob. Les « bone morphogenetic proteins » (BMP) stimulent l'expression *in vitro* de Cbfa1 tandis que le tumor growth factor- (TGF)- $\beta$  le diminue [68]. Cependant, l'effet *in vivo* n'a pas encore été démontré pas plus que son importance physiologique. Beaucoup d'études sont encore nécessaires pour élucider la différenciation et la maturation des Ob.

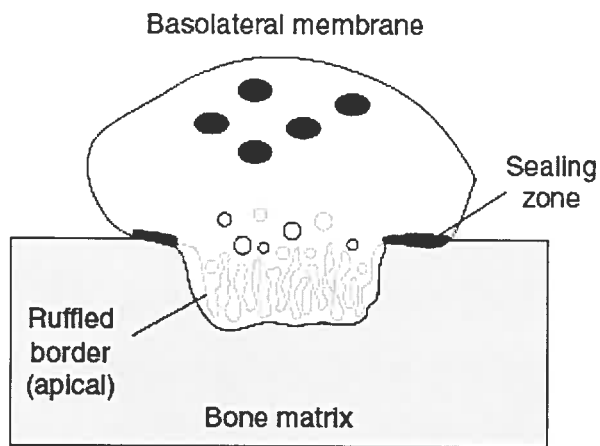
#### 2.4.2 L'ostéoclaste

L'ostéoclaste est la seule cellule de l'organisme capable de résorption osseuse. Un déséquilibre du métabolisme osseux en faveur des Oc mène à la perte de la masse osseuse, soit l'OP, qui peu importe son étiologie, résulte en une instabilité structurale rendant une personne qui en est atteinte plus susceptible aux fractures. L'ostéoclaste est une cellule relativement grosse (100  $\mu\text{m}$ ) contenant de multiples noyaux. Elle est caractérisée par la présence de TRAP dans son cytoplasme et du récepteur à la calcitonine, deux marqueurs spécifiques à ce type cellulaire [70, 71].

L'ostéoclaste existe sous 2 formes fonctionnelles, la forme motile et la forme active (capable de résorption osseuse). Puisque le pré-Oc provient de la moelle osseuse, il doit se déplacer à l'intérieur de l'os pour accomplir sa fonction. Lorsqu'en phase motile, la cellule est non-polarisée et se déplace à l'aide d'un système de lamellipodes s'étendant à l'avant en direction du déplacement alors que l'arrière se rétracte, propulsant ainsi la cellule dans l'axe du mouvement. Lorsque l'Oc atteint la zone de remodelage osseux, la cellule devient polarisée ce qui entraîne un réarrangement du cytosquelette. Suite à ce

réarrangement, la cellule exhibe une bordure en brosse et une zone de scellement permettant à la cellule de s'attacher à la matrice osseuse, formant ainsi une lacune de résorption isolée de la cellule et du milieu extracellulaire [72, 73]. La zone de scellement, sorte d'anneau possédant des extensions appelées podosomes, se lie à la matrice grâce à l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ , assurant ainsi la création d'un milieu acide riche en protéases et isolé du milieu environnant, donc favorable à la dégradation de la matrice osseuse localement [74]. La bordure en brosse quant à elle correspond à la membrane cellulaire faisant face à l'os et formée par la fusion de vésicules. Elle contient une multitude de transporteurs  $H^+$ -ATPase, pompes à protons, canaux chloriques et enzymes protéolytiques telles que la cathepsine K et la métalloprotéase-9 nécessaires à la dissolution des minéraux et la dégradation de la matrice osseuse [75]. La résorption se termine lorsque la concentration calcique à l'intérieur de la lacune s'élève causant alors le détachement de l'Oc de la matrice. Il est décrit que la cellule meurt par apoptose à la fin du cycle de résorption [76]. La figure 6 représente la structure de l'Oc actif.

L'ostéoclaste provient de la lignée cellulaire des monocytes/macrophages et la maturation en Oc nécessite la présence de divers types cellulaires tels que l'Ob, le fibroblaste, la cellule T activée ou certains types de lymphocytes [77-80]. L'Ob peut soutenir le développement des pré-Oc par la présence dans le milieu de M-CSF et de RANKL sur sa surface cellulaire tandis que la cellule T ou le lymphocyte affecte le pré-Oc de façon paracrine par la sécrétion de cytokines [81]. La proximité entre ces cellules de soutien et le pré-Oc est donc essentielle pour la prolifération, survie et différenciation en Oc [82].



**Figure 6. Configuration de l'ostéoclaste actif.** La zone de scellement se forme suite à la polarisation de la cellule et à l'interaction de la cellule avec la matrice osseuse par l'intermédiaire des intégrines  $\alpha_v\beta_3$ . Se forme ensuite la bordure en brosse qui permet, suite à la fusion des vésicules avec la membrane cellulaire, la libération des enzymes dégradatives essentielles à la digestion de la matrice et la dissolution des minéraux. L'augmentation de la concentration calcique dans la zone de scellement annonce la fin du processus de résorption et entraîne le détachement de l'Oc de l'os.

Au niveau cellulaire, les mécanismes de contrôle de la formation et de l'activation des Oc n'ont été décrits que tout récemment. Cette voie de différenciation implique des interactions complexes entre médiateurs hormonaux et cytokines et entre Ob, cellules de soutien et pré-Oc résultant en la formation d'Oc et la dégradation osseuse [82, 83].

#### *2.4.2.1. Régulation de la différenciation cellulaire : l'axe CSF-1 et c-fms*

La présence de l'axe CSF-1/c-fms (M-CSF) est essentielle non seulement pour la différenciation des Oc mais aussi pour la génération d'Oc fonctionnels. L'importance de cet axe dans la différenciation des Oc est reconnue puisque l'absence de PU.1, un régulateur de l'expression de fms, est une des causes reconnues d'ostéopétrose, maladie caractérisée par une activité ostéoclastique déficiente menant à un squelette sclérotique à forte densité osseuse [84]. De plus, les modèles de souris ayant une mutation dans le gène codant pour M-CSF démontrent un squelette ostéopétritique suite à l'absence de cette protéine. Cette mutation provoque une diminution du nombre d'Oc ainsi que des Oc ayant une activité déficiente [66, 67]. D'autres études ont aussi démontré que M-CSF était non seulement indispensable pour la prolifération des pré-Oc, mais aussi pour la différenciation des Oc et la survie des cellules matures [85-87]. L'interaction M-CSF/c-fms résulte en l'activation de c-Src, qui semble indispensable pour la transduction du signal menant à l'activation des Oc [88]. En effet, la souris knock-out pour c-fms démontre une différenciation des Oc qui est normale, mais les Oc formés montrent une mobilité réduite, sont caractérisés par l'absence de la bordure en brosse et sont par conséquent inactifs [89-91].

#### *2.4.2.2. Régulation de la différenciation cellulaire : l'axe RANKL/RANK/OPG*

Bien que la présence de M-CSF soit essentielle pour une différenciation et une fonction adéquate des Oc, elle est par ailleurs insuffisante. Décrite vers la fin des années 1990, la cascade RANKL/RANK/OPG constitue un déterminant majeur de la maturation et de l'activité des Oc. Les joueurs principaux de cette cascade font partie de la



superfamille des facteurs de nécrose tumorale ligand et récepteur (TNF ; TNFR) ainsi que RANK, RANKL et OPG.

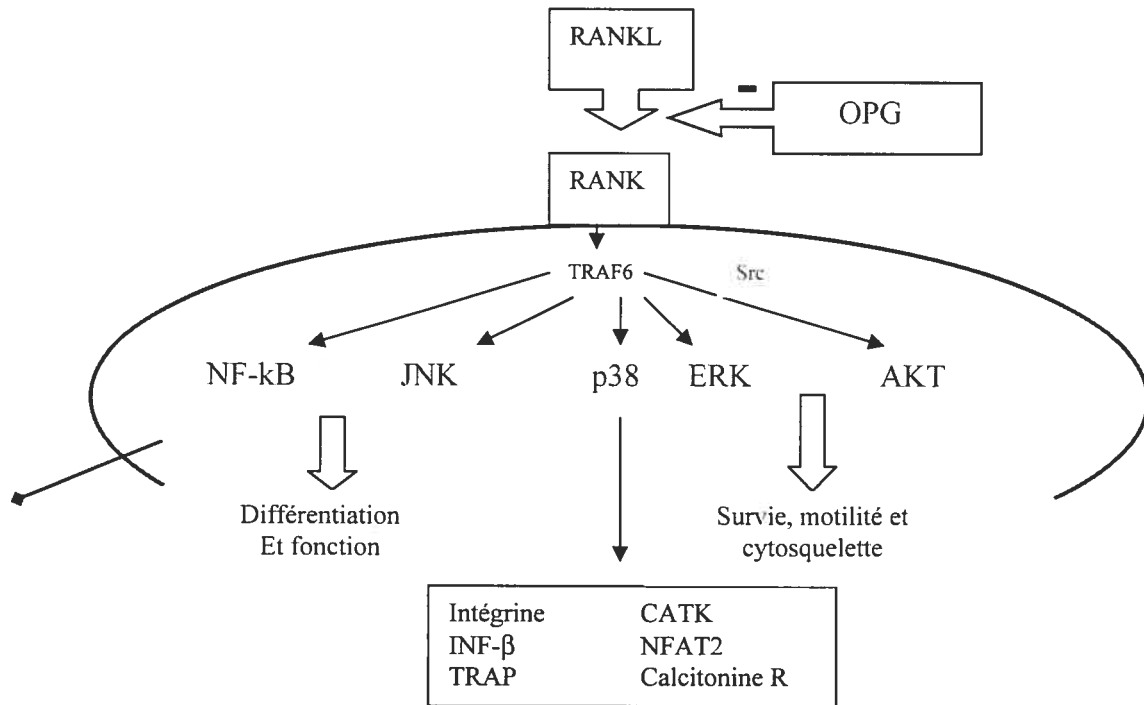
RANKL existe sous 3 formes. La plus importante est liée à la membrane cellulaire et exprimée par plusieurs types de cellules dont les cellules stromales, les Ob, les Oc, les chondrocytes, les cellules périostées et endothéliales [87, 92-94]. La seconde forme est soluble par clivage de la protéine membranaire et la dernière est également soluble et sécrétée surtout par les cellules T activées et les cellules squameuses de carcinome [86, 95-97].

L'expression de RANKL est affectée par une multitude de médiateurs important dans le métabolisme osseux tels que la vitamine D, les GC, la PTH, la PGE<sub>2</sub>, les IL-1 et -6, la leptine et le facteur de transcription ostéoblastique cbfa-1 [98]. Toutes ces molécules jouent un rôle dans la régulation de l'activité de RANKL. Dans le métabolisme osseux, RANKL stimule l'activation, la survie et l'adhérence à l'os des Oc [99-101]. De plus, avec ou sans la présence de M-CSF, RANKL peut induire la différenciation des Oc [86, 102]. RANKL est également un immunomodulateur et est impliqué dans la calcification endothéliale, deux rôles qui ne seront pas discuté ici [103, 104].

Le récepteur RANK quant à lui est un récepteur transmembranaire présent principalement dans les Oc et les cellules dendritiques permettant la liaison avec RANKL [92, 105]. L'activation de RANK par ses ligands mène à l'expression de plusieurs gènes spécifiques au développement et l'activation des Oc. La signalisation intracellulaire suite

à la liaison de RANKL avec RANK se transmet par l'intermédiaire de divers facteurs cytoplasmiques (TRAF2, -5 et-6) et cascades de signalisation (inhibiteur de NF-kB kinase (IKK), c-JUN N-terminal kinase (JNK), p38 kinase, « extracellular signal-regulated kinase » (ERK) ainsi que les voies Src) [106, 107]. La figure 7 constitue une représentation générale de la signalisation intracellulaire dans le développement des Oc.

TRAF6 est considéré comme le plus important facteur cytoplasmique dans l'ostéoclastogénèse en amont des cascades ci-haut mentionnées. L'activation de JNK et de NF-kB mène à la différenciation et à l'activation des Oc par le biais de multiples régulateurs transcriptionnels [94, 108]. La stimulation de p-38 via MKK6 mène à l'expression de gènes codant pour la cathepsine, TRAP et l'intégrine  $\beta_3$ , tandis que l'activation de Src mène, par le biais de AKT, à la production de protéines nécessaires au réarrangement du cytosquelette, de la survie cellulaire et de la motilité [108, 109]. Ceci constitue un portrait sommaire de l'effet de la liaison de RANK/RANKL qui a pour résultat la mise en œuvre de la machinerie intracellulaire nécessaire à la différenciation et à la fonction des Oc.



**Figure 7. Signalisation intracellulaire de l'axe RANKL/RANK/OPG.** La liaison de RANKL et avec RANK mène à la transduction de signaux intracellulaires régulés par TRAF-6. OPG agit comme un récepteur «decoy» de façon à bloquer la formation et la maturation des Oc.

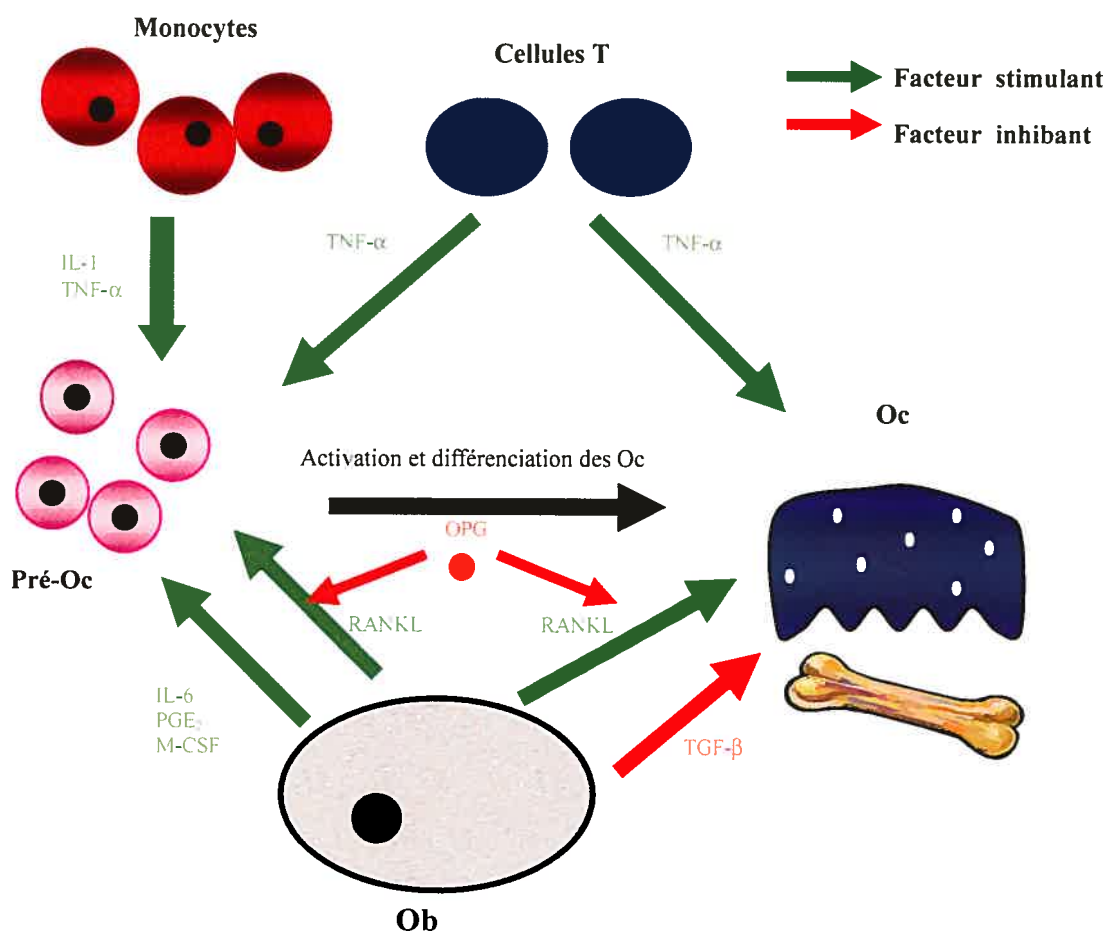
De son côté, OPG est exprimé de façon constitutive par une grande variété de cellules dont l'Ob [110]. OPG exerce une action inhibitrice sur la différenciation, l'attachement à l'os, la fonction, la survie des Oc et favorise également leur apoptose [111]. Il exerce son rôle en agissant comme « decoy receptor » sur RANKL en empêchant la liaison de RANKL sur RANK, inhibant du même coup toute transduction intracellulaire du signal nécessaire à la maturation et à l'activation des Oc [86,87].

La régulation de la masse osseuse par l'axe RANK/RANKL/OPG dépend d'une multitude de cytokines/hormones qui stimulent l'Ob et les cellules stromales à produire RANKL, donnant ainsi pour les Oc le signal nécessaire à la résorption osseuse. La présence de M-CSF et de RANKL est essentielle pour la prolifération, survie et différenciation des précurseurs d'Oc [82]. Le M-CSF donne aux précurseurs le signal nécessaire à leur prolifération et survie. Par contre, les précurseurs doivent entrer en contact avec les Ob ou avec les cellules stromales pour compléter le processus de maturation [82]. Ceci se fait par l'interaction entre RANKL sur les cellules stromales ou les Ob et son récepteur RANK sur les précurseurs d'Oc. Cette liaison peut être inhibée de façon compétitive par la présence de OPG, qui est un récepteur soluble sécrété par les Ob [86]. Il existe aussi une forme circulante de RANKL (sRANKL), capable de stimuler la maturation des Oc *in vitro* mais dont la contribution *in vivo* reste à être démontrée.

Les Ob ont donc la double fonction de recrutement des Oc par l'expression à leur surface de RANKL et d'inhibition de leur maturation par la sécrétion de OPG, et l'équilibre entre l'expression de ces deux médiateurs dicte la quantité d'os qui est

résorbée [3]. La plupart des médiateurs qui stimulent la résorption osseuse tels PTH, 1,25-dihydroxyvitamine D<sub>3</sub> et TNF- $\alpha$  accroissent l'expression de RANKL. TNF- $\alpha$  et IL-1 modulent l'axe RANK/RANKL/OPG en stimulant la production de M-CSF (augmente le pool des pré-Oc) et l'expression de RANKL [112]. Aussi, le TGF- $\beta$  (accroît la production d'OPG) [113], la PTH (augmente la production de RANKL/diminue celle d'OPG) [114], la 1,25-dihydroxyvitamine D<sub>3</sub> (augmente la production de RANKL) [115], les GC (augmente la production de RANKL et diminue celle d'OPG) [116], et les estrogènes (accroissent la production d'OPG) [56] agissent tous comme modulateur de l'axe. Par contre, la régulation de la fonction des Oc ne passent pas seulement par l'effet des Ob puisque la calcitonine, le TGF- $\beta$  et les estrogènes peuvent affecter directement les Oc [117-119]. La figure 8 résume l'effet des différents médiateurs dans le processus d'ostéoclastogénèse.

L'importance de RANK-RANKL-OPG dans le métabolisme osseux se reflète par sa participation dans plusieurs processus pathologiques que l'on peut regrouper en 1) maladie métabolique osseuse, 2) inflammatoire osseuse, 3) oncologique osseuse et 4) héréditaire osseuse.



**Figure 8. Résumé des différents facteurs affectant la différenciation et la fonction des ostéoclastes.** Représentation des divers acteurs impliqués dans le processus de maturation et d'activation des Oc.

La première catégorie regroupe principalement l'ostéoporose, qu'elle soit postménopausique, induite par les GC ou secondaire à l'hyperparathyroïdie. L'absence d'estrogènes à la ménopause mène à une augmentation du ratio RANKL/OPG comparativement aux femmes préménopausées ou sous hormonothérapie de

remplacement, favorisant ainsi la diminution de la masse osseuse [55]. Le même phénomène se produit dans l'ostéoporose induite par les GC ou secondaire à l'hyperparathyroïdie (chez les rats), où l'on observe aussi une hausse de l'expression de RANKL associée à une baisse de la production d'OPG [116, 120, 121]. L'effet net sur l'os est donc une diminution de la densité osseuse et alors une fragilité accrue du squelette le rendant plus susceptible aux fractures.

Dans les maladies inflammatoires comme l'arthrite rhumatoïde (RA), une multitude de médiateurs inflammatoires interagissent sur les cellules osseuses, cartilagineuses, synoviales et inflammatoires menant éventuellement à l'érosion osseuse caractéristique de RA. Ces médiateurs proinflammatoires peuvent en majorité influencer l'axe RANK/RANKL/OPG. Il a d'ailleurs été démontré dans un modèle animal que l'expression de RANK est augmentée dans l'os et le cartilage tandis que celle de RANKL l'est dans les synoviocytes et les cellules T [95, 122]. La surexpression de RANKL sans augmentation concomitante de OPG mène à un déséquilibre métabolique favorisant alors l'augmentation du nombre d'Oc ainsi que leur activité. Ceci se traduit cliniquement par l'érosion osseuse caractéristique de RA.

On retrouve aussi des modifications de la régulation de l'axe RANK/RANKL/OPG dans le myélome multiple (MM) et les métastases osseuses. Les cellules du MM augmentent le ratio RANKL/OPG de façon paracrine, mais sont aussi capables, tout comme les cellules métastatiques, d'exprimer RANKL et/ou de le sécréter

dans sa forme soluble, favorisant le recrutement accru des Oc et donc la présence de lésions lytiques osseuses [95, 123-125].

Enfin, des anomalies héréditaires de l'axe ont été décrites dans le Paget juvénile, le Paget familial et dans l'hyperphosphatasie expansile, toutes des maladies du squelette caractérisées par des lésions lytiques ou par la présence de l'ostéopénie. Les mutations en question se retrouvent dans le gène encodant le peptide signal de RANK (Paget familial et hyperphosphatasie) ou dans le gène codant pour OPG (Paget juvénile) affectant ainsi la modulation normale de l'axe RANK/RANKL/OPG et par conséquent la différenciation contrôlée des Oc [126-128].

Puisque le ratio RANKL/OPG détermine l'activité osseuse nette [86], plusieurs stratégies thérapeutiques peuvent être développées à partir de cet axe. Toutes les stratégies explorées jusqu'ici se trouvent regroupées au Tableau 1. Malgré leur grand nombre, leur diversité et leur emploi dans plusieurs modèles animaux, seule la protéine de fusion OPG et un anticorps humain contre RANKL ont fait l'objet d'une étude clinique randomisée chez l'humain. Par contre, toutes ces études avaient comme objectif final l'effet du traitement sur les marqueurs du métabolisme osseux et non sur le traitement de la maladie proprement dite.

Une première étude a comparé à un placebo l'effet d'une seule dose du AMG 162 (anti-RANKL humain) sur l'excrétion urinaire du N-télopeptide (NTX) dans l'OP post-ménopause chez 49 patientes. À 6 mois, les investigateurs ont rapporté une diminution de 81% de l'excrétion urinaire de NTX chez le groupe traité contre 10% chez le groupe



contrôle [129][92]. Le même groupe a aussi réalisé une étude similaire sur 52 femmes post-ménopausées avec un suivi de 85 jours. Cette fois, une seule dose de protéine de fusion OPG a mené à une diminution de 14% de NTX à 6 semaines ainsi qu'une diminution de l'excrétion urinaire de déoxyypyridinoline de 80% [130]. Le dernier essai clinique a comparé le pamidronate à l'AMGN-0007, une protéine de fusion OPG, sur l'expression urinaire du NTX. Chez les patients atteints de MM (n=28), l'excrétion du marqueur fut diminuée de 47% et de 74% chez les patientes avec métastases osseuses suite à un cancer du sein, des résultats comparables au pamidronate [131].

Bien que ces résultats semblent prometteurs, des études avec end-point clinique sont nécessaires pour bien évaluer le potentiel de l'axe RANKL/RANK/OPG comme cible thérapeutique dans les maladies osseuses. Par contre, leur rôle de pivot dans l'ostéoclastogénèse ne fait aucun doute.

#### *2.4.2.3. Régulation de la différenciation cellulaire : l'axe NO et estrogènes*

La relation entre ces deux médiateurs vient du fait que NO est un messager de l'action anabolique des estrogènes dans l'os. NO est par contre produit par les Ob et puisque NO est un gaz capable de diffusion, il est fort probable qu'il affecte aussi les Oc comme le démontre les études in vitro [132, 133]. NO affecterait alors la cascade apoptotique de l'Oc lorsque présent en forte concentration [134]. L'effet des estrogènes sur l'os par l'entremise de NO se résume donc au niveau cellulaire en une stimulation de la formation osseuse sur les Ob et une inhibition indirecte des Oc. L'action directe des estrogènes sur

les Oc semble plutôt venir au stade du pré-Oc, où il semble que l'estrogène de par sa liaison au récepteur estrogène- $\alpha$  puisse diminuer la formation des Oc [135].

### Tableau 1.

#### **Stratégies thérapeutiques potentielles ayant pour cible l'axe RANK/RANKL/OPG**

---

##### **RANKL**

---

###### *Suppression de la production endogène*

- $17\beta$ -estradiol

###### *Inhibition de la production de RANKL*

- OPG synthétique
  - Protéine de fusion de RANK
  - Anticorps Anti-RANKL
- 

##### **RANK**

---

###### *Inhibition de la liaison avec RANKL*

- Anticorps anti-RANK

###### *Suppression de la signalisation intracellulaire*

- $17\beta$ -estradiol
- 

##### **OPG**

---

###### *Augmentation de la production de OPG*

- bone morphogenic protein 2
- $17\beta$ -estradiol
- raloxifene
- bisphosphonates

###### *Surexpression transgénique de OPG*

###### *OPG synthétique*

---

#### 2.4.2.4. Régulation de la différenciation cellulaire : un nouvel axe?

Plusieurs groupes ont noté que même avec l'addition de M-CSF et de RANKL dans une culture de pré-Oc, très peu d'Oc sont formés. Cette observation laisse donc supposer qu'un ou d'autres facteurs présent dans le métabolisme des Ob, pourraient jouer un rôle dans la formation des Oc. Deux voies intracellulaires potentielles pourraient être le « immune tyrosine-based activation motif » (itam) et la tyrosine kinase syk. Deux récepteurs ont jusqu'ici été identifiés qui utilisent ces voies de signalisation intracellulaires : FC $\gamma$  et DAP12. Des études ont montré que la stimulation de ces récepteurs pourrait induire la formation des Oc [136, 137]. Par contre, des études plus approfondies de ces voies de signalisation sont nécessaires pour identifier leurs rôles exacts.

#### 2.4.3 Couplage entre la formation et de la résorption osseuse

Comme mentionné plus haut, le métabolisme osseux est étroitement régulé par de multiples types cellulaires, hormones, cytokines et médiateurs. Depuis quelques années, les connaissances acquises sur les mécanismes cellulaires et moléculaires ont permis de mieux comprendre les acteurs qui influencent la différenciation et la fonction des Oc. Il est généralement accepté que l'Ob joue un rôle central dans le métabolisme osseux de par sa capacité à réguler l'ostéoclastogénèse par l'intermédiaire de l'axe RANKL/RANK/OPG. Par contre, les mécanismes qui déterminent la fin de la phase de résorption et poussent les Ob à initier la phase de formation osseuse restent mal compris. En effet, il est démontré qu'il existe un couplage entre le dépôt de la matrice et la

dégradation de celle-ci. *In vivo*, la stimulation de la résorption osseuse par la PTH et les PGs engendre du même coup la formation osseuse [67, 81, 138]. Les responsables de ce couplage sont cependant mal identifiés. Certains facteurs de croissance libérés de la matrice lors de la résorption de l'os tels que « insulin growth factor » (IGF-) 1 et 2 ainsi que TGF- $\beta$  pourraient en être responsables [139-141]. En effet, ces médiateurs se retrouvent en grande quantité dans la matrice de l'os et le milieu acide nécessaire à la dégradation de la matrice pourrait être suffisant pour les activer, entraînant du même coup une stimulation de l'activité anabolique des Ob.

Par contre, de nouvelles études sur des souris transgéniques tendent à démontrer que le ou les facteurs qui influencent le couplage résorption/formation semble provenir des Oc. Ce nouveau concept ferait alors de l'Oc la cellule pivot dans la régulation de la masse osseuse. En effet, les souris knock-out OPG<sup>-/-</sup> sont fortement OP en raison d'un nombre et une activité accrue des Oc. Par contre, ces souris démontrent aussi une augmentation importante du dépôt de la matrice osseuse localement. Des évidences histologiques suggèrent que cette augmentation de l'activité anabolique de l'os serait secondaire à l'activité cellulaire et non à un facteur relâché de la matrice [142]. Ceci indiquerait alors que la formation de l'os serait au moins en partie stimulée par l'activité des Oc eux mêmes.

D'autres évidences du possible rôle pivot des Oc dans le couplage osseux viennent des observations faites chez les souris ostéopérotiques ainsi que chez les sujets humains qui en sont atteints. Dans la plupart des formes de cette maladie, la diminution

de la résorption osseuse est couplée à une diminution de la formation de l'os. Par exemple, les souris déficientes en c-fos (ostéopétrotiques) ne peuvent former d'Oc mais montrent aussi une faible activité anabolique au niveau de l'os comparée aux souris normales [143]. Par contre, les souris knock-out pour c-Src ou pour le canal chlorique 7 sont aussi ostéopétrotiques mais montrent un nombre accru d'Oc (réduction de l'apoptose) qui ne peuvent pas résorber l'os [144-146]. Chez ces souris, la résorption osseuse est inexistante mais la formation de l'os est grandement accrue, laissant supposé que le facteur principal de couplage est produit par les Oc. Ces observations faites chez l'animal ont aussi été remarquées chez l'homme, où on retrouve également une formation osseuse accrue dans cette maladie lorsque la cause est une mutation dans le canal chlorique 7 [147].

Un autre facteur à considérer est la PTH, dont l'action positive sur la résorption osseuse est bien décrite. Par contre, la PTH peut aussi être administrée de façon thérapeutique pour son effet anabolique. En administrant la PTH de façon intermittente, on observe un recrutement accru des Ob et une diminution de leur apoptose résultant en effet net anabolique [148-151]. De plus, il est démontré que l'effet anabolique de la PTH n'est possible que si des Oc fonctionnels sont présents. En effet, lorsque donné en présence de biphosphonates (inhibiteur des Oc), la PTH ne présente aucun effet sur la formation osseuse [152, 153]. L'absence d'effet anabolique de la PTH est aussi observé chez les souris ostéopétrotiques dépourvues d'Oc fonctionnels, suggérant l'importance des Oc dans le processus de couplage formation/résorption osseuse [154].

## 2.5 ICAM-1

La section qui suit décrit l'implication de ICAM-1 dans le métabolisme osseux ainsi que dans les pathologies osseuses. Cette section a été écrite à partir d'un article déjà publié dans « Expert Opinion in Biological Therapy, 5 (3) : 313-320; 2005» et constitue la traduction de l'article rédigé en anglais, bien que quelques modifications ont été ajoutées pour le bénéfice du lecteur. L'article a été modifié pour les besoins de la rédaction de la thèse. La version intégrale de l'article se trouve jointe aux résultats comme article #4.

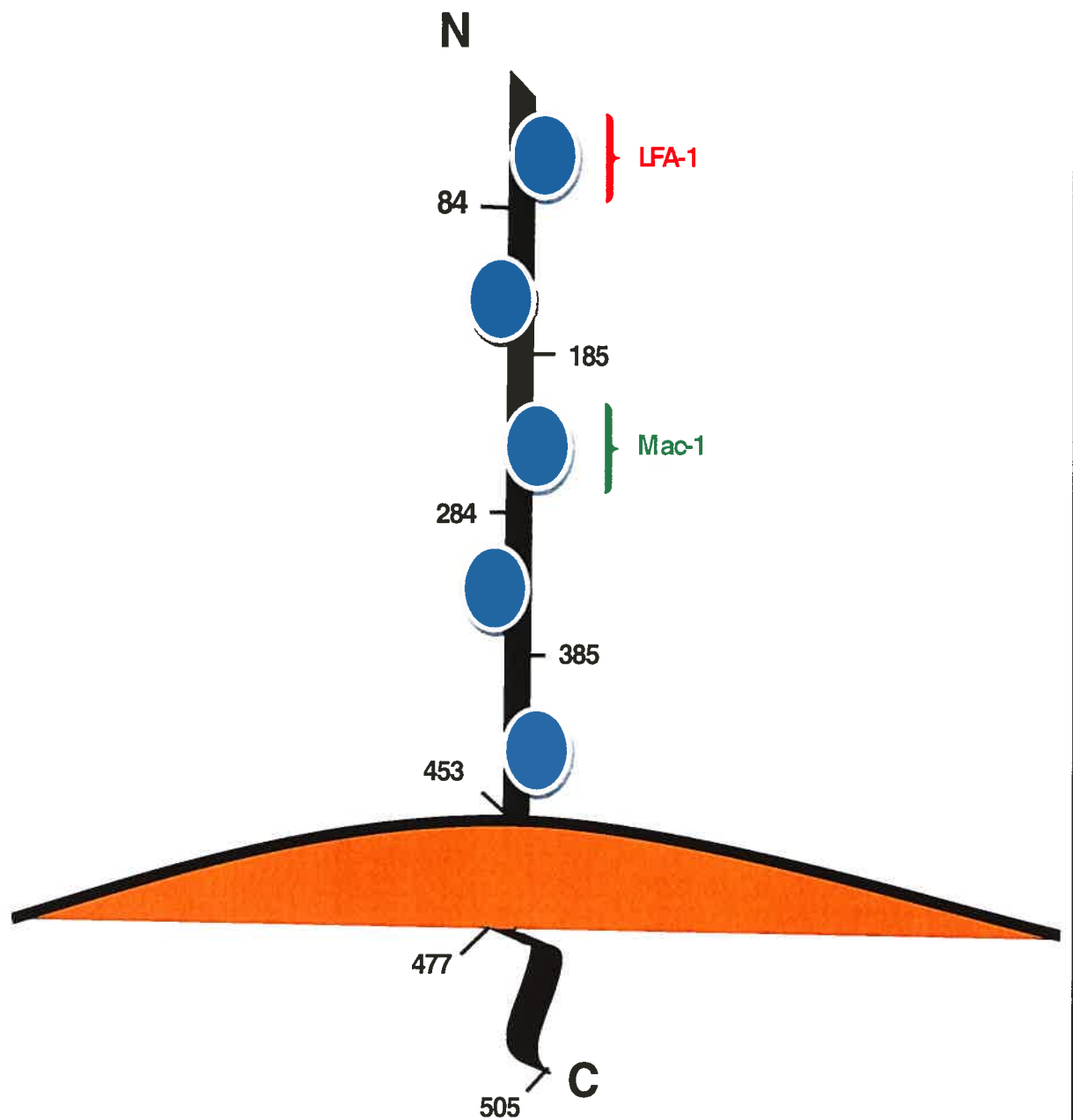
### 2.5.1. Structure et fonction de ICAM et de sICAM

ICAM-1 est une glycoprotéine appartenant à la grande famille des immunoglobulines. Cette molécule d'adhésion permet l'interaction cellulaire avec les cellules exprimant son contre-récepteur, soit LFA-1 (sous-unité  $\beta_2$ ; CD11a/CD18) et Mac-1 (CD11b/CD18) [155, 156]. Le gène humain de ICAM-1 est localisé sur le chromosome 19 et est composé de 7 exons et de 6 introns. ICAM-1 possède 5 domaines extracellulaires pontant la membrane cellulaire et une courte queue cytoplasmique (Figure 9). Chacun des 5 domaines de type "immunoglobulin-like" est codé par un exon différent [293]. Le premier domaine est celui responsable de liaison avec LFA-1 tandis que le troisième domaine se lie avec Mac-1 [156-159]. La structure du promoteur de ICAM-1 contient plusieurs sites de liaison pour des facteurs de transcription tels que NF- $\kappa$ B, AP-1, AP-2, AP-3, Ets-1, C/EBP and Sp1. De tous ces facteurs, NF- $\kappa$ B semble être le plus important. Ce dernier coopère avec divers facteurs de transcription et co-activateurs facilitant ainsi la formation de complexes de transcription spécifiques au promoteur de

ICAM-1, affectant du même coup l'expression de cette molécule en fonction de divers stimuli. ICAM-1 est présent à la surface des cellules hématopoïétiques et non-hématopoïétiques. Son expression est accrue en présence de divers médiateurs inflammatoires, principalement TNF- $\alpha$ , IL-1 et IFN- $\gamma$  [160–162].

Les molécules d'adhésion permettent l'interaction cellules-cellules mais aussi entre les cellules et la matrice extracellulaire [163]. La fonction principale attribuée à ICAM-1 est le contrôle du trafic cellulaire inflammatoire, permettant la migration transendothéliale des cellules du sang vers les tissus [155, 157]. De plus, la migration des leucocytes médiée par ICAM-1 est considérée comme l'étape initiale du processus d'angiogénèse [164, 165] et l'interaction ICAM-1/LFA-1 est aussi impliquée dans une multitude de maladies autoimmunes et inflammatoires, d'infections virales et dans le cancer.

Une forme soluble de ICAM-1 (sICAM) est aussi décrite quoique les mécanismes qui sous-tendent sa production sont encore à ce jour mal compris et apparaissent type cellulaire dépendent. Par exemple, au niveau des cellules endothéliales, les niveaux de sICAM circulant reflètent l'expression membranaire de ICAM-1 et le clivage protéolytique est considéré comme le mécanisme principal de sa production [166-168]. D'un autre côté un ARNm codant pour sICAM est aussi décrit, ce qui suggère plus d'un mode de production pour cette protéine [169, 170]. Quoiqu'il en soit, la structure de la forme circulante correspond aux 5 domaines extracellulaires de ICAM-1 membranaire. Le poids moléculaire de la forme monomérique est pratiquement équivalente à celle de la



**Figure 9. Structure de ICAM-1**

La molécule d'adhésion ICAM-1 possède 5 domaines extracellulaires. Les domaines 1 et 3 sont reconnus comme étant les sites de liaison pour LFA-1 et Mac-1 respectivement. ● Domaine peptidique



protéine membranaire, soit 90 kDa [294]. Par contre, la protéine circulante se retrouve généralement sous forme multimérique pouvant atteindre 500 kDa. La molécule comprend 453 acides aminés, dont environ 90 qui composent chacun des domaines. sICAM est une glycoprotéine dont le degré de glycosylation varie selon le type cellulaire.

L'importance physiologique de sICAM reste cependant encore incertaine et controversée. Dans certaines situations, sICAM et ICAM-1 possèdent des rôles physiologiques similaires, tandis que dans d'autres cas, leurs actions sont opposées. Par exemple, à la fois ICAM-1 et sICAM sont angiogéniques tandis que dans les cellules épithéliales bronchiques, ICAM-1 favorise l'envahissement infectieux alors que sICAM le prévient [165, 170-172]. Malheureusement, le rôle de ICAM-1 dans le métabolisme osseux a très peu été étudié autre que pour ce qui est de son application dans l'arthrite rhumatoïde.

### **2.5.2. ICAM-1 et la physiologie osseuse**

Même s'il existe plusieurs articles qui décrivent l'expression de ICAM-1 dans les tissus RA ou le liquide synovial, la littérature qui concerne l'action physiologique de ICAM-1 dans les maladies osseuses est presque inexistante. Le groupe de Kurachi en 1993 fut le premier à décrire une diminution de la formation et de la fonction des Oc suite à l'addition d'anticorps anti-LFA-1 et anti-ICAM-1 dans un modèle de co-culture de cellules de rate et stromales de souris [4]. Quelques années plus tard, Tanaka et al démontrèrent l'expression de ICAM-1 à la surface des Ob humains obtenus chez des patients OA. De plus, il fut aussi décrit que l'engagement de ICAM-1 sur les Ob menait à

la production d'ARNm codant pour IL-6 et IL-1 $\beta$ . Ils conclurent que le lien ICAM-1/LFA-1 génèrait un signal intracellulaire résultant en la production de facteurs favorisant la production de cytokines pro-ostéoclastogènes [5].

Ce même groupe a aussi rapporté que les Ob pouvaient être séparés en 2 sous-populations selon l'expression membranaire de ICAM-1. Le sous-groupe ICAM-1<sup>+</sup> exhibait un degré d'adhésion élevé entre Ob et les pré-Oc, ainsi qu'une plus grande production de ODF comparé au sous-groupe ICAM-1<sup>-</sup>. Les Ob ICAM-1<sup>+</sup> était donc capable de supporter la formation des Oc, une propriété que ne possédait pas les Ob ICAM-1<sup>-</sup>. Aussi, l'addition de anti-ICAM-1 résultait en une inhibition de la formation des Oc par les cellules ICAM-1<sup>+</sup>. Les auteurs conclurent donc que la liaison de haute affinité entre Ob et pré-Oc médiée par ICAM-1 et LFA-1 était nécessaire pour maximiser la production de ODF lors de la maturation des Oc [6].

Ces études ont démontré l'importance de l'axe ICAM-1/LFA-1 dans la formation des Oc. À ce jour, aucune autre fonction que la stabilisation du contact Ob/pré-Oc n'est décrite pour cet axe. En effet, on croit que ce lien intercellulaire stable facilite l'interaction RANK/RANKL. Par contre, plusieurs autres études ont rapporté des anomalies de production et d'expression pour ICAM-1 et sICAM dans différentes pathologies osseuses. Ces études sont malheureusement en grande majorité d'ordre descriptif. Il existe donc un grand vide dans la littérature pour espérer comprendre l'importance physiologique de ICAM-1 dans les maladies osseuses.

### 2.5.3. ICAM-1 dans les pathologies osseuses

Les altérations dans la régulation des mécanismes inflammatoires et les dysfonctions dans le contrôle des Oc sont des mécanismes clés dans la génération de pathologies osseuses affectant la densité de l'os. Bien qu'aucune relation physiologique entre l'expression de ICAM-1 et les maladies osseuses ne soit rapportée, des études observationnelles rapportent des niveaux anormaux pour ICAM-1 et sICAM dans des maladies telles RA, OA et OP. Ces études seront décrites dans les sections qui suivent.

#### 2.5.3.1. ICAM-1 dans RA

L'infiltration leucocytaire dans les tissus inflammatoires joue un rôle central dans la pathogénèse de RA [173]. Puisque ICAM-1 est capable de moduler la migration transendothéliale des leucocytes dans de tels tissus, plusieurs études se sont penchées sur la présence des molécules d'adhésion dans cette maladie.

Dans RA, ICAM-1 se retrouve principalement exprimé à la surface des cellules endothéliales de la membrane synoviale, expression qui est supérieure lorsque la maladie est active comparée à l'expression normalement retrouvée dans les tissus sains [174-176]. ICAM-1 est aussi fortement exprimé à la jonction pannus/cartilage, sur les macrophages de la synoviale, sur les fibroblastes et sur les leucocytes [174, 176-183]. De plus, les médiateurs inflammatoires retrouvés dans RA comme IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  et IFN- $\gamma$  ont tous la capacité d'accroître l'expression de ICAM-1 et l'adhésion cellulaire dans diverses situations [160, 181, 184-186].

Les niveaux circulants de sICAM sont aussi augmentés chez les patients RA et dans la vasculite rhumatoïde comparés à la normale [187-192]. Même si les rapports sont conflictuels lorsque vient le temps d'analyser l'activité de sICAM [188, 191, 193-195], la littérature récente rapporte que sICAM serait impliqué dans les dommages vasculaires plutôt que dans la destruction du cartilage articulaire dans RA [196].

De son côté, l'interaction cellule-cellule entre les leucocytes et les fibroblastes synoviaux RA médiée par ICAM-1 mène à une production accrue de MIP-1 $\alpha$ , ce qui, encore une fois, implique cette molécule d'adhésion dans la modulation du trafic cellulaire inflammatoire [197]. De façon intéressante, la régulation des cellules synoviales retrouvées dans OA et RA semble dépendre de la maladie. Dans les fibroblastes synoviaux RA, l'expression de ICAM-1 et de RANKL est stimulée par FGF-2 avec comme résultante l'augmentation de la maturation des Oc, une propriété qu'on ne retrouve pas dans les fibroblastes synoviaux [198]. Aussi, l'engagement de l'intégrine  $\beta_1$  est capable d'accroître l'expression de ICAM-1 et Fas sur les synoviocytes RA, ce qui mène à une augmentation de l'apoptose médiée par Fas, un phénomène que l'on n'observe pas dans la synoviale OA [1].

Ces études démontrent donc une expression particulière pour ICAM-1 dans les cellules articulaires RA qui semble être pathologie-dépendante. Cette expression est possiblement secondaire au milieu inflammatoire retrouvé dans cette pathologie. Cette expression accrue de ICAM-1 contribue potentiellement au recrutement des cellules

inflammatoires, à la production de plus de médiateurs inflammatoires et par conséquent, à la génération de la cascade inflammatoire retrouvée dans la maladie rhumatoïde.

#### 2.5.3.2. *ICAM-1 dans OA*

Bien que les cellules OA et RA ne se comportent pas de façon similaire dans ces pathologies, ICAM-1 est aussi impliqué dans la pathophysiologie de OA. L'ostéoartrrose est la maladie articulaire la plus prévalente dans le monde résultant en une morbidité importante et à une perte de la fonction articulaire. Même si la pathophysiologie de l'OA n'est pas complètement comprise, les interactions entre l'os et le cartilage combinées à une charge mécanique anormale de l'articulation jouent un rôle primordial dans le développement de la maladie.

Dans l'OA, la présence de ICAM-1 dans les tissus affecte l'état inflammatoire et les mécanismes d'apoptose. Il est connu que cette expression de ICAM-1 dans les Ob OA discrimine 2 populations différentes d'Ob, le sous-groupe ICAM-1<sup>+</sup> possédant la capacité de recruter les OC, une propriété que ne possède pas les Ob ICAM-1<sup>-</sup> [6]. De plus, le sous-groupe ICAM-1<sup>+</sup> semble produire plus de IL-6 et de PGE<sub>2</sub>, deux cytokines affectant la destruction de l'os et tous deux impliqués dans le développement de l'OA [6, 199]. Cette expression particulière de ICAM-1 ainsi que les niveaux supérieurs de IL-6 et de PGE<sub>2</sub> produit par les Ob ICAM-1<sup>+</sup> laisse croire que les anomalies métaboliques retrouvées dans l'OA pourraient en partie être expliquées par la présence de ICAM-1.

De façon intéressante, les rapports décrivant l'expression de ICAM-1 à la surface des chondrocytes OA sont conflictuels. En effet, alors que certains auteurs rapportent une expression très faible pour ICAM-1 et LFA-1 dans la synoviale normale [200], les chondrocytes normaux [201] et OA [202, 203], d'autres ont montré que l'expression de ICAM-1 était induite à la surface des chondrocytes dans des conditions inflammatoires [201] et dans les chondrocytes OA [204]. Également, on rapporte que la présence de ICAM-1 favorise la mort par cytotoxicité des chondrocytes lorsqu'il y a des infiltrations cartilagineuses par les cellules T via le récepteur CD11 à leur surface cellulaire [205] mais aussi la protection de ces derniers contre l'apoptose de par leur capacité à se lier à l'acide hyaluronique [204].

Bien que les discordances apparentes des découvertes énumérées ci-haut existent et restent à être clarifiées, la présence de ICAM-1 dans l'os et dans le cartilage laisse croire à un possible rôle central pour cette molécule d'adhésion dans le cross-talk os/cartilage dans la pathophysiologie de l'OA.

#### 2.5.3.3. *ICAM-1 dans OP*

Selon la World Health Organization, l'OP est la maladie osseuse métabolique la plus commune dans le monde, affectant plus du tiers des femmes [206]. L'ostéoporose résulte d'un débalancement entre la résorption et la formation de l'os. Au niveau cellulaire, ceci se traduit par une activité ostéoclastique supérieure à la capacité des Ob de déposer la matrice osseuse, ce qui mène à une réduction nette de la masse osseuse.

Gao et al, utilisant un modèle de souris ovariectomisée, ont rapporté une expression accrue de ICAM-1 à la surface des cellules de rate comparée aux cellules de rate retrouvée chez les souris non-ovariectomisées [207]. Ils ont posé l'hypothèse que le déficit en estrogène résultait en une expression supérieure de ICAM-1 à la surface des pré-Oc et que ce phénomène pouvait, du moins en partie, expliquer la forte activité des Oc dans l'OP.

#### **2.5.4. ICAM-1 comme cible thérapeutique dans les pathologies squelettiques**

De par sa capacité à moduler l'inflammation, ICAM-1 a été utilisé comme cible thérapeutique dans diverses pathologies. Les études cliniques utilisant des mAb humanisés dirigés contre ICAM-1 ou son contre récepteur LFA-1 se sont avérées concluantes en ce qui a trait à l'amélioration clinique tout en démontrant un profil d'utilisation sécuritaire dans plusieurs pathologies extra-squelettiques [208-211]. Dans les maladies osseuses, la plupart des études ont été réalisées dans un contexte de RA.

De ces études, certaines ont rapporté des modifications dans le profil d'expression de ICAM suite au traitement médicamenteux couramment employé dans RA. La méthylprednisolone [212], le méthotrexate [213, 214], la leflunomide [213, 214] et ses métabolites actifs [215], les anti-inflammatoires non stéroïdiens et la colchicine sont tous capables d'abaisser l'expression de ICAM-1. Smith et al ont aussi montré une réduction de cette expression suite à l'emploi de ces médicaments principalement chez les patients qui démontraient une réponse au traitement [200]. L'importance de ces observations est qu'une réduction de l'expression de ICAM-1 pourrait mener à une altération du trafic

des cellules inflammatoires, pourrait modifier les symptômes cliniques et donc potentiellement prévenir la progression de la maladie. Effectivement, lorsque testé chez les modèles animaux, le développement de RA était ralenti suite à l'administration de mAb dirigés contre ICAM-1 ou LFA-1, ce qui démontrait un rôle central pour ICAM-1 dans la pathogénèse de RA [195, 216-218].

Les essais cliniques sur les humains ont aussi apportés des indices quant au potentiel de ICAM-1 comme cible thérapeutique dans RA. Dans une étude clinique composée de 32 patients RA réfractaires aux traitements conventionnels, Kavanaugh et al ont administré des mAb de souris dirigés contre ICAM-1 et vérifié la réponse clinique. Des 32 patients qui ont reçu un traitement de 5 jours, un bénéfice clinique fut rapporté chez 13 patients pour 29 jours et chez 9 pour 60 jours. Les effets secondaires furent mineurs et consistaient surtout de céphalées, fièvre et prurit [219]. Le même groupe a aussi rapporté des résultats cliniques chez 10 patients avec RA à un stade précoce traités avec le même mAb. 7 patients sur 10 ont démontré une réponse marquée ou modérée au traitement pour au moins un mois, tandis que 3 patients bénéficièrent d'un effet prolongé de plus de 7 mois. Les effets secondaires furent encore une fois mineurs et comparables à ceux décrits dans leur première étude [220]. Par contre, la seconde administration du même médicament à 8 de ces 10 patients amena des effets secondaires importants (urticaire, angioedème, pétéchies, arthralgies/myalgies) en plus de ceux initialement décrits [221]. La gravité de ces effets indésirables mena à la conclusion que des infusions répétées de mAb de souris chez l'humain causait une réaction allergique potentiellement dangereuse ce qui mis fin aux essais cliniques avec cette molécule.



L'efficacité d'une thérapie avec un oligodeoxynucleotide antisense contre ICAM-1 fut aussi étudiée pour contrer RA. ISIS 2302 fut administré pour une période de 4 semaines dans un essai clinique randomisé sur 43 patients sans toutefois démontrer de différence significative avec un placebo pour les 6 mois de la durée de l'étude. Le traitement présentait peu d'effets secondaires à part des céphalées, nausées et diarrhée. Puisque le profil du médicament était sécuritaire et que les auteurs avaient noté l'absence d'effets cliniques, ils conclurent qu'une étude utilisant des dosages plus important du médicament devrait être entreprise, ce qui n'est pas encore fait à ce jour [222].

La plupart des articles concernant le ciblage de ICAM-1 dans les pathologies osseuses fut réalisé dans un contexte de RA et aucun travail n'a directement étudié son application dans OA et OP. Par contre, in vitro, un traitement à l'acide hyaluronique a démontré un effet anti-apoptotique par l'engagement de CD44 et ICAM-1 sur les chondrocytes [204]. Aussi, dans un essai clinique randomisé, 40 patients avec OA du genou furent infiltrés avec ce médicament. Les auteurs ont démontré un lien entre l'amélioration de la fonction, les scores de la douleur et la diminution de sICAM récupéré dans le liquide synovial [223]. Ces 2 études, bien que non construites pour cibler ICAM-1 spécifiquement, laissent croire à un bénéfice potentiel d'utiliser ICAM-1 comme cible thérapeutique dans l'OA. Malheureusement, à ce jour, aucune étude n'a été conduite pour étudier le potentiel de cibler ICAM-1 dans l'OP.

## 2.5.5 ICAM-1/LFA-1 comme cible thérapeutique dans d'autres pathologies

### 2.5.5.1 Les maladies auto-immunes et la transplantation

LFA-1 est le seul membre de la famille des  $\beta_2$ -intégrines exprimé sur les lymphocytes T. Cette propriété en fait une cible de choix dans les maladies auto-immunes et dans la prévention du rejet des transplantations. LFA-1 permet la migration transendothéliale des lymphocytes T ainsi qu'une multitude de fonctions contrôlées par les contacts cellules-cellules. Entre autres, l'adhésion médiée par l'axe ICAM-1/LFA-1 est essentielle dans l'étape d'activation des lymphocytes T suite à la présentation des antigènes [261, 262]. *In vitro*, les anticorps monoclonaux dirigés contre LFA-1 inhibent la prolifération des lymphocytes T par de multiples signaux intracellulaires [261, 263], ce qui confère à cette cible thérapeutique un attrait particulier dans plusieurs classes de pathologies.

Chez l'animal, les anticorps monoclonaux LFA-1 se sont avérés efficaces contre le développement de l'arthrite rhumatoïde et avaient des propriétés inhibitrices face à la génération d'auto-anticorps contre l'ADN double brin dans le lupus [264]. De plus, ces mêmes anticorps monoclonaux utilisés seuls ou en combinaison avec des anticorps monoclonaux dirigés contre ICAM-1 ont été démontrés efficaces pour contrer le rejet lors de transplantation cardiaque allogène chez la souris [265]. Lorsque utilisé chez l'humain dans un contexte de prévention de rejet de greffe rénale, cet anticorps monoclonal s'est toutefois avéré plus efficace pour le rejet tardif que le rejet aigu ce qui lui confère une utilité modérée [266]. Par contre, dans le contexte du psoriasis, l'efalizumab (Raptiva,

Genentech) est prouvé comme efficace dans le traitement de cette maladie et est couramment utilisé en clinique [267].

Les anticorps monoclonaux dirigés contre ICAM-1 ont aussi été utilisés avec succès en clinique pour prévenir le rejet des greffes rénales [268]. Des oligonucléotides antisenses bloquant la synthèse de ICAM-1 au niveau de l'ARN messager ont aussi fait l'objet d'étude avec un succès modéré dans le rejet de transplantation rénale et dans la maladie de Crohn's [269].

#### *2.5.5.2 Les grands brûlés*

ICAM-1 a aussi été employé comme cible dans le traitement des grands brûlés. En effet lors d'une brûlure, la microcirculation est endommagée par les neutrophiles qui adhèrent à la membrane endothéliale par l'entremise de ICAM-1/LFA-1 et relâchent des médiateurs pro-inflammatoires. L'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre ICAM-1 chez les grands brûlés s'est avéré efficace pour accroître la guérison de plaie, possiblement suite à une réduction du dommage vasculaire et par conséquent, de la stase veineuse qui l'accompagne [270].

### **2.6. sICAM**

ICAM-1 existe aussi sous forme soluble circulante dans l'organisme (sICAM) aussi capable de se lier à LFA-1 [224]. On retrouve sICAM dans plusieurs compartiments du corps tels le sérum, le liquide cébrospinal, l'urine, le liquide bronchoalvéolaire ainsi que le liquide synovial [225-229]. La concentration circulante de cette molécule est

influencée par de nombreux médiateurs importants pour l'activité des Oc tel qu'illustré au tableau 2. Il existe toujours une controverse quant au mode de production de sICAM, des études rapportant que sa présence reflète l'expression membranaire de ICAM-1 qui lorsque clivé, devient sICAM [166, 168]. Par contre, d'autres groupes ont rapporté la présence d'un ARN messenger codant pour sICAM, suggérant ainsi un double mécanisme dans la génération de sICAM, possiblement dépendant du type cellulaire [169, 170]. Chez les Ob OA, notre équipe a démontré une régulation différentielle de ICAM-1 et de sICAM par TNF- $\alpha$ . Il semble en effet que chez l'Ob, TNF- $\alpha$  stimule à la fois la synthèse de sICAM de novo ainsi que le clivage de ICAM-1 par la MMP-9 (Shi et al, In press). La signification physiologique de ces deux voies de régulation pour la production de sICAM reste toutefois indéterminée. Il semble par contre que sICAM est sécrété par les Ob indépendamment de sa présence sur la membrane cellulaire. Dans un contexte d'activité ostéoclastique, sICAM pourrait exercer des rôles similaires soit à OPG (inhibition de l'activité des Oc), soit à sRANKL (stimulation de l'activité des Oc). Par contre ceci demeure purement hypothétique. Cet article est aussi joint en annexe pour le bénéfice du lecteur.

Au niveau physiologique, l'action de sICAM reste obscure. Dans certaines situations, il semble que sICAM et ICAM-1 exercent un rôle similaire tandis que dans d'autres, leurs actions semblent opposées. Par exemple, ICAM-1 et sICAM ont tous deux des propriétés angiogéniques tandis que dans les cellules épithéliales bronchiques, ICAM-1 favorise l'infectivité alors que sICAM la prévient [164, 165, 170-172]. Gho et al ont démontré l'activité angiogénique de sICAM à la fois *in vivo* et *in vitro* en associant

sICAM à la modulation de la migration des cellules endothéliales et la formation de la néovascularisation chez le poulet [171]. Puisque des niveaux accrus de sICAM sont décrits dans les pathologies autoimmunes, le rejet des greffes, l'angine, les infections virales et diverses formes de cancer, plusieurs croient que sICAM joue un rôle actif comme facteur angiogène dans les pathologies angiogéniques-dépendantes.

**Tableau 2. Facteurs influençant la concentration sérique de sICAM**

| INDUCTEURS          | INHIBITEURS     |
|---------------------|-----------------|
| TNF- $\alpha$       | IL-10           |
| IL-1                | TFG- $\beta$ 1  |
| IL-6                | Rhinovirus      |
| IFN- $\gamma$       | Insuline        |
| Angiotensine II     | Acides Gras n-3 |
| Acides Gras Saturés | Antioxydants    |
| Alcool              |                 |

Dans l'os l'action de sICAM est mal comprise, mais il est rapporté que le lien sICAM/LFA-1 est capable d'initier des signaux intracellulaires favorisant la production de médiateurs important dans le développement des Oc et la prolifération cellulaire [158]. Cependant, aucune étude ne s'est jusqu'ici penchée sur l'effet potentiel de sICAM dans le métabolisme osseux.

## 2.7. Apoptose

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est un processus nécessaire pour la fonction et le maintien des activités d'un organe, mais aussi pour l'élimination de cellules « anormales » de l'organisme. Ce processus contrôlé par divers médiateurs entraîne des changements cellulaires morphologiques qui conduisent à la destruction de la cellule et mènent éventuellement à la formation de corps apoptotiques rapidement phagocytés par les cellules avoisinantes. Ces changements impliquent la présence de divers ligands, récepteurs, enzymes et gènes dont l'action coordonnée permet un contrôle adéquat de ce processus. L'étape finale où la cellule est en phase d'apoptose active est caractérisée par la condensation de la chromatine, la modification de la membrane nucléaire, la fragmentation de l'ADN, la fragmentation des protéines, destruction de la membrane cellulaire et la formation de vésicules appelées corps apoptotiques.

Au niveau de l'os, l'équilibre entre la prolifération, la différenciation et la mort cellulaire des Oc, Ob et ostéocytes déterminent le nombre de cellules qui composent le squelette et par conséquent, la masse osseuse. Cette section couvrira les mécanismes généraux qui régulent le processus d'apoptose pour ensuite décrire la modulation de l'apoptose dans l'os ainsi que l'implication de ICAM et de sICAM dans ce processus.

### 2.7.1 L'apoptose et ses mécanismes de contrôle

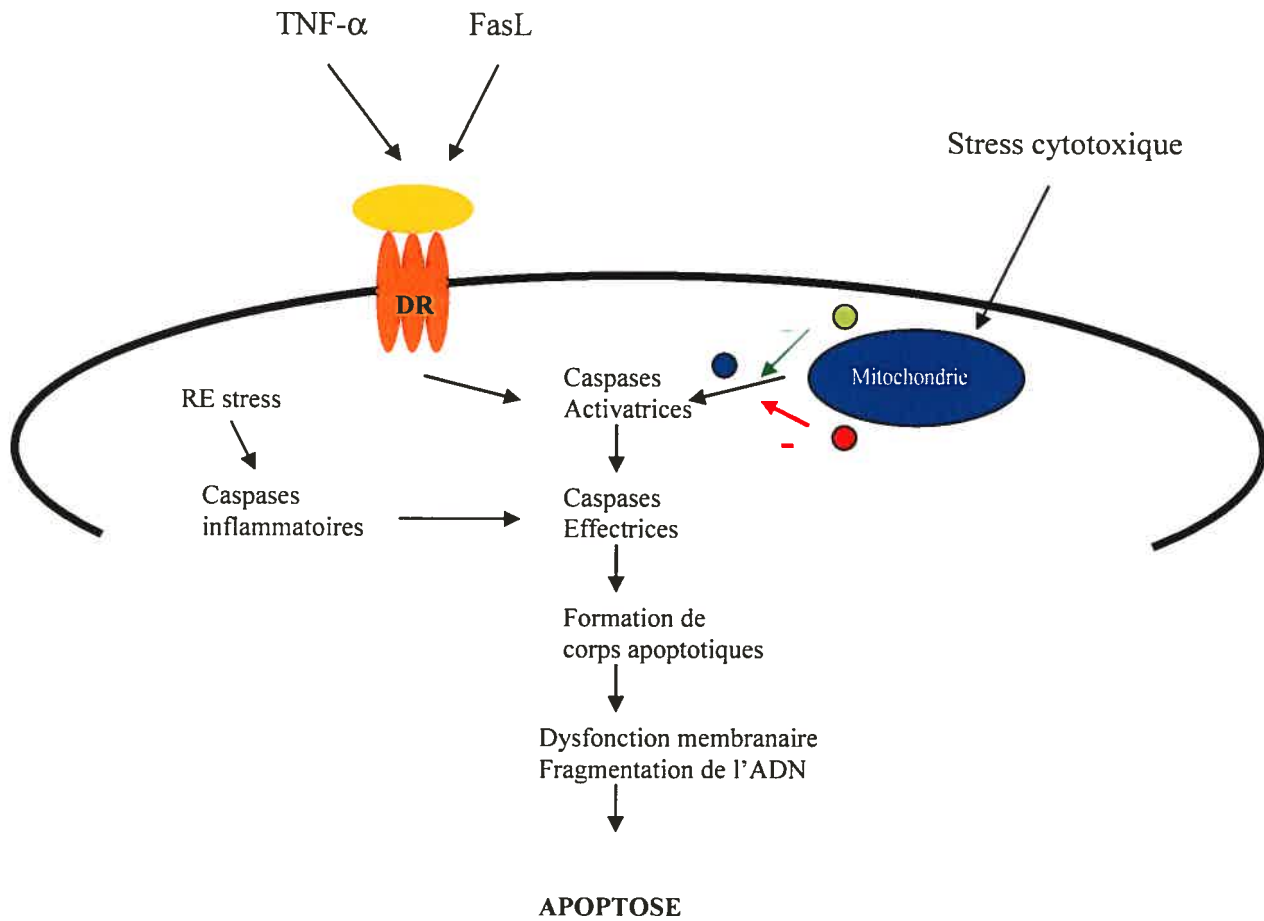
Deux voies principales peuvent induire l'apoptose : celle des récepteurs de la mort et celle médiée par la famille des protéines Bcl-2. Ces deux voies parallèles activent la

cascade des caspases, responsable des changements morphologiques spécifiques à l'apoptose (Figure 10).

Les récepteurs de la mort (DR) font partie de la famille des récepteurs TNF, en particulier les récepteurs TNF et CD95 (Fas/APO-1) [230]. TNF et le « TNF-related apoptosis inducing ligand » (TRAIL) qui se lie au DR5 ainsi que Fas ligand (FasL) qui se lie à Fas, sont capables d'initier le processus d'apoptose. Par contre, TNF peut aussi stimuler la voie du NF- $\kappa$ B, qui dans divers types cellulaires dont l'Oc, inhibe l'apoptose plutôt que de la stimuler [231].

La famille des protéines bcl-2 est quant à elle constituée d'environ 20 protéines pro- et anti-apoptotiques dont la proportion relative détermine la susceptibilité cellulaire aux signaux de la mort. Ce groupe de protéines affecte la perméabilité mitochondriale déclenchant ainsi la cascade des caspases suite à la relâche du cytochrome c des mitochondries [232, 233].

Une troisième voie est aussi décrite et implique les caspases dites inflammatoires. Cette cascade origine d'un stress subit au niveau du réticulum endoplasmique et qui est provoqué dans la grande majorité des cas par l'accumulation de protéines tronquées ou mal formées dans la lumière du réticulum endoplasmique ainsi que dans un débalancement calcique dans ce dernier. On retrouve cette cascade apoptotique dans une multitude de pathologies du système nerveux comme par exemple l'Alzheimer.



**Figure 10. Représentation générale de la cascade apoptotique.**

- Protéines anti-apoptotiques : Bcl-2, BxL
- Protéines pro-apoptotiques : Bax, Bak, Bok, BH3, Bim, Bik...
- Cytochrome C

DR : Récepteur de la mort

RE : Rétinaculum endoplasmique



**Table 3. Activité des différentes caspases.**

| Activatrices | Effectrices | Inflammatoires |
|--------------|-------------|----------------|
| Caspase-2    | Caspase-3   | Caspase-1      |
| Caspase-8    | Caspase-6   | Caspase-4      |
| Caspase-9    | Caspase-7   | Caspase-5      |
| Caspase-10   |             | Caspase-11     |
|              |             | Caspase-12     |
|              |             | Caspase-13     |
|              |             | Caspase-14     |

La voie finale commune de l'apoptose est celle des caspases. Il existe 14 caspases qui se retrouvent en phase inactive sous forme de procaspases. Chaque procaspase est capable à la fois d'autoactivation et peut activer d'autres caspases. Les caspases peuvent être classifiées selon leur activité en caspases activatrices, effectrices et inflammatoires (Table 3). La caspase-3 est la caspase effectrice principale qui engendre le signal final menant aux changements morphologiques de la cellule.

### 2.7.2 L'apoptose chez l'ostéoclaste

La machinerie apoptotique de l'Oc diffère quelque peu des autres types cellulaires de par la capacité que possède TNF- $\alpha$  de faciliter la survie cellulaire plutôt que l'apoptose par le biais de NF- $\kappa$ B [114, 234, 235]. Aussi, on retrouve chez l'Oc un grand nombre de membres de la famille Bcl-2. Parmi les membres de Bcl-2 identifiés chez l'Oc, on note entre autre une importante concentration de la protéine anti-apoptotique

Bcl-XI, dont l'expression est stimulée par la présence de RANKL, M-CSF et de TNF- $\alpha$  [236]. Une augmentation de la protéine Bcl-XI est associée avec une survie accrue de l'Oc [235].

Par contre, on retrouve un récepteur Fas fonctionnel à la surface des Oc capable d'engendrer la relâche du cytochrome c des mitochondries et donc également capable d'activer les caspases-3 et 9. La présence de mutations dans le récepteur Fas chez la souris cause une augmentation du nombre d'Oc qui se traduit par des souris au squelette ostéoporotique, suggérant donc que la voie de signalisation qu'engendre Fas pourrait être importante pour la détermination du nombre de cellules et de l'apoptose [237].

Plusieurs facteurs agissant sur le processus de maturation des Oc, telles la Vitamine D<sub>3</sub> et la PTH, affectent également la survie des Oc de façon indirecte en modifiant le ratio RANKL/OPG dans le milieu environnant [238]. D'autres facteurs comme IL-1, M-CSF, RANKL et TNF- $\alpha$  influencent l'interaction RANKL/RANK, ce qui mène éventuellement à l'activation de la caspase-9, donc à l'inhibition de la cascade apoptotique [100].

### 2.7.3. L'apoptose chez l'Ob

Le nombre d'Ob *in vivo* est fonction de leur maturation, de leur apoptose et du degré de différenciation en ostéocytes. L'activation des DR *in vitro* stimule l'apoptose chez l'Ob mais la contribution relative de TNF et de Fas *in vivo* demeure incertaine [239-241]. La plupart des facteurs de croissance comme IGF, FGF, TGF- $\beta$  et IL-6 inhibent l'apoptose [150, 242, 243]. Par contre, bien que BMP-2 stimule la formation osseuse, il est aussi capable de stimuler l'apoptose en favorisant la relâche de cytochrome c et l'expression des caspase-3, -6, -7 and -9 [244]. Puisque l'Ob exprime à sa surface les récepteurs TNF, TRAIL et Fas, TNF- $\alpha$  favorise l'apoptose de l'Ob par les voies classiques [99, 239]. Plusieurs autres facteurs sont impliqués à divers degrés dans la régulation de l'apoptose de l'Ob (Figure 11). Il existe aussi la présence de plusieurs interactions complexes qui affectent le degré d'apoptose au niveau de l'os et du même coup, affecte la balance entre le dépôt de la matrice osseuse et la résorption de l'os.

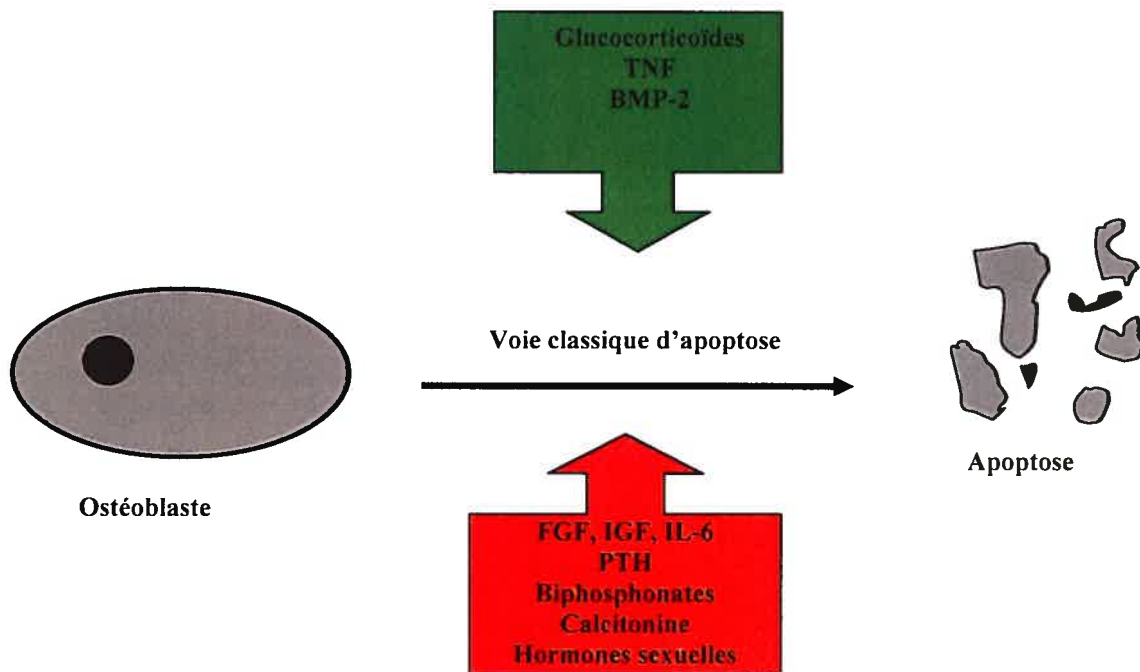


Figure 11. Actions de différents médiateurs sur la cascade apoptotique des ostéoblastes.



Inhibiteur de l'apoptose



Activateur de l'apoptose

#### 2.7.4 Rôles de ICAM-1 et de sICAM dans l'apoptose

Plusieurs évidences suggèrent que ICAM-1 et sICAM sont associés au processus d'apoptose. Qui plus est, la plupart des articles sur le sujet ont comme modèle l'Ob ou une pathologie osseuse tel le myélome multiple. Tanaka et al furent les premiers à démontrer dans l'Ob une capacité de prolifération plus faible en présence du phénotype ICAM-1<sup>+</sup> [6]. En effet, les Ob ICAM-1<sup>+</sup> ont une propension à être arrêtés en phase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> du cycle cellulaire. Cet arrêt du cycle cellulaire semble secondaire à l'action de p53 (par l'entremise de p21), qui sont eux aussi surexprimés dans l'Ob ICAM-1<sup>+</sup> [6, 245]. Il est bien connu que p53 exerce un rôle clé dans le contrôle du cycle cellulaire, le vieillissement cellulaire et l'apoptose [246-248]. De plus, c-Myc, qui est un important médiateur de l'arrêt du cycle cellulaire et de l'apoptose subséquente et Fas, une cible de p53, sont tous deux surexprimés dans les cellules ICAM-1<sup>+</sup> tandis que l'expression de la protéine *bcl-2* est inhibée dans ce phénotype cellulaire [6, 249]. Ces observations tendent donc à démontrer que l'Ob ICAM-1<sup>+</sup> arbore le phénotype apoptotique. Puisqu'il est démontré qu'il existe une expression accrue de ICAM-1 au niveau des membranes cellulaires de cellules sénéscentes et puisqu'il semble y avoir une association entre p53 et ICAM-1 dans le contrôle du vieillissement cellulaire, la molécule d'adhésion ICAM-1 semble par conséquent primordiale dans la régulation du cycle cellulaire et du contrôle de l'apoptose [245].

L'importance physiologique de ces observations est d'ailleurs bien illustrée par le modèle du myélome multiple (MM). Il existe une surexpression de sICAM et de ICAM-1

chez les patients atteints du MM et ayant une maladie active dans l'os [250]. De plus, les Ob ICAM-1<sup>+</sup> provenant de patients MM sont littéralement attaqués par les cellules malignes du MM engendrant alors l'apoptose des Ob par l'entremise de Fas-L [250]. Il appert que dans cette pathologie, ICAM-1 permet l'adhésion entre les cellules facilitant ainsi la transmission de signal apoptotique. De façon intéressante, la préincubation des cellules de MM avec sICAM *in vitro* bloque l'adhésion de ces cellules avec l'Ob et subséquemment, protège l'Ob contre l'apoptose. Ces études confirment ainsi l'importance de ces deux médiateurs dans le processus d'apoptose [251], mais ouvrent aussi la porte sur un ciblage thérapeutique potentiel de l'axe ICAM-1/LFA-1. En effet, en utilisant sICAM pour inhiber l'adhésion cellulaire médiée par ICAM-1, il est alors probable que la survie cellulaire se trouverait ainsi augmentée. Ceci permettrait un accroissement du dépôt de la matrice osseuse de par un nombre supérieur d'Ob, minimisant ainsi l'écart entre la formation et la résorption osseuse observées dans le MM actif.

## 2.8 Hypothèse générale et objectifs spécifiques

À la lumière des connaissances relevées dans la littérature, nous avons jugé important d'explorer certaines avenues pour clarifier l'action de ICAM-1 dans l'ostéoclastogénèse et préciser celle de sICAM. Tel que mentionné plus tôt, la présence de ICAM-1 à la surface cellulaire des Ob est primordiale dans le processus de formation des Oc. De plus, la présence de ICAM-1 chez les Ob semble déterminer un phénotype cellulaire particulier. Il confère à l'Ob une capacité à supporter l'ostéoclastogénèse et

semble favoriser l'expression des protéines impliquées dans les voies apoptotiques. Par contre, la seule action attribuée à ICAM-1 dans le processus de formation des Oc est la stabilisation cellulaire favorisant par le fait même l'interaction RANKL/RANK. Aucune étude ne s'est intéressée à l'expression de cette molécule dans diverses pathologies osseuses et les changements intracellulaires dans l'Ob suite à l'engagement de ICAM-1 sont mal compris (dans un contexte de formation des Oc). De son côté, la présence et l'action de sICAM dans le métabolisme des Oc n'ont, à notre connaissance, jamais été rapportés à ce jour, malgré plusieurs évidences indirectes laissant supposer que cette molécule pourrait être un joueur actif dans le processus d'ostéoclastogénèse. **L'hypothèse générale** de cet ouvrage est donc la suivante : ICAM-1 et sICAM exercent des rôles actifs dans le processus d'ostéoclastogénèse de par leur capacité respective à moduler les facteurs affectant la différenciation des Oc ainsi que la survie des Ob et des Oc.

**Les questions de recherche** sont les suivantes :

- 1) Si ICAM-1 est un joueur clé dans le processus de formation/activation des Oc : l'expression membranaire de ICAM-1 à la surface des Ob est-elle plus importante dans les pathologies avec remodelage osseux accru?
- 2) Si sICAM est important dans le processus d'ostéoclastogénèse : la concentration sérique de cette molécule est-elle influencée par le remodelage osseux accru?
- 3) Si ICAM-1 et sICAM exercent des rôles actifs dans le processus d'ostéoclastogénèse : leur présence influence-elle les facteurs de différenciation et de survie cellulaire des Ob et des Oc?

**Les objectifs spécifiques** seront les suivants :

- 1) Décrire le phénotype ICAM-1 à la surface des Ob dans l'OA, l'OP et chez les individus sains.
- 2) Relier le profil sérique de sICAM au remodelage osseux.
- 3) Démontrer que ICAM-1 et sICAM influencent la production des facteurs de différenciation et de survie chez l'Ob et l'Oc.



## **CHAPITRE 3 MATÉRIEL ET MÉTHODES**

Ce chapitre présente le matériel et les méthodes utilisées pour réaliser ce projet ainsi que les caractéristiques des patients inclus dans la partie expérimentale touchant les concentrations sériques de sICAM chez les patients normaux, ostéopéniques et ostéoporotiques. La présente section est subdivisée en fonction des articles.

### **3.1 ARTICLE 1 : EXPRESSION MEMBRANAIRE DE ICAM-1**

#### **3.1.1 Provenance des échantillons**

Les spécimens osseux utilisés proviennent de patients groupés en contrôle (aucune pathologie osseuse), patients avec OA ou patients souffrants d'OP. Dix-neuf (n=19) patients opérés pour l'implantation de prothèse de hanche et prothèse totale de genou (n=19) ayant comme indication chirurgicale l'OA, dix (n=10) patients opérés pour une fracture de la hanche secondaire à l'ostéoporose et onze (n=11) patients normaux (contrôle : crête iliaque de patients opérés pour une fusion lombaire secondaire à une sténose spinale (n=5) ou du condyle fémoral interne de donneurs d'organes vivants macroscopiquement exempts de pathologie articulaire (n=6)) ont été inclus dans cette étude. Les hôpitaux ayant fourni des échantillons sont : l'hôpital Maisonneuve-Rosemont, Sacré-Cœur, St-Luc, Hôtel-Dieu et Notre-Dame. Une fois l'os trabéculaire prélevé, les spécimens furent ensuite placés de façon stérile dans une solution Lactate Ringer et acheminés au laboratoire.

### 3.1.2 Préparation des échantillons

Sur réception, l'os est coupé en petits morceaux d'environ 2 mm<sup>2</sup> à l'aide d'un bistouri après avoir été nettoyé cinq fois dans du Ham F12/Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM/F12; Sigma, St. Louis, MO). Chaque lavage comportait un cycle de vortex pour 10 secondes puis le surnageant était aspiré. Pour libérer les restes de cellules de moelle osseuse, les morceaux d'os étaient ensuite soumis à une digestion séquentielle par la collagénase 1 mg/ml (*Clostridium Hystolyticum*, Type I ; Sigma), avec trypsine 0.5 mg/ml dans un milieu BGJb sans sérum contenant 2mM EDTA pour favoriser la chélation de calcium. La digestion a été faite à 37<sup>0</sup>C à deux reprises pour 20 minutes puis pour 4 heures dans un troisième temps. Après lavage avec le même milieu, les morceaux d'os ont été placés dans un contenant de culture de 25 cm<sup>2</sup> (Falcon, Lincoln Park, NJ) avec un milieu de culture standard composé de BGJb + 20% de sérum foetal bovin (FBS) (Wisent, St. Bruno, Québec, Canada) + 1% pénicilline/streptomycine (PS) et 50 µl d'acide ascorbique.

### 3.1.3 Culture cellulaire

Les morceaux d'os ont été incubés à 37<sup>0</sup>C sous 95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub> et le milieu changé tous les deux jours. Lorsque les Ob ont commencé à migrer hors de l'os (après 7-10 jours), le milieu a été changé pour BGJb + 10% FBS + 1% PS + 50 µl d'acide ascorbique et les Ob incubés jusqu'à confluence (environ 6 semaines). Seules les cellules de premier passage ont été utilisées pour cette étude. Les Ob ainsi récupérés conservent leurs caractéristiques métaboliques *in vivo* dans des cultures *in vitro* comme déjà rapporté [252].

### 3.1.4 Récupération des cellules

Lorsque confluents, les Ob ont été décollés des contenants de culture avec 5 ml de Splittix-B (Sigma), placés dans un eppendorf, puis centrifugés (5000 rpm; 2 minutes; 4°C) et le culot resuspendu dans le milieu de culture BGJb + 10% FBS + 1% PS + 50 µl d'acide ascorbique (5 ml).

### 3.1.5 Évaluation de l'expression membranaire de ICAM-1

Deux méthodes différentes ont été utilisées et comparées pour évaluer l'expression de ICAM-1 à la surface des Ob. La première consiste en une séparation sur colonne magnétique (Miltenyi Biotech, Auburn, CA). Les Ob furent incubés avec les billes magnétiques portant à leur surface des anticorps spécifiques pour ICAM-1 (Miltenyi Biotech) pour 20 min à 4°C puis passer sur colonne magnétique pour séparation en fraction Ob ICAM-1<sup>+</sup> et en Ob ICAM-1<sup>-</sup>. La fraction négative fut récoltée comme éluent de la colonne alors que la fraction positive fut récoltée après passage sous pression à l'aide d'un piston. Chaque fraction fut comptée à l'aide d'un hémocytomètre et exprimée sous forme de pourcentage.

La seconde méthode consiste en une technique d'immunocytologie développée par notre laboratoire. Une fois les Ob récupérés, les cellules furent placés sur Labtek puis incubées 24h pour laisser adhérer (milieu DMEM/F12 + 50 µl d'acide ascorbique + 0.1% de FBS). Les Ob furent ensuite lavés 2 fois avec du PBS puis fixés dans une solution de paraformaldéhyde 2%, 15 min à 20°C, avant d'être lavés de nouveau. Les Ob furent ensuite incubés en présence d'anticorps anti-ICAM-1 monoclonaux (Dako, Mississauga, ON, Canada) for 30 minutes à 20°C. Un second anticorps anti-IgG conjugué à la

peroxydase fut ensuite ajouté après lavage au PBS pour 30 min à 20°C pour détection des Ob ICAM-1<sup>+</sup> avec la coloration DAB (1 min). Les lames furent ensuite lavées à l'eau puis contre-colorées avec l'hématoxyline (Sigma) suivi de cycles de déshydratation à l'alcool à des concentrations progressives (50%, 70% et 100%, 5 min à 20°C). Les plaques furent alors scellées au permount/toluène puis le pourcentage d'Ob ICAM-1<sup>+</sup> compté au microscope.

### **3.1.6 Détermination de la production de PGE<sub>2</sub>**

La quantité de PGE<sub>2</sub> produite dans le milieu a été mesurée en utilisant une méthode d'immunoessai enzymatique achetée chez Cayman Chemical (Ann Arbor, MI). Cette technique est basée sur la compétition entre PGE<sub>2</sub> et un traceur (PGE<sub>2</sub>-acétylcholinestérase) pour une quantité limitée d'anticorps monoclonal dirigé contre PGE<sub>2</sub>. La sensibilité de la méthode est de 9 pg/ml et la fiabilité de la technique se situe entre 10 et 1000 pg/ml, basée sur une transformation logarithmique. La quantité de PGE<sub>2</sub> dans la membrane cellulaire des Ob n'a pas été évaluée puisque la majorité de la production de ce médiateur est immédiatement relâché dans le milieu [253]. Les manipulations ont été faites en duplicata en accord avec les recommandations du manufacturier.

### **3.1.7 Détermination de la production de IL-6**

Les niveaux de production de IL-6 dans le milieu de culture ont été déterminés en utilisant une technique ELISA sandwich en phase solide. Le matériel a été acheté chez R&D Systems (Minneapolis, MN). La sensibilité de la technique est de 10 pg/ml avec

une zone de fiabilité se situant entre 39.1 et 2500 pg/ml. Chaque ELISA a été fait en duplicata en accord avec les recommandations du manufacturier.

### **3.1.8 Analyse statistique**

Tous les résultats sont exprimés comme moyenne  $\pm$  l'erreur standard à la moyenne (SEM). L'analyse statistique sur les moyennes a été faite en pratiquant un test U de bilatéralité de Mann-Whitney et le seuil critique de signifiante statistique a été fixé par la valeur de  $p < 0.05$ . La distribution des spécimens en tant que faibles et fortes expression fut analysée avec le Fischer's exact test. Les corrélations entre les niveaux de IL-6, PGE<sub>2</sub> et l'expression de ICAM-1 furent évaluées par régression linéaire.

## **3.2 ARTICLE 2 : ÉVALUATION DES CONCENTRATIONS SÉRIQUES DE sICAM CHEZ LES PATIENTS OSTÉOPOROTIQUES**

### **3.2.1 Population**

Au total, 111 femmes postménopausées sous hormothérapie de remplacement (HRT) sont incluses dans cette étude. Il s'agit de patientes déjà suivie dans une clinique d'OP ou de patientes référées par leur médecin de famille. Au début de l'étude, un questionnaire médical ainsi qu'un examen clinique fut réalisé. Les patientes avec antécédents de problèmes cardiaques de type ischémique, avec maladies inflammatoires de tous genres, avec cancer ainsi que les patientes utilisant la cigarette furent exclues sur la base de plusieurs articles faisant état de variations de la concentration sérique de sICAM lorsque les facteurs ci-haut mentionnés sont présents [254-257]. Toutes les

participantes ont donné leur consentement de façon éclairée en accord avec le protocole d'Helsinki.

### **3.2.2 Ostéodensitométrie**

La mesure de la densité osseuse (BMD) a été réalisée en utilisant la technique DEXA disponible localement en utilisant les mêmes protocoles. Les patientes furent groupées en fonction de la plus faible mesure de BMD rapportée soit à la hanche, soit au fémur. Les patientes avec BMD normales ( $> -1$  déviation standard (SD)), ostéopéniques (OPE) ( $-1$  to  $< -2.5$  SD) et OP ( $-2.5$  et plus SD) furent groupées ensemble selon les critères de la World Health Organization. Un 4<sup>ième</sup> groupe comprenant les patientes avec un diagnostic préalable d'OP mais sous traitement biphosphonates pour un minimum de 6 mois (alendronate 70 mg oral chaque semaine) au moment de débiter l'étude fut formé dans le sous-groupe ostéoporose traitée. Les patientes sous traitement avec un autre biphosphonate ou pour moins de 6 mois furent exclues. Un prélèvement sanguin standardisé fut conduit chez chaque patiente et la concentration sérique de sICAM et de TRAP 5b déterminée par technique ELISA.

### **3.2.3 Détermination des niveaux sériques de sICAM**

Les niveaux sériques de sICAM furent mesurés à l'aide d'un kit Duo Set ELISA (R&D, Minneapolis, MN). La sensibilité de la technique est de 15.6 pg/ml (15.6 – 1000 pg/ml). Les expériences furent réalisées en accord avec les recommandations du manufacturier. L'absorbance fut mesurée avec un lecteur de plaque (microELISA Vmax photometer; Molecular Devices Corp.).

### **3.2.4 Détermination des niveaux sériques de TRAP 5b**

La production de TRAP 5b sécrétée par les Oc a été mesurée dans le sérum des patientes par technique ELISA (Suomen Bioanalytiikka Oy, Turku, Finland). Ce kit possède un seuil de détection de 0.06 U/l. L'absorbance fut mesurée telle que décrit à la section 3.2.3.

### **3.2.5 Analyse statistique**

Tous les résultats sont exprimés comme moyenne  $\pm$  l'erreur standard à la moyenne (SEM). L'analyse statistique sur les moyennes a été faite en pratiquant un test U de bilatéralité de Mann-Whitney et le seuil critique de signifiante statistique a été fixé par la valeur de  $p < 0.05$ . Toutes les expériences ont été réalisées en duplicata.

## **3.3 ARTICLE 3 : EFFETS DE LA PRÉSENCE DE sICAM SUR LA FONCTION ET LA DIFFÉRENCIATION DES OSTÉOCLASTES**

### **3.3.1 Provenance et isolement des monocytes humains**

Les monocytes humains ont été isolés du sang périphérique de 5 sujets sains (age 31 à 38 ans). Le sang fut dilué 1:1 avec du  $\alpha$  minimal essential medium (MEM; Sigma), puis 3 volumes de mélange de sang furent déposés sur 1 volume de Ficoll-paque (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). Après centrifugation à température pièce pour 20 min à 693g, les cellules de l'interface furent resuspendues dans le MEM et recentrifugées à 20°C pour 10 min à 510g. Les cellules ont ensuite été incubées 20 min à

4°C avec les billes magnétiques portant à leur surface des anticorps spécifiques pour CD14 (Miltenyi Biotec) et séparées sur colonne magnétique. La fraction CD14<sup>+</sup> fut recueillie, comptée à l'hémocytomètre et suspendue dans du MEM. 2x10<sup>6</sup> cellules mononuclées du sang (PBMC) dans du MEM ont été ajoutées dans des plaques de 12 puits ou 1x10<sup>6</sup> PBMC placées dans une plaque 16 puits BD BioCoat™ Osteologic™ Bone Cell Culture System plate (BD Biosciences) pour 2h à 37° C sous 5% CO<sub>2</sub> puis lavées avec le milieu pour retirer les cellules non adhérentes. Les PBMC ont été cultivées dans du MEM supplémenté de sérum bovin 10%, de 100 U/ml de pénicilline et 100g/ml de streptomycine (Wisent, St.Bruno, QC, Canada; MEM/FBS/PS) 37° C sous 5% CO<sub>2</sub>. Le milieu fut changé tous les 3 jours et divers médiateurs ajoutés.

### **3.3.2 Production des facteurs de différenciation des ostéoclastes produits par les pré-ostéoclastes et les ostéoblastes**

Les monocytes isolés sur les plaques de 12 puits ont été stimulés avec du M-CSF (50 ng/ml) pour 5 jours avant l'addition de sICAM (100 ng/ml ou 1µg/ml) ou sRANKL (30 ng/ml) avec ou sans M-CSF (50 ng/ml) pour 16h à 37°C sous 5% CO<sub>2</sub>.

Les Ob humains utilisés proviennent de l'os trabéculaire de patients opérés pour une prothèse totale de genou secondairement à l'OA (n=6). Les Ob ont été isolés tels que décrit à la section 3.1.2. Les morceaux d'os trabéculaire furent cultivés dans des contenants de culture de 25 cm<sup>2</sup> (Corning, NY, USA) dans du BGJb/10% FBS/1% PS (changé tous les 3 jours) jusqu'à confluence (28-35 jours). Une fois confluent, les Ob furent stimulés avec 10 ng/ml de TNF-α pour 16h pour maximiser l'expression



membranaire de ICAM-1. Après lavage avec le milieu de culture, les Ob furent stimulés avec sICAM (100 ng/ml ou 1 µg/ml), anticorps monoclonal Anti-ICAM-1 (mAb; Dako, Mississauga, ON, Canada) (100 ng/ml or 1 µg/ml) ou Anti-ICAM-1 mAb (1 µg/ml) lié à un second anticorps (anti-Fc mAb 500 ng/ml; Dako).

La production des facteurs de différenciation des OC fut ensuite vérifiée par transcription inverse et polymérisation en chaîne (RT-PCR). L'ARN total a été extrait des pré-OC ou des Ob à l'aide du TRIzol (Invitrogen life technologies) selon les recommandations du manufacturier. Au TRIzol fut ajouté du chloroforme et la couche supérieure aqueuse fut récupérée après vortex. L'ARN fut ensuite extrait par précipitation suite à l'ajout d'isopropanol. Le culot fut ensuite lavé à l'éthanol 70%, resuspendu dans de l'eau exempte de RNase et la quantité d'ARN récupéré analysé par spectrophotomètre. L'ARN fut congelé à -80°C jusqu'à expérimentation.

La synthèse de cADN et l'amplification par RT-PCR a été réalisée en utilisant 1 µg d'ARN total et le kit SuperScript one-step RT-PCR (Invitrogen life technologies). Les oligonucléotides et les conditions expérimentales sont résumés au tableau 1. Les produits du PCR furent ensuite analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1.2% dans un tampon TRIS-borate-EDTA. Des mesures semi-quantitatives des produits de réaction ont été réalisées en mesurant la densité des bandes à l'aide du système de traitement d'image G-image 2000 (Canberra Packard Canada, Mississauga, ON, Canada). Les résultats sont exprimés en unités relatives.

### **3.3.3 Co-cultures ostéoblastes et pré-ostéoclastes**

Les Ob stimulés avec 10 ng/ml de TNF- $\alpha$  pour 16h furent ajoutés au pré-OC préalablement incubés avec du M-CSF 50 ng/ml pour 72h sur des plaques de 12 puits ou sur les plaques de 16 puits BD BioCoat™ Osteologic™ Bone Cell Culture System dans un ratio 1:10. Les puits furent ensuite lavés avec le milieu de culture pour retirer les cellules non-adhérentes puis incubés avec ou sans M-CSF (50 ng/ml), sICAM (100 ng/ml or 1  $\mu$ g/ml), AntiCD54 mAb (1  $\mu$ g/ml) ou sRANKL (30 ng/ml). Les milieux furent changés tous les 3 jours et le surnageant conservé pour expériences ultérieures.

### **3.3.4 Évaluation de la différenciation des ostéoclastes**

Après 20 jours de co-incubation avec divers médiateurs, la différenciation des OC fut vérifiée en dosant la TRAP 5b dans le surnageant des plaques de culture BD BioCoat™ Osteologic™ Bone Cell Culture System plate (n=8; voir section 3.2.4).

### **3.3.5 Évaluation de la fonction des ostéoclastes**

Pour évaluer la capacité des cellules à résorber l'os, nous avons évalué la surface osseuse résorbée sur les plaques BD BioCoat™ Osteologic™ Bone Cell Culture System. Après 20 jours de co-culture, les cellules furent lavées 3 fois pour 5 min avec du NH<sub>4</sub>OH 1N puis les plaques rincées au PBS. La surface résorbée fut déterminée en utilisant les services de Microst Automated Image Analyzer (Millenium Biologix, Mississauga, ON, Canada). Les spécimens furent évalués de façon automatique puis les résultats confirmés

par évaluation microscopique. Les résultats furent exprimés en pourcentage de substrat résorbé.

### 3.3.6 Viabilité cellulaire

Des monocytes humains furent isolés et placés en culture sur des plaques de 12 puits dans du MEM/FBS 10% et incubés pour 10 jours avec M-CSF (50 ng/ml) et sRANKL (30 ng/ml) pour stimuler leur différenciation en pre-Oc (5% CO<sub>2</sub> at 37<sup>0</sup>C). Le milieu fut changé 2 fois par semaine et les médiateurs ajoutés. Au jour 10, les pré-Oc furent incubés pour 24h dans un milieu sans médiateur. Au jour 11, une concentration variable de sICAM fut ajoutée au milieu pour 24h (100 ng/ml à 1000 ng/ml). Les Ob furent quant à eux incubés 16h dans du BGJb +10% FBS +1% PS (5% CO<sub>2</sub> at 37<sup>0</sup>C) sur des plaques de 12 puits avant l'ajout de concentrations croissantes de anti-ICAM-1 mAb pour 24h. À la fin des périodes d'incubation avec sICAM et anti-ICAM-1 mAb, un test MTT fut fait. Les pré-Oc et les cultures d'Ob furent lavées avec du PBS puis 500µl de milieu de culture contenant 50µl de réactif MTT furent ajoutés pour 1h (5% CO<sub>2</sub> at 37<sup>0</sup>C) avant la mesure de l'absorbance à une longueur d'onde de 440 nm. Chaque condition fut répétée 5 fois (n=5), chaque expérience étant réalisée avec le sang d'un donneur.

### 3.3.7 Analyse statistique

Tous les résultats sont exprimés comme moyenne  $\pm$  l'erreur standard à la moyenne (SEM). L'analyse statistique sur les moyennes a été faite en pratiquant un test U de bilatéralité de Mann-Whitney et le seuil critique de signifiante statistique a été fixé par la valeur de  $p < 0.05$ . Toutes les expériences ont été réalisées en duplicata.

## CHAPÎTRE 4 RÉSULTATS

Les résultats sont présentés sous forme d'article dans leur format original. Le premier article est publié dans le journal *Bone* (35: 463-470; 2004) et s'intitule « Expression of ICAM-1 by osteoblasts in healthy individuals and in patients suffering from osteoarthritis and osteoporosis ». Le second, intitulé « sICAM serum levels are increased in osteoporotic patients » sera soumis sous peu au journal *Climacteric*. Le troisième article intitulé « sICAM increases bone resorption in vitro » sera soumis au *Journal of Bone and Mineral Research*. Pour placer les résultats dans leur contexte, un quatrième article intitulé « Involvement of ICAM-1 in bone metabolism: a potential target in the treatment of bone diseases? » et publié dans la revue « *Expert Opinion in Biological Therapy*, 5 (3) : 313-320; 2005 » est ajouté.

**4.1 ARTICLE 1: Bone 2004; 35 (2): 463-470.**

**Expression of ICAM-1 by osteoblasts in healthy individuals and in patients suffering from osteoarthritis and osteoporosis**

<sup>1</sup>Patrick Lavigne, <sup>1</sup>Mohamed Benderdour, <sup>2</sup>Daniel Lajeunesse, <sup>1</sup>Qin Shi and <sup>1,2</sup>Julio C. Fernandes\*

<sup>1</sup>Orthopaedics Research Laboratory, Department of Orthopaedics, Centre hospitalier Sacré-Coeur, Montréal, Québec, Canada

<sup>2</sup>Osteoarthritis Research Unit, Department of Orthopaedics, Centre hospitalier de

<sup>1</sup>Université de Montréal-Hôpital Notre-Dame, Montréal, Québec, Canada

**Tel:** (514) 338-2222 ext. 3279

**Fax:** (514) 338-2694

**Email:** [REDACTED]

\*To whom correspondence should be addressed

Orthopaedics Research Laboratory, Department of Orthopaedics, Centre hospitalier Sacré-Coeur, 5400 boul. Gouin Ouest, Montréal, Québec, Canada, H4J 1C5

**Short title:** ICAM-1 expression in different bone pathologies



**Key words: ICAM-1, bone, osteoporosis, osteoarthritis, osteoblasts, cytokines**



## ABSTRACT

**Objectives:** To describe the pattern of expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) at the surface of human osteoblasts (Ob) recovered from normal (control), osteoporotic (OP), and osteoarthritic (OA) bone. To relate ICAM-1 expression in OA Ob with interleukin-6 (IL-6) and prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) production.

**Materials and methods:** Trabecular bone specimens were taken from patients suffering from OA of the hip (n=19) or knee (n=19) or from hip fracture caused by osteoporosis (n=10). Control bone specimens came from the posterosuperior iliac crest (n=5) and from the femoral condyle of organ donors (n=6). Bone explants were digested with collagenase and cultured. Ob were obtained after 6 weeks. ICAM-1 expression was studied by immunocytochemistry. IL-6 and PGE<sub>2</sub> were evaluated by standard ELISA.

**Results:** Average ICAM-1 expression was different between control and OP bone ( $p < 0.02$ ). Separation of specimens into high and low ICAM-1 expression showed a significant difference between high and low ICAM-1 expressors. The distribution of specimens after subclassification into high or low ICAM-1 expression groups revealed only 18.2% of patients in the high expression group for the controls, compared to 70% for OP bone ( $p < 0.03$ ), 52.6% for hip OA and 47.4% for knee OA. IL-6 and PGE<sub>2</sub> levels in OA Ob from both groups were found to be significantly elevated with high ICAM-1 expression compared to low ICAM-1 expression.

**Conclusion:** The results show that ICAM-1 expression in human bone seems to be pathology-dependent and correlates with IL-6 and PGE<sub>2</sub> production, of at least in OA individuals. This implies that ICAM-1 could discriminate functionally different populations of Ob and possibly alter the clinical evolution of the disease.

## INTRODUCTION

Bone homeostasis is maintained by various mediators regulating the fine balance between bone formation and bone resorption. Dysregulation of either of these 2 processes involving osteoblasts (Ob) and/or osteoclasts (Oc) may lead to bone diseases.

The importance of cellular interactions between Ob and Oc in osteoclastogenesis has been described in various studies<sup>10,19,35-38</sup> and multiple adhesion molecules are found to be expressed on the Ob surface, namely, intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1; CD54), vascular cellular adhesion molecule 1 and leukocyte family antigen 3<sup>36</sup>. Of these, ICAM-1 is expressed either as a transmembrane protein at the surface of different cell types or as a soluble form (sICAM) in various body fluids. The exact physiological relevance and production mechanisms of sICAM are not clearly understood so far<sup>1,4,8,13,28,31,39</sup>. On the other hand, transmembranar ICAM-1 is recognized to be a critical mediator of inflammation, allowing transendothelial migration of leukocytes, activation of T-cells, adhesion of antigen-presenting cells to T-lymphocytes, microbial pathogenesis and signal transduction pathways through outside-in signalling events<sup>12</sup>. Its expression is important in a variety of inflammatory disorders and conditions affecting pulmonary, cardiovascular and gastrointestinal systems as well as autoimmunity<sup>5,6,15,29,33,34,40,41</sup>. The presence of ICAM-1 in the synovium of rheumatoid arthritis (RA) and osteoarthritis (OA) patients was shown to be higher than normal<sup>9</sup>, and a clinical trial testing the utility of anti-CD54 monoclonal antibody in the treatment of RA patients reported rapid clinical improvement<sup>16</sup>.

Studies of osteoclastogenesis in co-culture systems of Ob and pre-osteoclastic cells have revealed that blocking the cellular interactions mediated through ICAM-1 by



anti-CD54 monoclonal antibodies reduced Oc formation *in vitro*<sup>10,26,35</sup> These investigations have confirmed the pivotal role of ICAM-1-expressing Ob in the differentiation of precursor cells to Oc. Furthermore, it was postulated that the high affinity adhesion of Ob and Oc precursors could facilitate the interaction of the RANK/RANKL system, thereby leading to a shift in bone homeostasis toward resorption<sup>26</sup>. However, ICAM-1 expression at the Ob surface in normal and pathological bone has not been described in humans so far.

Since ICAM-1 expression can be stimulated by proinflammatory mediators in various cell lines<sup>2,3,31,39</sup>, and because ICAM-1 seems to play an important role in Oc recruitment, we hypothesized that its expression would be higher in bone pathologies exhibiting inflammation and high Oc activity. In this study, we assessed whether a particular pattern of ICAM-1 expression at the surface of human Ob originating from normal, healthy individuals and patients suffering from OA or osteoporosis (OP) could be identified and related to Ob metabolic activity.

## MATERIALS AND METHODS

### *Patient population*

The bone specimens in this study came from patients suffering from OA of the hip (n=19) or knee (n=19) undergoing primary hip (THA) or knee (TKA) replacement secondary to advanced OA disease, and from patients with a hip fracture secondary to OP (n=10) undergoing prosthetic hip replacement. Control bone specimens came from the iliac crest of patients being operated for posterior spinal fusion secondary to spinal stenosis (n=5) or from the distal medial femoral condyle of healthy organ donors (n=6).

Trabecular bone specimens were collected from the proximal femur during THA and from the medial condyle of the distal femur during TKA. The iliac crest trabecular bone specimens used as control were taken as part of graft material from the posterosuperior iliac crest (IC graft). The specimens autopsy were harvested from the medial femoral condyle after making sure that the knee was macroscopically free of OA and OP.

### ***In vitro Ob culture***

Ob cultures were prepared according to previously-described methods<sup>21</sup>. Ob retain their *in vivo* metabolic characteristics in *in vitro* culture, and their metabolic activity can be studied under these conditions, as shown previously<sup>11,21,35</sup>. Only first passage cells were used in our experiments.

Briefly, the bone samples were cut into small pieces (2 mm<sup>2</sup>) prior to their sequential digestion (3 times) with collagenase (*Clostridium histolyticum*, Type 1; Sigma, St. Louis, MO) at 1 mg/ml and trypsin at 0.5 mg/ml in BGJb media without serum (Sigma) and containing 2 mM EDTA to promote extracellular calcium chelation. Digestion was performed at 37<sup>0</sup>C, twice for 20 min, and once for 4 h. This removed both adherent and remaining bone marrow cells from the bone pieces. After washing with the same medium, the digested bone pieces were put in 25 cm<sup>2</sup> plastic culture dishes (Falcon, Lincoln Park, NJ) and covered with BGJb medium containing 20% fetal bovine serum (FBS) (Wisent, St. Bruno, Quebec, Canada), 1% penicillin/streptomycin and 50 µl/ml ascorbic acid. This medium was changed every 2 days until cell growth appeared around the explants (usually 10 days after collagenase digestion). The culture medium was then replaced with fresh media containing 10% FBS until the cells reached confluence (6

weeks). They were then split once at high density (50,000 cells/cm<sup>2</sup>) and some of them were analyzed for surface ICAM-1 expression.

### ***Evaluation of transmembranar ICAM-1 expression***

ICAM-1 expression on the Ob surface was assessed by 2 methods that were compared for their variability. The first method consisted of high gradient magnetic separation columns (Miltenyi Biotech, Auburn, CA) deployed according to the manufacturer's specifications. Briefly, the cells were incubated with MACS CD54 MicroBeads (Miltenyi Biotech) for 20 min at 4°C and passed through MACS magnetic separation columns. The cell suspension was collected as the negative fraction after washing the columns. ICAM-1+ cells were flushed out and collected, using the plunger supplied. Both fractions were counted in a hemocytometer and expressed as percentages.

The second method consisted of an immunocytology protocol that we developed. Cells were recovered from Labtek after 24 h and washed 2 times for 5 min at room temperature (RT) with PBS. They were then fixed with a solution of paraformaldehyde 2% for 15 min at RT and washed again twice for 5 min with PBS before incubation with CD54 monoclonal antibody (mAb; Dako, Mississauga, Ontario, Canada) for 30 min at RT. An anti-mouse IgG peroxidase conjugate was added for 30 min of incubation at RT before detection with DAB coloration of the slides (generally 1-2 min). The slides were washed with water, and then counter-colored with hematoxylin (Sigma), followed by dehydration with successive concentrations of alcohol and toluene (50, 70 and 100%; 5 min at RT). They were sealed with permount/toluene, and the percentage of ICAM-1-expressing cells was evaluated under light microscopy.

### ***Measurement of PGE<sub>2</sub>***

The amount of PGE<sub>2</sub> released into the medium was assessed with a PGE<sub>2</sub> enzyme immunoassay kit from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI). This assay is based on competition between PGE<sub>2</sub> and a PGE<sub>2</sub>-acetylcholinesterase conjugate (PGE<sub>2</sub> tracer) for a limited amount of PGE<sub>2</sub> monoclonal antibody. The sensitivity of the method was 9 pg/ml, and the working range was between 10 and 1,000 pg/ml, based on logarithmic transformation. The majority of PGE<sub>2</sub> synthesized by Ob is immediately released into the medium rather than stored in the cell layer<sup>27</sup>. For this reason, intracellular PGE<sub>2</sub> was not examined. Absorbance was measured in the microELISA Vmax photometer (Molecular Devices Corp., Menlo Park, CA).

#### ***Measurement of IL-6***

IL-6 was measured in the culture medium by specific, solid-phase, sandwich ELISA with a kit purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN). Assay sensitivity in the ELISA plates was 10 pg/ml for IL-6, and the recommended range was 39 to 2,500 pg/ml. Each ELISA was performed in duplicate according to the manufacturer's specifications. Absorbance was measured by microELISA Vmax photometer (Molecular Devices Corp.).

#### ***Statistical analysis***

The results are expressed as means  $\pm$  SEM. Assays were performed in duplicate. The data were analyzed statistically by the 2-tailed Mann-Whitney U-test. The distribution of specimens in the high and low expression groups was analyzed by Fischer's exact test. Correlations between IL-6 and PGE<sub>2</sub> levels and ICAM-1 expression were analyzed statistically by linear regression. P-values <0.05 were considered significant.

## RESULTS

After digestion with collagenase, the cells began to migrate out of the explants after 10 to 14 days of culture. At 5 to 6 weeks of culture, they became confluent and ICAM-1 expression at the Ob surface was verified.

We first compared 2 techniques for quantification of ICAM-1 expression, one using standard high gradient magnetic separation columns and the other immunocytology, which is faster and less cell-consuming. Seven specimens were tested in triplicates and comparative results were obtained for both techniques (mean 55.27% for immunocytology compared to 50.22% for magnetic separation; not significant; see Figure 1). When taken 1 by 1, the largest difference observed between ICAM-1 expression on the same sample was 10.2%, and the average difference was 4.6%. Since our results were comparable with these 2 techniques, we employed the immunocytology approach for practical reasons to evaluate ICAM-1 expression in the remaining experiments.

### *ICAM-1 expression on Ob*

Specimens were initially taken from 5 groups of patients, and ICAM-1 expression was verified at the Ob surface. Specimens from normal knees and IC grafts were grouped together (n=11) since no significant difference was found in their respective ICAM-1 expression (35% and 40%). As shown in Figure 2, average ICAM-1 expression was 37.5% in the control group, while that of the hip OA, knee OA and OP groups was 48.6%, 49.0% and 56.6%, respectively. Although there was a net trend for the controls to

express less ICAM-1 than the other groups, only the OP group presented a significant difference in ICAM-1 expression compared to control values ( $p < 0.02$ ).

When taken 1 by 1, Ob obtained from a specimen within a group tended to either highly or weakly express ICAM-1 at their surface and we noted that the calculated mean did not reflect the observed situation. Therefore, depending on their ICAM-1 expression, specimens could be divided into 2 categories: those that had ICAM-1 expression superior to the group's average subclassified into the high ICAM-1 expression group, and specimens with ICAM-1 expression less than the group's average subclassified into the low ICAM-1 expression group (Figure 3). This subclassification allows a more accurate description of the ICAM-1 expression and was used to discriminate metabolic activity of Ob in earlier studies<sup>22,27</sup>. Once separated into high or low ICAM-1 expression (Figure 4), our control group showed average ICAM-1 expression of 73.3% and 34.3% in the high and low expression groups respectively ( $p < 0.01$ ), with only 2 specimens included in the high expression group. ICAM-1 expression was similar in the hip and knee OA groups: respectively, ICAM-1 expression was 67.1% and 70.3% in the high groups, and 28.2% and 29.8% in the low groups. Statistical analysis showed significant differences between the high and low means within the same group ( $p < 0.001$  and  $p < 0.0001$  for hip and knee OA, respectively). The OP group showed an average expression after subgroup classification of 66.2% and 33.8% for the high and low subgroups respectively ( $p < 0.01$ ). Overall, average ICAM-1 expression in the high and low expression groups was similar between subject groups and could not discriminate between OA and OP.

Figure 5 reports the distribution of high and low ICAM-1 expression specimens within groups. Ob in the controls were distributed mostly in the low expression group as

only 18.2% of these subjects were subclassified in the high expression group. Specimen distribution for hip and knee OA was similar, as 53% were classified in the high subgroup for the hip OA population, and 47% in the knee OA population. The OP specimens showed a different pattern of ICAM-1 expression, as 70% of them were included in the high expression group ( $p < 0.03$ ). The distribution of specimens into high or low ICAM-1 expression group was significantly different for the OP group compared to the normal group ( $p < 0.03$ ). However, this distribution failed to reach significance in both OA groups compared to control and OP.

#### ***Measurement of IL-6 and PGE<sub>2</sub>***

IL-6 and PGE<sub>2</sub> were measured in OA Ob supernatants to try to correlate them with ICAM-1 expression in the high and low expression groups (Figure 6). Since we have already reported that OA Ob can be subdivided into high or low endogenous producers of IL-6 and PGE<sub>2</sub><sup>24,30</sup> (Lavigne et al. to be published), we wanted to compare these OA Ob subgroups with the classification of 2 Ob populations based on ICAM-1 expression reported by Tanaka et al.<sup>35</sup> and in the present study. In other words, the subclassification between high and low ICAM-1 expression was preserved in this assay, and IL-6 and PGE<sub>2</sub> production was analyzed in these 2 groups. Our results showed that the specimens included in the high ICAM-1 expression subgroup significantly produced more IL-6 and PGE<sub>2</sub> in their supernatants than those in the low ICAM-1 expression subgroup (IL-6: 5-fold increase,  $p < 0.01$ ; PGE<sub>2</sub>: 3.5-fold increase,  $p < 0.005$ ). When these substances were plotted against the percentage of ICAM-1 expression, and the R<sup>2</sup> calculated, we obtained values of 0.70 and 0.71 for IL-6 and PGE<sub>2</sub>, respectively, meaning that their concentration increased proportionally with ICAM-1 expression and vice versa.

## DISCUSSION

Cellular interactions through adhesion molecules represent an emerging concept in bone metabolism, and their implication together with cytokines seems to play a major role in various bone pathologies, particularly in inflammatory and Oc-dependent diseases. To verify the existence of a specific ICAM-1 expression pattern in pathological bone, we harvested bone specimens from OA and OP patients and compared them to normal bone on the basis of ICAM-1 expression.

The results presented in this report provides evidence that ICAM-1 expression *in vitro* is pathology-dependent, based on ICAM-1 expression differences in OP bone compared to normal bone. Although there was a trend for OA Ob to express more ICAM-1 at their cell surface compared to normal Ob, this did not reached significance. The subclassification of ICAM-1 on the basis of high or low expression shows that the distribution of specimens in the high ICAM-1 expression group is more significant in the OP group compared to the controls, with a mixed expression in the OA groups (70% of specimens in the OP group are high expressors, 50% in the OA groups, and only 18% in control group).

Ob from OA and OP patients produce many inflammatory cytokines compared to normal bone. It has been demonstrated that these inflammatory mediators are known to stimulate ICAM-1 expression in various cell lines<sup>2,3,32,39</sup>. We, therefore, believe that the level of ICAM-1 expression at the Ob surface is a reflection of the inflammatory microenvironment from which the Ob were retrieved. The difference in ICAM-1 expression observed here should then derive at least in part, from proinflammatory



stresses endured by the Ob. Moreover, it has been reported that production of IL-6 and IL-1 $\beta$  by Ob was stimulated by cross-linking ICAM-1 with a monoclonal anti-CD54 antibody<sup>36</sup>. This means that cell-cell interactions mediated through ICAM-1 would favour proinflammatory cytokine production and facilitate, through an autocrine/paracrine effect, the maintenance of elevated ICAM-1 expression at the Ob surface in inflammatory and Oc-dependent bone diseases, in turn allowing more intense bone remodelling. This probably creates the differences in ICAM-1 expression observed, since normal bone, which has a less inflammatory potential compared to OA and OP bone, expresses less ICAM-1. However, two of our control specimen were highly expressing ICAM-1 and this cannot be accounted for with the previous theory. One way to answer this could be that these specimen belong to pre-OP patient exhibiting slight osteopenia not detectable at the time of specimen collection. If this was to be true, determination of ICAM-1 expression may be a sensitive detection method of OP.

IL-6 and PGE<sub>2</sub> production has been shown to favour bone resorption and Oc recruitment<sup>14,18,20,22</sup>. Several reports from our group have demonstrated an abnormal metabolic activity profile of OA Ob and Ob from failed total hip arthroplasty based on their endogenous ability to produce IL-6 and PGE<sub>2</sub><sup>11,24,30</sup> (Lavigne et al. to be published). We have noted in a recent article, that high endogenous producers of IL-6 and PGE<sub>2</sub> respond more than low producers to proinflammatory mediator stimulation, except for markers of bone formation, which were comparable in both subgroups. We concluded from these results that high producer status was more likely to induce bone resorption than low producer status due to marked imbalance between the synthesis of bone-resorbing and bone-forming mediators (Lavigne et al. to be published). To confirm that

high ICAM-1 expression is related to more metabolically active bone, we verified IL-6 and PGE<sub>2</sub> levels in the culture medium of high and low ICAM-1 expressors. We were able to link the high metabolic activity group based on IL-6 and PGE<sub>2</sub> production to the high ICAM-1 expression group, with the same applying to the low metabolic activity group and the low ICAM-1 expression group. It has been reported that ICAM-1 mediates Ob and Oc precursor interactions inducing Oc formation, a property not shared by ICAM-1<sup>-</sup> Ob<sup>26,35</sup>. We believe that patients with high ICAM-1 expression/high IL-6 and PGE<sub>2</sub> producers profile have a bone metabolism imbalance leaning toward Oc recruitment and a more pronounced bone-resorbing effect than the low ICAM-1 expression group/low IL-6 and PGE<sub>2</sub> producers. This could be reflected clinically by preferential ICAM-1 expression in OP, an Oc-dependent disease, compared to normal bone. Individuals strongly expressing ICAM-1 would recruit Oc more intensely, which could translate to more rapid/severe OP development with a higher subsequent risk of fracture. It is noteworthy, however, that stimulating Ob with PGE<sub>2</sub> does not increase ICAM-1 expression as reported by Okada et al. in mice<sup>26</sup>, and confirmed in human Ob by our team, whereas IL-6 does (unpublished data). We, therefore, hypothesize that IL-6 probably is the principal actor in bone resorption and Oc recruitment mediated through ICAM-1.

On the other hand, the distribution of OA specimens was comparable in the high and low ICAM-1 expression subgroups around the hip and knee joints, suggesting that differential expression is not site-specific but disease-specific. OA evolution is normally slow but a subset of patients show rapid progression with rapid cartilage degeneration, early osteophyte formation and subchondral cyst generation. It is appealing to think that

rapid progressors may correspond to the group strongly expressing ICAM-1 and highly producing IL-6 and PGE<sub>2</sub>, with the inverse applying to slow progressors, but further study is needed to support this statement. Cysts formation could be favoured by the presence, in bone, of Ob strongly expressing ICAM-1, and therefore facilitating Oc recruitment, but this remains to be proven. That a difference in ICAM-1 expression was noted in trabecular bone away from weight-bearing areas implicates that abnormal bone metabolism involving much of the bony bed in these diseases and not just subchondral bone, which corroborates a report by Mansell and Bailey <sup>23</sup>.

Our results demonstrated that ICAM-1 showed a different expression pattern in OP and OA than in normal bone. Constitutive ICAM-1 expression is more significant when Ob are producing higher levels of IL-6 and PGE<sub>2</sub>. We believe that individuals expressing high ICAM-1 levels would be more prone to rapid progression of either OA or OP diseases. This differential expression of ICAM-1 could also be extrapolated to explain why a subset of patients operated for primary hip or knee replacement exhibit massive early osteolysis around the implant, and others do not. In fact, a recent study showed ICAM-1 expression to be higher than other adhesion molecules in the synovium of failed total knee arthroplasty and severe gonarthrosis compared to controls <sup>7</sup>. No clinical trials has evaluated the effect of ICAM-1 targetting in this setting.

Pharmacological modulation of ICAM-1 could potentially alter the progression of OP and osteolysis around orthopedic implants. The efficacy of anti-ICAM-1 treatment was confirmed in RA but clinical trial stopped because of allergic reactions <sup>17</sup>. Also, ICAM-1 antisense oligonucleotides were tested against RA patients with limited success <sup>25</sup>.

However, the authors mentioned that the dosage used in their study should have been

higher. Not doubt that better study desing and targetting ICAM-1 in other bone pathologies could lead to interesting findings. In order to complement the results obtained from this current study, we intend to follow prospectively our patients to assess whether rapid disease progression and implant failure can be related to differential ICAM-1 expression in bone tissue.

**REFERENCES**

1. Azuma M, Nakamura Y, Sano T, Okano Y, Sone S: Adhesion molecule expression on eosinophils in idiopathic eosinophilic pneumonia. *Eur Respir J* 9:2494-2500, 1996
2. Ballestas ME, Benveniste EN: Interleukin 1-beta- and tumor necrosis factor-alpha-mediated regulation of ICAM-1 gene expression in astrocytes requires protein kinase C activity. *Glia* 14:267-278, 1995
3. Bassi V, Vitale M, Feliciello A, De Riu S, Rossi G, Fenzi G: Retinoic acid induces intercellular adhesion molecule-1 hyperexpression in human thyroid carcinoma cell lines. *J Clin Endocrinol Metab* 80:1129-1135, 1995
4. Budnik A, Trefzer U, Parlow F, Grewe M, Kapp A, Schopf E, Krutmann J: Human epidermal keratinocytes are a source of soluble ICAM-1 molecules. *Exp Dermatol* 1:27-30, 1992
5. Chatterjee S: Sphingolipids in atherosclerosis and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:1523-1533, 1998
6. Colletti LM, Cortis A, Lukacs N, Kunkel SL, Green M, Strieter RM: Tumor necrosis factor up-regulates intercellular adhesion molecule 1, which is important in the neutrophil-dependent lung and liver injury associated with hepatic ischemia and reperfusion in the rat. *Shock* 10:182-191, 1998
7. Dambra P, Loria MP, Moretti B, D'Oronzio L, Patella V, Pannofino A, Cavallo E, Pesce V, Dell'Osso A, Simone C. Adhesion molecules in gonarthrosis and knee prosthesis aseptic loosening follow-up: possible therapeutic implications. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 25(2):179-89, 2003.

8. Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA, Springer TA: Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol* 137:245-254, 1986
9. Furuzawa-Carballeda J, Alcocer-Varela J: Interleukin-8, interleukin-10, intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 expression levels are higher in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis than in osteoarthritis. *Scand J Immunol* 50:215-222, 1999
10. Harada H, Kukita T, Kukita A, Iwamoto Y, Iijima T: Involvement of lymphocyte function-associated antigen-1 and intercellular adhesion molecule-1 in osteoclastogenesis: a possible role in direct interaction between osteoclast precursors. *Endocrinology* 139:3967-3975, 1998
11. Hilal G, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Ranger P, Lajeunesse D: Osteoblast-like cells from human subchondral osteoarthritic bone demonstrate an altered phenotype in vitro: possible role in subchondral bone sclerosis. *Arthritis Rheum* 41:891-899, 1998
12. Hubbard AK, Rothlein R: Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Radic Biol Med* 28:1379-1386, 2000
13. Jander S, Heidenreich F, Stoll G: Serum and CSF levels of soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in inflammatory neurologic diseases. *Neurology* 43:1809-1813, 1993
14. Jilka RL, Hangoc G, Girasole G, Passeri G, Williams DC, Abrams JS, Boyce B, Broxmeyer H, Manolagas SC: Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. *Science* 257:88-91, 1992

15. Kacimi R, Karliner JS, Koudssi F, Long CS: Expression and regulation of adhesion molecules in cardiac cells by cytokines: response to acute hypoxia. *Circ Res* 82:576-586, 1998
16. Kavanaugh AF, Davis LS, Jain RI, Nichols LA, Norris SH, Lipsky PE: A phase I/II open label study of the safety and efficacy of an anti-ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1; CD54) monoclonal antibody in early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 23:1338-1344, 1996
17. Kavanaugh AF, Schulze-Koops H, Davis LS, et al.: Repeat treatment of rheumatoid arthritis patients with a murine anti-intercellular adhesion molecular 1 monoclonal antibody. *Arthritis Rheum* 40:849-853, 1997.
18. Kotake S, Sato K, Kim KJ, Takahashi N, Udagawa N, Nakamura I, Yamaguchi A, Kishimoto T, Suda T, Kashiwazaki S: Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptors in the synovial fluids from rheumatoid arthritis patients are responsible for osteoclast-like cell formation. *J Bone Miner Res* 11:88-95, 1996
19. Kurachi T, Morita I, Murota S: Involvement of adhesion molecules LFA-1 and ICAM-1 in osteoclast development. *Biochim Biophys Acta* 1178:259-266, 1993
20. Lader CS, Flanagan AM: Prostaglandin E2, interleukin 1alpha, and tumor necrosis factor-alpha increase human osteoclast formation and bone resorption in vitro. *Endocrinology* 139:3157-3164, 1998
21. Lajeunesse D, Kiebzak GM, Frondoza C, Sacktor B: Regulation of osteocalcin secretion by human primary bone cells and by the human osteosarcoma cell line MG-63. *Bone Miner* 14:237-250, 1991

22. Manolagas SC: The role of IL-6 type cytokines and their receptors in bone. *Ann N Y Acad Sci* 840:194-204, 1998
23. Mansell JP, Bailey AJ: Abnormal cancellous bone collagen metabolism in osteoarthritis. *J Clin Invest* 101:1596-1603, 1998
24. Massicotte F, Lajeunesse D, Benderdour M, Pelletier JP, Hilal G, Duval N, Martel-Pelletier J: Can altered production of interleukin-1beta, interleukin-6, transforming growth factor-beta and prostaglandin E(2) by isolated human subchondral osteoblasts identify two subgroups of osteoarthritic patients. *Osteoarthritis Cartilage* 10:491-500, 2002
25. Maksymowych WP, Blackburn, WD, Tami JA, et al.: A randomized, placebo controlled trial of an antisense oligodeoxynucleotide to intercellular adhesion molecule-1 in the treatment of severe rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 29:447-453, 2002.
26. Okada Y, Morimoto I, Ura K, Watanabe K, Eto S, Kumegawa M, Raisz L, Pilbeam C, Tanaka Y: Cell-to-Cell adhesion via intercellular adhesion molecule-1 and leukocyte function-associated antigen-1 pathway is involved in 1alpha,25(OH)2D3, PTH and IL-1alpha-induced osteoclast differentiation and bone resorption. *Endocr J* 49:483-495, 2002
27. Raisz LG, Fall PM: Biphasic effects of prostaglandin E2 on bone formation in cultured fetal rat calvariae: interaction with cortisol. *Endocrinology* 126:1654-1659, 1990
28. Rothlein R, Mainolfi EA, Czajkowski M, Marlin SD: A form of circulating ICAM-1 in human serum. *J Immunol* 147:3788-3793, 1991



29. Sampath D, Castro M, Look DC, Holtzman MJ: Constitutive activation of an epithelial signal transducer and activator of transcription (STAT) pathway in asthma. *J Clin Invest* 103:1353-1361, 1999
30. Shi Q, Lajeunesse D, Reboul P, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Dehnade F, Fernandes JC: Metabolic activity of osteoblasts from periprosthetic trabecular bone in failed total hip arthroplasties and osteoarthritis as markers of osteolysis and loosening. *J Rheumatol* 29:1437-1445, 2002
31. Shijubo N, Imai K, Shigehara K, Honda Y, Koba H, Tsujisaki M, Hinoda Y, Yachi A, Ohmichi M, Hiraga Y, .: Soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in sera and bronchoalveolar lavage fluid of patients with idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary sarcoidosis. *Clin Exp Immunol* 95:156-161, 1994
32. Shrikant P, Chung IY, Ballestas ME, Benveniste EN: Regulation of intercellular adhesion molecule-1 gene expression by tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interferon-gamma in astrocytes. *J Neuroimmunol* 51:209-220, 1994
33. Stanciu LA, Djukanovic R: The role of ICAM-1 on T-cells in the pathogenesis of asthma. *Eur Respir J* 11:949-957, 1998
34. Stanimirovic DB, Wong J, Shapiro A, Durkin JP: Increase in surface expression of ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin in human cerebrovascular endothelial cells subjected to ischemia-like insults. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 70:12-16, 1997
35. Tanaka Y, Maruo A, Fujii K, Nomi M, Nakamura T, Eto S, Minami Y: Intercellular adhesion molecule 1 discriminates functionally different populations

- of human osteoblasts: characteristic involvement of cell cycle regulators. *J Bone Miner Res* 15:1912-1923, 2000
36. Tanaka Y, Morimoto I, Nakano Y, Okada Y, Hirota S, Nomura S, Nakamura T, Eto S: Osteoblasts are regulated by the cellular adhesion through ICAM-1 and VCAM-1. *J Bone Miner Res* 10:1462-1469, 1995
  37. Teitelbaum SL: Osteoclasts, integrins, and osteoporosis. *J Bone Miner Metab* 18:344-349, 2000
  38. Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, Sasaki T, Yamaguchi A, Kodama H, Martin TJ, Suda T: The bone marrow-derived stromal cell lines MC3T3-G2/PA6 and ST2 support osteoclast-like cell differentiation in cocultures with mouse spleen cells. *Endocrinology* 125:1805-1813, 1989
  39. van de SA, van der Saag PT: Intercellular adhesion molecule-1. *J Mol Med* 74:13-33, 1996
  40. Watanabe T, Fan J: Atherosclerosis and inflammation mononuclear cell recruitment and adhesion molecules with reference to the implication of ICAM-1/LFA-1 pathway in atherogenesis. *Int J Cardiol* 66 Suppl 1:S45-S53, 1998
  41. Welty SE, Rivera JL, Elliston JF, Smith CV, Zeb T, Ballantyne CM, Montgomery CA, Hansen TN: Increases in lung tissue expression of intercellular adhesion molecule-1 are associated with hyperoxic lung injury and inflammation in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 9:393-400, 1993

## LEGENDS TO FIGURES

**Figure 1: Comparison between magnetic column separation and immunocytology for ICAM-1 expression assessment.** Ob were retrieved after 6 weeks of culture from OA bone (n=7) and both immunocytology and magnetic separation was performed on the same specimen. Results are expressed as percentages of cells expressing ICAM-1.

**Figure 2: ICAM-1 expression on Ob from normal, OA and OP bone.** Ob were retrieved after 6 weeks of culture from patients suffering from OA of the hip (n=19) or knee (n=19) or from hip fracture caused by OP (n=10). Control bone specimens from the posterosuperior iliac crest (n=5) and from the femoral condyle of organ donors (n=6), are grouped together. ICAM-1 expression was evaluated by immunocytology. Results are expressed as means  $\pm$  SEM.

**Figure 3: Subclassification between High and Low ICAM-1 expression.** Ob were retrieved after 6 weeks of culture and fixed with a solution of paraformaldehyde 2% before incubation with CD54 monoclonal antibody. Anti-mouse IgG peroxidase conjugate was added, counter-colored with hematoxylin and sealed before cell counting under light microscopy. Subclassification into high or low ICAM-1 expression was based on the expression observed for a specific specimen as being higher or lower than the group's average. (A) represents low ICAM-1 expression (31%) and (B) High ICAM expression (74%).

**Figure 4: ICAM-1 expression on Ob after subgroup classification.** Subgroup classification was performed after evaluation of ICAM-1 expression by immunocytology. The high expression group corresponds to specimens that showed ICAM-1 expression higher than the mean before subclassification, while the low expression group

corresponds to specimens that showed ICAM-1 expression lower than the mean before subclassification. Results are expressed as means  $\pm$  SEM.

p-values represent high ICAM-1 expression group vs low ICAM-1 expression group.

**Figure 5: Specimen distribution into high and low ICAM-1 expression groups.**

Subgroup classification was performed after evaluation of ICAM-1 expression by immunocytology and specimen distribution into high or low expression groups. Results are expressed as percentages.

**Figure 6: IL-6 and PGE<sub>2</sub> production in high and low ICAM-1 expression groups.** IL-

6 and PGE<sub>2</sub> production was evaluated in the supernatants of hip and knee OA Ob by ELISA and related to ICAM-1 expression on the same hip and knee OA specimens.

Results are expressed as means  $\pm$  SEM.

**Figure 1: Comparison between magnetic column separation and immunocytology for ICAM-1 expression assessment**

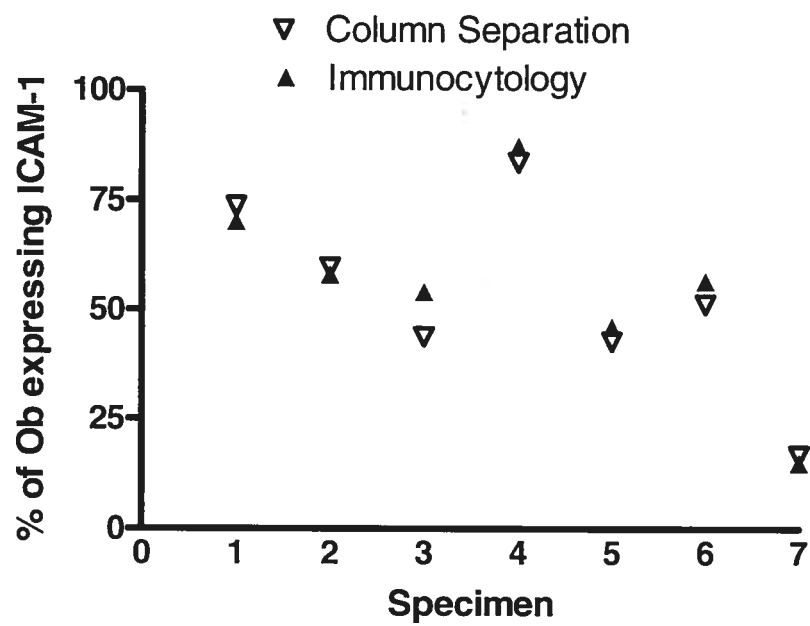
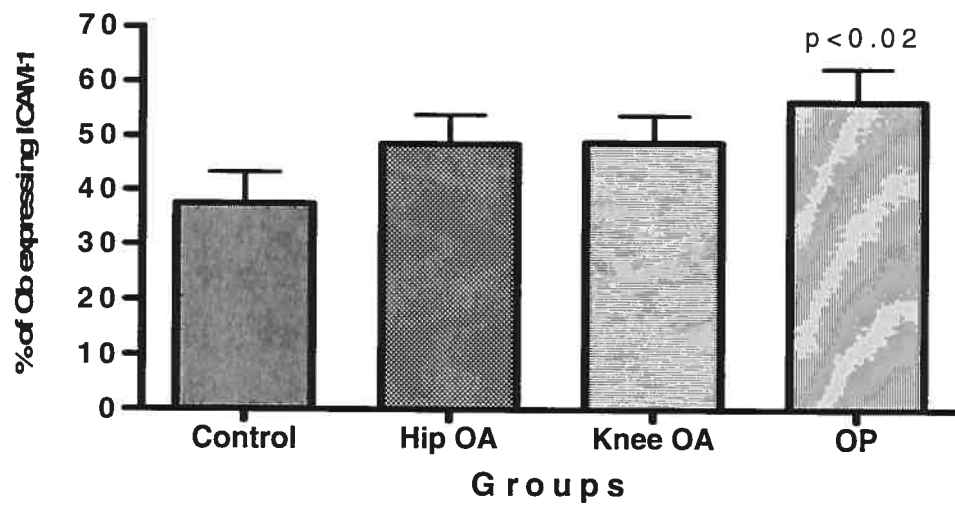
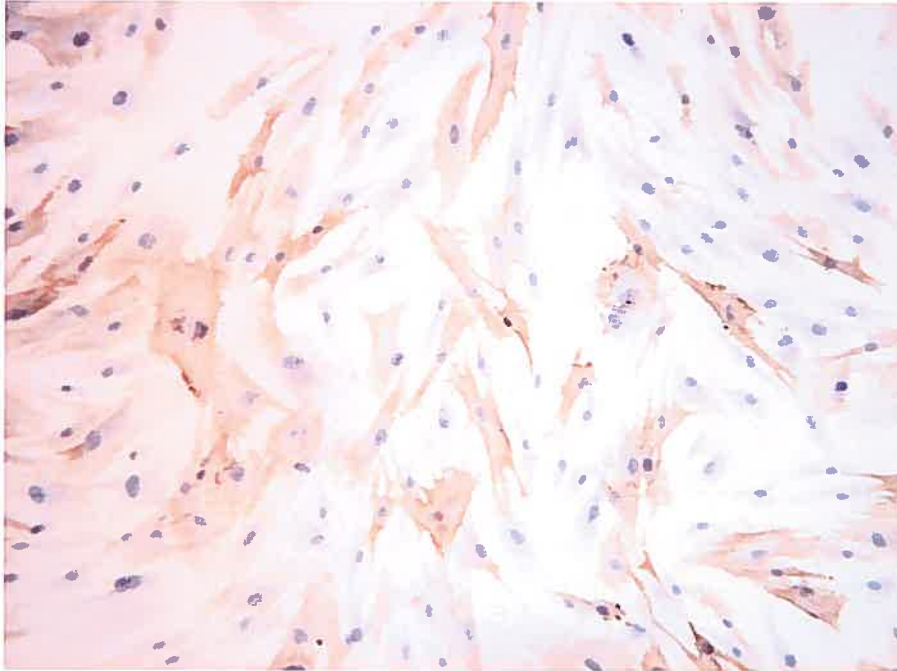


Figure 2: ICAM-1 expression on Ob from normal, OA and OP bone

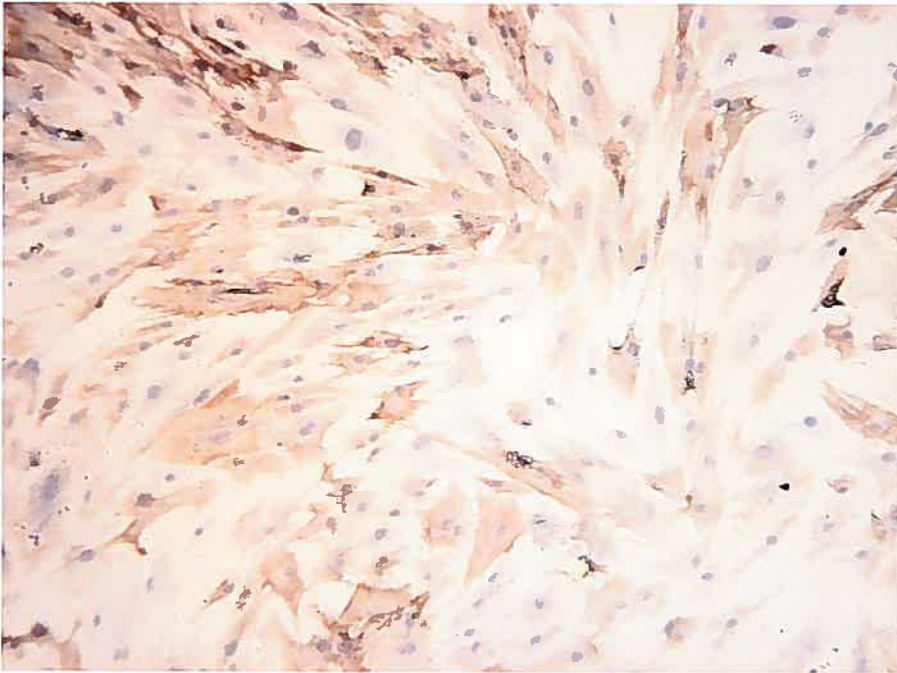


**Figure 3: Subclassification between High and Low ICAM-1 expression**

**A)**



**B)**



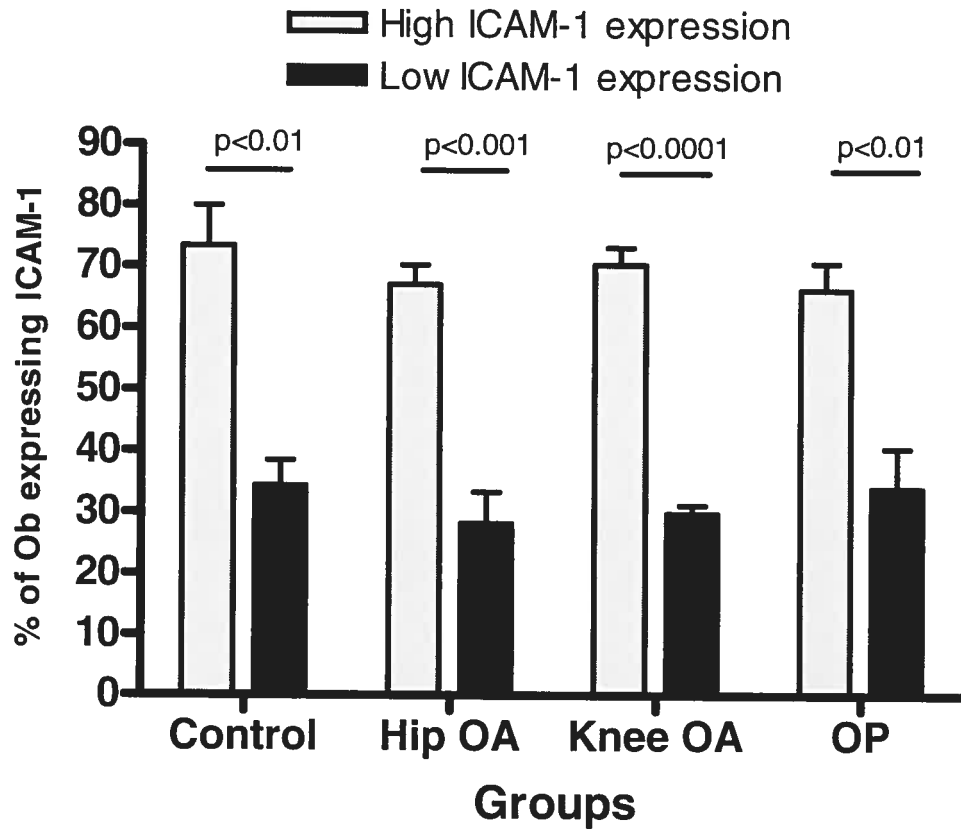
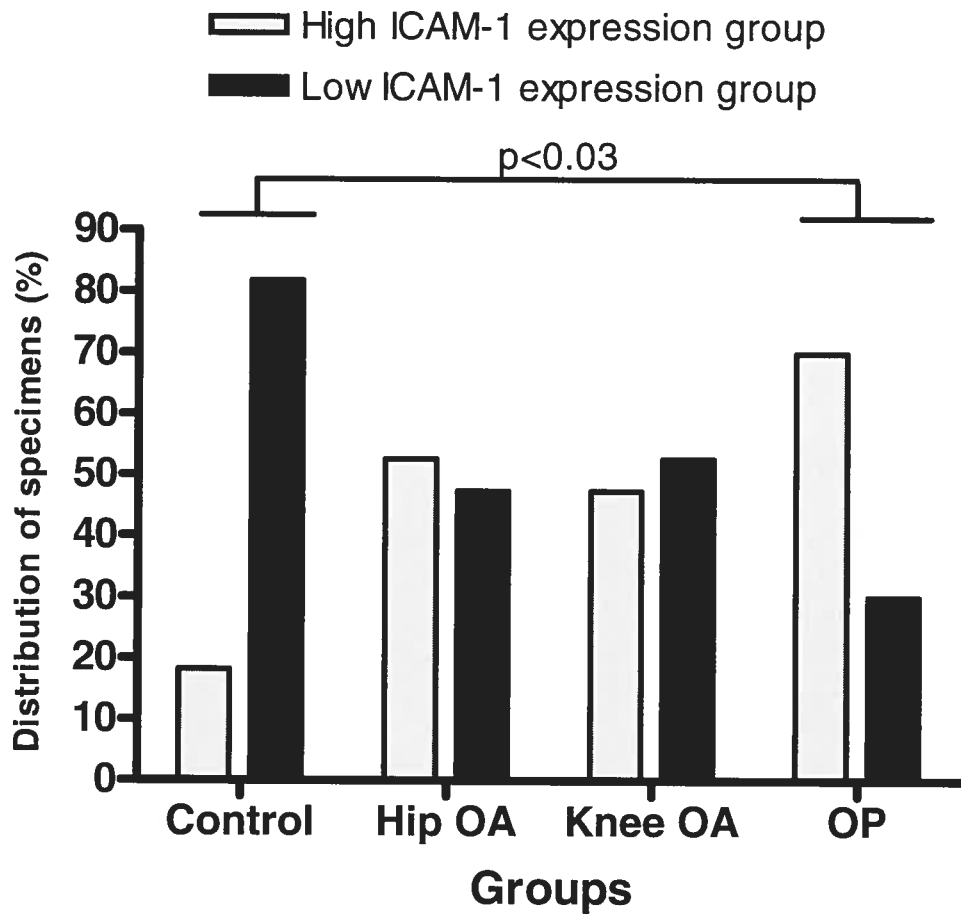
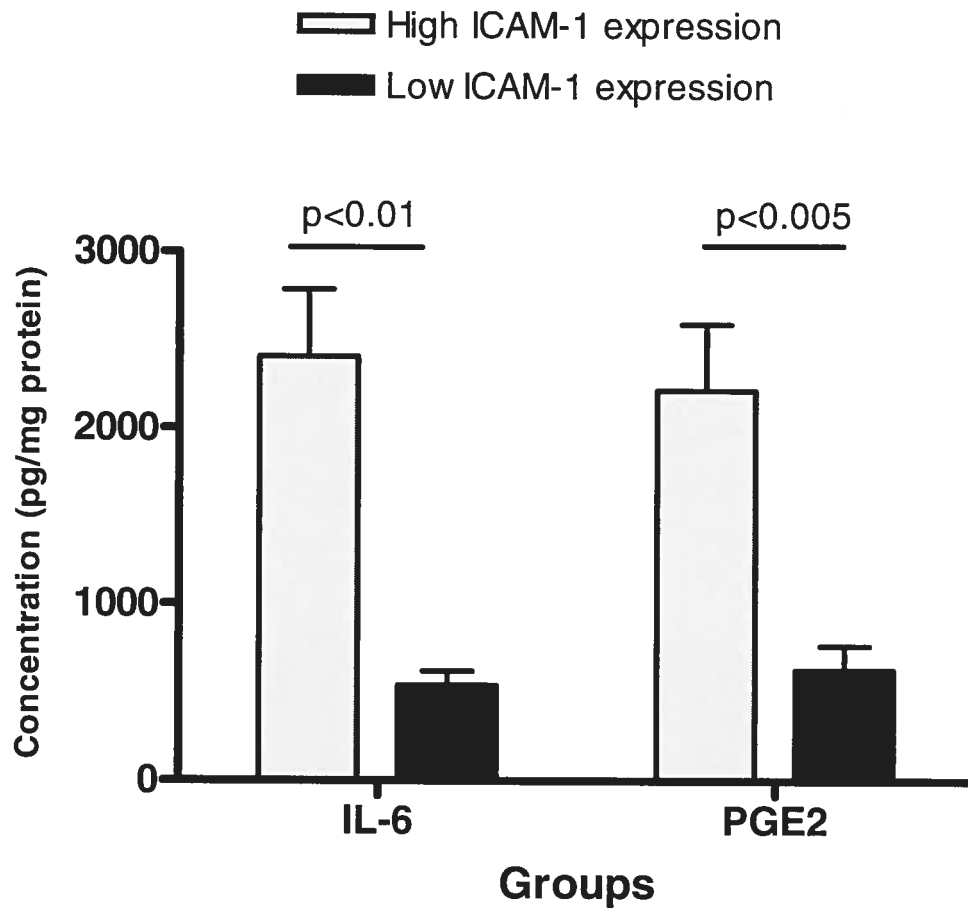
**Figure 4: ICAM-1 expression on Ob after subgroup classification**



Figure 5: Distribution of specimens into high and low ICAM-1 expression groups



**Figure 6: IL-6 and PGE2 production by OA Ob in high and low ICAM-1 expression groups**



**4.2 ARTICLE 2:****Increased serum sICAM levels in osteoporotic patients**

<sup>1</sup>Patrick Lavigne, <sup>1</sup>Qin Shi, <sup>1</sup>Mohamed Benderdour, <sup>3</sup>Jacques Lorrain, <sup>2</sup>Daniel Lajeunesse  
and <sup>1,2</sup>Julio C. Fernandes\*

<sup>1</sup>Orthopaedics Research Laboratory, Department of Orthopaedics, Centre hospitalier  
Sacré-Coeur, Montréal, Québec, Canada

<sup>2</sup>Osteoarthritis Research Unit, Department of Orthopaedics, Centre hospitalier de  
l'Université de Montréal-Hôpital Notre-Dame, Montréal, Québec, Canada

<sup>3</sup>Department of Gynecology, Centre hospitalier Sacré-Coeur, Montréal, Québec, Canada

**Tel:** (514) 338-2222 ext. 2489

**Fax:** (514) 338-2694

**Email:** [REDACTED]

\*To whom correspondence should be addressed

Orthopaedics Research Laboratory, Department of Orthopaedics, Centre hospitalier  
Sacré-Coeur, 5400 boul. Gouin Ouest, Montréal, Québec, Canada, H4J 1C5

**Short title:** sICAM-1 levels and bone density

**ABSTRACT**

**Objective:** To assess serum sICAM and TRAP 5b levels in osteoporotic (OP) patients.

**Methods:** 111 non-smoking female patients on hormone replacement therapy were recruited and grouped as normal, osteopenic (OPE), OP and OP-treated with alendronate (OP-Tx) based on their bone mineral density (BMD) scores. Patients who had cardiac and inflammatory diseases or cancer were excluded. sICAM and TRAP 5b levels were measured by ELISA and data were compared between each group.

**Results:** 23 patients were included in the control group, while 22, 4 and 52 patients were included in OPE, OP and OP-Tx group respectively. TRAP 5b levels were significantly greater in OP group compared with normal and OPE group. Alendronate had an inhibitory effect on TRAP 5b, as evidenced by its levels in the OP-Tx group. sICAM levels were also significantly increased in the OP group. Although sICAM levels in the OP-Tx group was lower than in the OP group, this result was not quite significant.

**Conclusion:** This study reports for the first time modification of sICAM profile in OP. Further studies will be needed to investigate the pathophysiological role of this mediator in OP.

According to the World Health Organization (WHO), osteoporosis (OP) is the most common metabolic bone disorder, as it affects more than one woman out of three (1). OP results from an imbalance between bone resorption and bone formation. At the cellular level, the osteoclast (OC) removes more bone than the osteoblast (Ob) is able to form, which translates into a reduction of total bone mass.

This reduction in bone mass can be quantified by measurement of bone mineral density (BMD) using dual-energy x-ray absorptiometry (DEXA), either in the proximal femur or in the spine. The WHO has defined OP based on the lower value of BMD measured at these locations, a normal bone mass lying within -1 standard deviation (SD) of the peak bone mass while a BMD density of less than -2.5 SD is considered OP. Any patients with T-scores between -1 SD and -2.5 SD are said to be osteopenic (OPE).

As BMD measurements cannot detect early changes in bone mass, a multitude of urinary and serum markers have been developed to monitor bone turnover. Of those, serum tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRAP 5b), derived from OC, has been shown to correlate with other markers of bone resorption and with BMD, suggesting its use as a specific determinant of bone turnover (2).

Bone resorption rate is a reflection of OC activity. Cellular interactions between Ob and pre-OC mediated through adhesion molecules such as membrane-bound intercellular adhesion molecules-1 (mICAM-1) have been recognized as important modulator of OC recruitment and differentiation (3;4). From a clinical standpoint, studies have reported higher mICAM-1 in the synovium of rheumatoid arthritis (RA), osteoarthritis (OA) and OP patients, and in patients undergoing a revision arthroplasty secondary to aseptic loosening (5-7). Furthermore, a clinical trial testing the utility of

anti-CD54 monoclonal antibody in the treatment of RA patients reported rapid clinical improvement (8). All these studies suggest the implication of ICAM-1 in OC-mediated diseases.

ICAM-1 also exists as a soluble protein (sICAM). We have observed in Ob culture that the expression of membrane bound ICAM-1 is positively correlated with levels of sICAM in the supernatant (unpublished results). Although sICAM has been described to correlate with a wide variety of diseases, its implication and relevance (if any) in bone metabolism have not been investigated so far.

Given the absence of data in the literature regarding the action of sICAM on bone, given the specific mICAM-1 expression in OC-dependent diseases and the direct relation between level of membrane-bound and soluble ICAM in Ob culture, we investigated here sICAM serum levels in normal, OPE and OP individuals and verified whether sICAM levels could be modified in OP.

## **MATERIALS AND METHODS**

### ***Patient population***

A total of 111 postmenopausal female patients on hormone replacement therapy (HRT) were enrolled in this study. They were already followed at an outpatient OP clinic or referred from general practitioners. Before entering the study, a complete medical history was taken and physical exam performed. Patients with previous history of ischemic heart disease, inflammatory diseases, cancer or cigarette smoking were excluded based on numerous reports showing variation of serum sICAM levels with these conditions (9-12). All subjects gave a written informed consent according to the declaration of Helsinki.

BMD measurements were performed with DEXA at local radiology clinics using standard protocols. Patients were grouped based on the lowest of BMD values taken at the hip and spine. Normal ( $> -1$  SD), OPE ( $-1$  to  $< -2.5$  SD) and OP ( $-2.5$  and more SD) were defined according to WHO criteria's. A fourth group was added including patients with previous OP diagnosis and under alendronate treatment (OP-Tx group) when entering the study. All patients in this particular group had been taking alendronate 70 mg p.o weekly for at least 6 months before BMD measurements. Serum sICAM and TRAP 5b levels were included as part of their routine blood work. Serum samples were collected according to routine protocols, sent to our research lab and further quantified by ELISA.

#### ***sICAM measurement***

sICAM levels in serum were measured using a Duo Set ELISA development system purchased from R&D systems (Minneapolis, MN). Assay sensitivity was 15.6 pg/ml and recommended range 15.6 – 1000 pg/ml. Each ELISA was performed according to the manufacturer's specifications. Absorbance was measured with a microELISA Vmax photometer (Molecular Devices Corp.).

#### ***TRAP 5b measurement***

Osteoclast-derived TRAP 5b was measured in serum samples using an ELISA kit purchased from Suomen Bioanalytiikka Oy (Turku, Finland). This kit has the advantage of measuring only freshly secreted TRAP 5b molecules. Assay sensitivity is 0.06 U/l and experiments were performed according to the manufacturer's specifications. Absorbance was measured as described previously.

#### ***Statistical analysis***

The results are expressed as mean  $\pm$  SEM. Assays were performed in duplicate. The data were analyzed statistically by the two-tailed Mann-Whitney U-test. P-values  $<$  0.05 were considered significant.

## RESULTS

Baseline characteristics of all patients are shown in table 1. 23 patients were classified in the normal group, 22 in the OPE group, 4 in the OP and 52 in the OP-Tx group. As expected, BMD values were significantly different for all groups compared to normal. Also, patients in both OP groups were older than patients in OPE and normal groups.

### *Serum TRAP 5b and sICAM levels*

Figure 1 shows variations of serum TRAP 5b throughout the groups. TRAP 5b is increased significantly in OP ( $p < 0.04$ ) compared to normal, while in the OP-Tx group, it is significantly lower when compared to both normal ( $p < 0.01$ ) and to OP group ( $p < 0.003$ ). No differences were observed between the OPE and normal group although a slight increase was noted.

Figure 2 represents serum level of sICAM in our 4 groups. Serum sICAM levels were found to be significantly higher in the OP group ( $p < 0.05$ ) compared to normal, while serum sICAM levels in OPE and OP-Tx groups were comparable to normal.

## DISCUSSION

Serum sICAM levels have been shown to be increased in inflammation-related processes. Many studies have suggested its potential utility as a future predictor of coronary artery disease, although no precise role has been identified so far (9). Increased levels of sICAM have also been observed in various cancer types and this is believed be



an indication of tumor burden (13;14). However, no study has focussed on serum variations of sICAM in bone pathologies.

This study was first designed to screen sICAM levels in OP patients. The rationale behind this was the identification of a specific pattern of mICAM-1 expression at the surface of Ob recovered from OP patients when compared to healthy subjects, the finding of a direct relationship between membrane and soluble ICAM *in vitro*, along with the mounting evidence of a specific pattern of mICAM expression in OC-mediated diseases (5-7). In the present study, we have shown an increase in sICAM levels in OP patients compared to healthy individuals. Furthermore, OP patients treated with alendronate had sICAM and TRAP 5b values comparable to normal and OPE patients, suggesting an inhibitory effect of alendronate on the production of these molecules. To our knowledge, we are the first group to demonstrate variations in sICAM levels in OP and an inhibitory effect of alendronate on sICAM and TRAP 5b specifically.

TRAP 5b was used here to serve as a control and verify if our cohort of patients could be comparable to published studies on markers and BMD, which seems to be the case. TRAP 5b is produced by OC and is a reflection of their activity. It has been shown to be related to bone turnover and is known to be affected by pamidronate treatment (15). Furthermore, the kit used was shown to be specific for newly secreted TRAP 5b, enabling us to monitor recent changes in bone metabolism, in particular response to biphosphonate treatment.

The exact significance of these findings however, remains uncertain. Many studies have reported increase in sICAM levels in a great variety of disease processes, but few have demonstrated a role for sICAM. The fact that we described a greater mICAM-1

expression on Ob recovered from OP patients (7) and that serum sICAM levels were also increased in OP patients makes us believe that ICAM-1 might be a modulator of OP. Given that mICAM-1 was shown to participate in osteoclastogenesis possibly by stabilizing cellular interaction between pre-OC and Ob (3;4), it would be interesting to see if the findings of this study could be extrapolated to OC-mediated diseases such as RA and failed arthroplasty secondary to aseptic loosening. Also, the action of alendronate on sICAM is intriguing. The pharmacological effect of alendronate on bone resorption is believed to be directed against OC. The observed decrease of sICAM levels in OP-Tx compared to OP group might indicate that at least part of the sICAM protein found in the serum comes from bone, since no effect on other cell type is described so far for biphosphonates.

The weakness of this study is the small number of patients in the OP group. Being mainly a tertiary care hospital, most of the patients referred to us were already followed by their primary care practitioner for OP and treatment was usually started before referral. However, we did achieve significance in spite of only 4 patients in the OP group. Moreover, sICAM values resemble those of TRAP 5b, leading us to believe that these values are reproducible. One could argue that age might influence these levels since OP patients are older, but it has already been shown that age does not influence sICAM levels in adults (11).

In conclusion, this study reports higher serum sICAM and TRAP 5b levels in OP patients and their modulation by alendronate. The role of mICAM-1 and sICAM in musculoskeletal disorders remains unknown and further studies defining their precise action in OP and OC-mediated diseases are needed.

## Reference List

- (1) Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. World Health Organ Tech Rep Ser 1994; 843:1-129.
- (2) Halleen JM, Ylipahkala H, Alatalo SL, Janckila AJ, Heikkinen JE, Suominen H et al. Serum tartrate-resistant acid phosphatase 5b, but not 5a, correlates with other markers of bone turnover and bone mineral density. *Calcif Tissue Int* 2002; 71(1):20-25.
- (3) Harada H, Kukita T, Kukita A, Iwamoto Y, Iijima T. Involvement of lymphocyte function-associated antigen-1 and intercellular adhesion molecule-1 in osteoclastogenesis: a possible role in direct interaction between osteoclast precursors. *Endocrinology* 1998; 139(9):3967-3975.
- (4) Kurachi T, Morita I, Murota S. Involvement of adhesion molecules LFA-1 and ICAM-1 in osteoclast development. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1178(3):259-266.
- (5) Dambra P, Loria MP, Moretti B, D'Oronzio L, Patella V, Pannofino A et al. Adhesion molecules in gonarthrosis and knee prosthesis aseptic loosening follow-up: possible therapeutic implications. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2003; 25(2):179-189.
- (6) Furuzawa-Carballeda J, Cocer-Varela J. Interleukin-8, interleukin-10, intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 expression levels are higher in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis than in osteoarthritis. *Scand J Immunol* 1999; 50(2):215-222.
- (7) Lavigne P, Benderdour M, Lajeunesse D, Shi Q, Fernandes JC. Expression of ICAM-1 by osteoblasts in healthy individuals and in patients suffering from osteoarthritis and osteoporosis. *Bone* 2004; 35(2):463-470.
- (8) Kavanaugh AF, Davis LS, Jain RI, Nichols LA, Norris SH, Lipsky PE. A phase I/II open label study of the safety and efficacy of an anti-ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1; CD54) monoclonal antibody in early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1996; 23(8):1338-1344.
- (9) Blankenberg S, Barbaux S, Tiret L. Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2003; 170(2):191-203.
- (10) Littler AJ, Buckley CD, Wordsworth P, Collins I, Martinson J, Simmons DL. A distinct profile of six soluble adhesion molecules (ICAM-1, ICAM-3, VCAM-1, E-selectin, L-selectin and P-selectin) in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1997; 36(2):164-169.

- (11) Ponthieux A, Herbeth B, Drosch S, Haddy N, Lambert D, Visvikis S. Biological determinants of serum ICAM-1, E-selectin, P-selectin and L-selectin levels in healthy subjects: the Stanislas study. *Atherosclerosis* 2004; 172(2):299-308.
- (12) Kostler WJ, Tomek S, Brodowicz T, Budinsky AC, Flamm M, Hejna M et al. Soluble ICAM-1 in breast cancer: clinical significance and biological implications. *Cancer Immunol Immunother* 2001; 50(9):483-490.
- (13) Grothey A, Heistermann P, Philippou S, Voigtmann R. Serum levels of soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1, CD54) in patients with non-small-cell lung cancer: correlation with histological expression of ICAM-1 and tumour stage. *Br J Cancer* 1998; 77(5):801-807.
- (14) Harning R, Mainolfi E, Bystryn JC, Henn M, Merluzzi VJ, Rothlein R. Serum levels of circulating intercellular adhesion molecule 1 in human malignant melanoma. *Cancer Res* 1991; 51(18):5003-5005.
- (15) Martinetti A, Seregini E, Ripamonti C, Ferrari L, De Conno F, Miceli R et al. Serum levels of tartrate-resistant acid phosphatase-5b in breast cancer patients treated with pamidronate. *Int J Biol Markers* 2002; 17(4):253-258.

**LEGENDS TO FIGURE**

**Figure 1: Serum TRAP 5b activity in normal, OPE, OP and OP-Tx patients.** TRAP 5b activity was measured in serum of 111 patients using ELISA and then grouped as normal, OPE, OP and OP-tx based on their BMD values and alendronate treatment. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM.

\* $p < 0.04$ , OP vs control

\*\* $p < 0.01$ , OP-Tx vs control;  $p < 0.003$ , OP-Tx vs OP

**Figure 2: Serum sICAM concentration in normal, OPE, OP and OP-Tx patients.**

sICAM concentration was measured in serum of 111 patients using ELISA and then grouped as normal, OPE, OP and OP-tx based on their BMD values and alendronate treatment. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM.

\* $p < 0.05$ , OP vs control

**Table 1. Population characteristics**

|     | Normal<br>n=23               | Osteopenic<br>n=22             | Osteoporotic<br>n=4            | Osteoporotic-Treated<br>n=52  |
|-----|------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| Age | 60.6 ± 1.5<br>(57.7 - 63.6)  | 61.7 ± 1.1<br>(59.5 - 63.9)    | 72.5 ± 0.96*<br>(69.5 - 75.6)  | 66.7 ± 1.3*<br>(64.1 - 69.2)  |
| BMD | 0.70 ± 0.12<br>(0.44 - 0.95) | -1.3 ± 0.08*<br>(-1.5 - -1.18) | -3.05 ± 0.44*<br>(-4.4 - -1.7) | -2.3 ± 0.06*<br>(-2.4 - -2.2) |

Results are expressed as mean ± SEM (IC 95%)

\*p<0.05; group vs normal

Figure 1. Serum TRAP 5b activity in normal, OPE, OP and OP-Tx patients

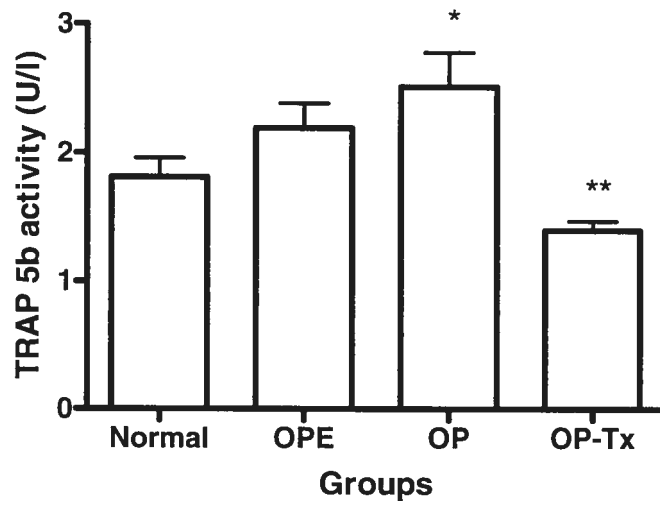
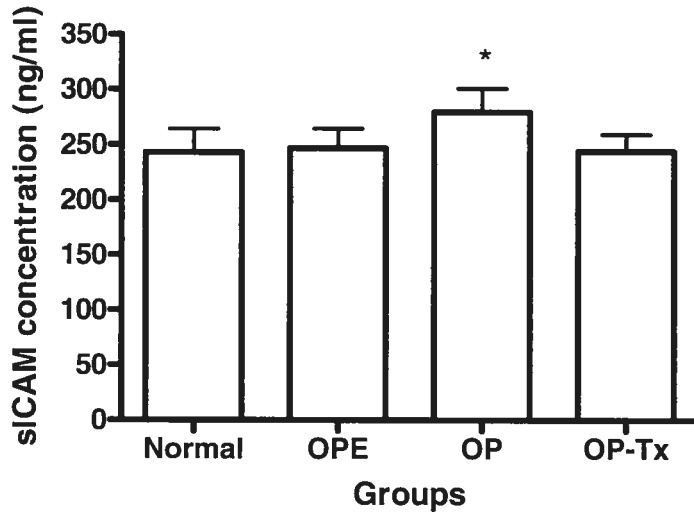


Figure 2. Serum sICAM concentration in normal, OPE, OP and OP-Tx patients.





**4.3 ARTICLE 3 :****sICAM increases osteoclasts bone resorption in vitro**

<sup>1,2</sup>Patrick Lavigne, <sup>1</sup>Qin Shi, <sup>1</sup>Mohamed Benderdour, <sup>3</sup>Daniel Lajeunesse and <sup>1,3</sup>Julio C. Fernandes\*

<sup>1</sup>Orthopaedics Research Laboratory, Department of Orthopaedics, Centre hospitalier Sacré-Coeur, Montréal, Québec, Canada

<sup>2</sup>Department of Orthopaedics, Centre hospitalier Maisonneuve-Rosemont, Montréal, Québec, Canada

<sup>3</sup>Osteoarthritis Research Unit, Department of Orthopaedics, Centre hospitalier de l'Université de Montréal-Hôpital Notre-Dame, Montréal, Québec, Canada

**Tel:** (514) 338-2222 ext. 2489

**Fax:** (514) 338-2694

**Email:** [REDACTED]

\*To whom correspondence should be addressed

Orthopaedics Research Laboratory, Department of Orthopaedics, Centre hospitalier Sacré-Coeur, 5400 boul. Gouin Ouest, Montréal, Québec, Canada, H4J 1C5

## ABSTRACT

In the context of osteoclastogenesis, intercellular adhesion molecule (ICAM) -1 is believed to provide a high affinity adhesion between the osteoblast and the osteoclast precursor thereby facilitating the interaction between receptor activator nuclear  $\kappa$ B ligand (RANKL) and its receptor RANK. No role is currently described for sICAM in that process. Therefore, the purpose of this study is to verify whether sICAM plays a role in the formation and maturation of osteoclasts. Peripheral blood monocytes isolated from blood of healthy donors and cultured alone or with human osteoblast were stimulated with macrophage colony stimulating factor (M-CSF), sRANKL, ICAM-1 monoclonal antibody and/or sICAM to produce mature osteoclasts. Release of TRAP 5b and resorption area were analyzed as markers of osteoclast formation and function respectively. Further, the effect of ICAM-1 engagement and sICAM stimulation on cell survival (MTT) and on the production of RANKL/osteoprotegerin (OPG)/RANK (RT-PCR) was evaluated. When cultured alone or in the presence of osteoblasts, sICAM did not modify the release of TRAP 5b from osteoclast precursors. However, a significant increase in the resorption area was recorded following sICAM stimulation both in monoculture and in co-culture. Engagement of ICAM-1 on osteoblast resulted in an increase of RANKL mRNA expression and a decrease in osteoblast survival. Stimulation of pre-osteoclast with sICAM did not modify the expression of RANK but produced a significant increase in pre-osteoclast survival. These results indicate that ICAM-1 and sICAM have a dual effect on bone homeostasis, lowering bone deposition through a decreased osteoblast survival and increasing bone resorption through an increase in RANKL-mediated osteoclastogenesis and an increase in osteoclast survival.

## INTRODUCTION

Skeletal homeostasis is maintained at the cellular level by the actions of osteoblasts and osteoclasts, respectively forming and removing bone. This dynamic process is continuously adjusting to the physiological needs of the body, but when an imbalance between bone formation and resorption occurs, it generally leads to skeletal disease. Most of these diseases are the consequence of an increase in osteoclast activity, resulting in net bone loss (1).

The osteoclast is a multinucleated giant cell that comes from the monocyte/macrophage lineage. The differentiation of monocytes into mature osteoclast involves numerous mediators and cellular events in order to take place. The paramount importance of receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL) and its receptor (RANK) is well described in this process (2,3). *In vivo*, interactions between osteoblast/stromal cells and osteoclast-precursors mediated through adhesion molecules also appears essential for osteoclastogenesis, because of the inhibition of osteoclast formation and function when adhesion molecules such as intercellular adhesion molecule (ICAM-1) are blocked *in vitro* (4-6). It is believed that the high affinity cellular adhesion supported by ICAM-1 facilitates the interaction of RANKL with its receptor RANK, leading to increased bone resorption (4).

In skeletal diseases, ICAM-1 levels are increased in the synovium of rheumatoid arthritis (RA), osteoarthritis (OA) patients and in patients suffering from aseptic loosening of orthopaedic implants (7). We have also demonstrated that there is a specific ICAM-1 expression on Ob of osteoporotic and OA patients (8). Although these reports indicate the presence of ICAM-1 in these osteoclast-mediated diseases, there is no

particular role identified so far for ICAM-1 in bone metabolism other than stabilization of cellular interaction.

ICAM-1 can also be found as a soluble isoform (sICAM) but no specific physiological function is identified so far in bone. In other settings, some advocated a possible action for sICAM as a competitive inhibitor of ICAM-1/LFA-1 interaction (9-11). Others have reported sICAM ability to induce intracellular signalling and produce inflammatory mediators such as tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interferon- $\gamma$ , interleukin-6 (IL-6), macrophage inflammatory protein-1 and 2 (MIP-1 $\alpha$ ; MIP-2), (12-15). Interestingly, TNF- $\alpha$ , IL-6 and MIP-1 $\alpha$  have all been described as modulator of osteoclast activity (16-19). However, it is unknown whether sICAM could affect osteoclast maturation and formation secondary to this action on osteoclast differentiation factors (ODF).

Finally, it was demonstrated that both ICAM-1 and sICAM could affect cell viability in bone. The ICAM-1<sup>+</sup> - osteoblast phenotype, which is capable of supporting osteoclast differentiation as oppose to the ICAM-1<sup>-</sup> phenotype, appears to decrease osteoblast survival while the presence of sICAM tend to protect the osteoblast against cell death (20, 21).

Therefore, the objective of this study is to clarify the actions of ICAM-1 and sICAM in osteoclast formation and function. Specifically we questioned: 1) Does sICAM affect osteoclast differentiation and function and if so, can it be explained through a modification of the ODF profile or cell viability? 2) Does the engagement of ICAM-1 affect the RANKL, RANK and osteoprotegerin (OPG) axis? Our hypothesis is

that both ICAM-1 and sICAM play an active role in the formation and function of OC through an effect on the RANKL/RANK/OPG axis and/or cell survival.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Isolation and culture of human monocytes**

Monocytes were isolated from the peripheral blood of 3 healthy male subjects (age range 31 – 38), diluted 1:1 in  $\alpha$  minimal essential medium (MEM; Sigma, St.Louis, MO, USA) and 3 volumes of blood mixture layered onto 1 volume of Ficoll-paque (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). After a centrifugation of 20 min at 693g, the interface layer was resuspended in MEM and centrifuged for 10 min at 510g. Cells were then incubated 20 min at 4°C with MACS CD14 Microbeads (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) and passed through MACS magnetic cell separator. Sorted CD14<sup>+</sup> fraction was washed, resuspended in MEM and counted in a haemocytometer following lysis of red blood cells by a 5% (v/v) acetic acid solution.  $2 \times 10^6$  peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in MEM were added to 12-well culture plates or  $1 \times 10^6$  PBMCs added to 16-well BD BioCoat™ Osteologic™ Bone Cell Culture System plate (BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada) for 2 hours at 37° C in 5% CO<sub>2</sub> and then cultures were rinse with the medium to remove non adherent cells.

Cells were cultured in MEM, 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin and 100 g/ml streptomycin (Wisent, St.Bruno, QC, Canada; MEM/FBS) at 37° C in 5% CO<sub>2</sub> either on 12-well culture plate or on 16-well BD BioCoat™ Osteologic™ Bone Cell Culture System plate. Medium was changed every 3 days and supplemented or not with appropriate cytokines as per specific experimental conditions tested.

### **Co-cultures of osteoblast and monocytes**

Human normal osteoblasts were purchased from Promocell (Heidelberg, Germany) and cultured in 25 cm<sup>2</sup> plastic cell culture flasks (Corning, NY, USA) with BGJb media containing 10% FBS until confluency. Once confluent, osteoblasts were stimulated overnight with 10 ng/ml of TNF- $\alpha$  (to increase ICAM-1 expression), then removed from the flask and added to pre-incubated human monocytes (M-CSF 50 ng/ml for 72h) on 12-well plate or on 16-well BD BioCoat™ Osteologic™ Bone Cell Culture System plate in a ratio of 1:10. Cells were washed with culture media after 8 hours and incubated with or without M-CSF (50 ng/ml), sICAM (100 ng/ml or 2  $\mu$ g/ml), AntiCD54 antibody (2  $\mu$ g/ml) or soluble RANKL (30 ng/ml). Medium was replaced twice a week and supernatants kept for further testing.

### **Assessment of Osteoclast formation**

After 20 days of incubation with various mediators, osteoclast formation was assessed by the presence of osteoclast-derived TRAP 5b in the supernatant of the BD BioCoat™ Osteologic™ Bone Cell Culture System plate (n=8). TRAP-5b was measured in samples (duplicate) using an ELISA kit purchased from Suomen Bioanalytiikka Oy (Turku, Finland) and corresponds to the supernatant of days 17 to 20 of our experiment. Assay sensitivity is 0.06 U/l and experiments were performed according to the manufacturer's specifications. Absorbance was measured with a microELISA Vmax photometer (Molecular Devices Corp.).

### **Assessment of Osteoclast function**

Functional evidence of osteoclast formation was evaluated by measuring the resorption area on the BD BioCoat™ Osteologic™ Bone Cell Culture System plate after 20 days of culture. Cells were first washed from wells using NH<sub>4</sub>OH 1N for 3 periods of 5 minutes and then rinsed in PBS. Resorption area was determined using Microst Automated Image Analyzer (Millenium Biologix, Mississauga, ON, Canada). Specimens were read twice and the results expressed as percentage of resorption of the substrate (n=8).

#### **Osteoclast differentiation factors production from monocytes and osteoblasts**

Monocytes cultures in 12-well plates were stimulated with M-CSF (50 ng/ml) and sRANKL (30 ng/ml) for 10 days before sICAM (100 ng/ml or 1 µg/ml) was added for 16 hours at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Osteoblasts on 12-well plates were incubated overnight with 10 ng/ml of TNF-α, washed 3 times with PBS and stimulated for 16 hours at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> with or without anti-ICAM-1 monoclonal antibody (mAb; Dako, Mississauga, ON, Canada) (100 ng/ml, 500 ng/ml or 1 µg/ml).

Osteoclast differentiation factor mRNA expression (Table 1) was next verified with reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). Total RNA was extracted from PBMC or osteoblasts using TRIzol reagent (Invitrogen life technologies, Burlington, ON, Canada) according to the manufacturer's specifications. After precipitation, pellets were washed in 70% ethanol, resuspended in RNase-free water, the amount determined using SyberGreen and then stored at -80°C. RT-PCR cDNA synthesis was carried out using 1 µg of total RNA and a SuperScript one-step RT-PCR kit manufactured by Invitrogen life technologies. The oligonucleotide primers were specific for every ODF tested and for glyceraldehydes-3-phosphatase dehydrogenase

(GAPDH), which served as control (Table 1). The PCR products were analyzed and verified by electrophoresis on 1.2% agarose gels in a Tris-borate-EDTA buffer. Semiquantitative measurements of the reaction products were made by taking density readings using a digital imaging system (A G-image 2000, Canberra Packard Canada, Mississauga, ON, Canada). Results were calculated as relative units to GAPDH expression.

### **Cell viability**

PBMC were plated onto 12-well plates in MEM/FBS and incubated for 10 days with M-CSF (50 ng/ml) and sRANKL (30 ng/ml) to stimulate their differentiation in pre-osteoclast (5% CO<sub>2</sub> at 37<sup>0</sup>C). Media was changed every 3 days and supplied with cytokines. At 10 days, pre-osteoclast were rested overnight in mediator free media before the addition of increasing concentration of sICAM for 24h. Normal human osteoblast were plated onto 12-well plates and cultured overnight in BGJb +10% FBS +1% PS (5% CO<sub>2</sub> at 37<sup>0</sup>C) before the addition of increasing concentrations of anti-ICAM-1 mAb for 24h. At the end of incubation with sICAM or anti-ICAM-1 mAb, an MTT assay was performed. Briefly, pre-osteoclast and osteoblast cultures were washed with PBS and 500µl of culture medium containing 50µl of MTT reagent was added for 1h before the absorbance measured at 440 nm (5% CO<sub>2</sub> at 37<sup>0</sup>C). Each condition was repeated 5 times (n=5).

### **Statistical analysis**

The results are expressed as mean ± SEM. Assays were performed in duplicate. The data were analyzed statistically by the two-tailed Mann-Whitney U-test. P-values < 0.05 were considered significant.



## RESULTS

First, we wanted to verify whether sICAM could induce the differentiation of human monocytes into osteoclasts. Figure 1 shows TRAP-5b activity following incubation of monocytes with sICAM and mediators known for their ability to induce osteoclast from monocytes *in vitro*. In this setting, TRAP-5b activity measured from supernatant of human monocytes cultures reflects the number of osteoclasts formed. Compared to control, significant changes in TRAP-5b activity were observed when monocytes were incubated with sRANKL alone ( $p < 0.005$ ) or in combination with M-CSF ( $p < 0.001$ ), which serves as a positive control. However, no significant change in TRAP-5b activity was demonstrated following sICAM stimulation alone. The combination of sICAM and sRANKL induced the highest TRAP-5b activity, but this failed to reach significance when compared to sRANKL stimulation alone. These results indicate that sICAM does not influence the differentiation of monocytes into OC *in vitro*.

We then sought to determine if sICAM could influence resorption capacity of OC formed from human monocytes *in vitro* (Figure 2). Interestingly, compared to control, there was a 3-time increase in resorption area when cells were stimulated with sICAM alone ( $p < 0.02$ ), while incubation with sRANKL alone resulted in a 4-fold increase in resorption area ( $p < 0.009$ ). The combined effect of M-CSF and sRANKL, resulted in a 5-fold increase in resorption surface ( $p < 0.002$ ). The most important increase in osteoclast resorption activity was observed when sICAM and sRANKL were combined together (6.5-fold increase;  $p < 0.0001$ ). Significance was also reached when the combined effect of sICAM and sRANKL was compared to the effect of each mediator taken individually

(sICAM + sRANKL vs sICAM:  $p < 0.0004$ ; sICAM + sRANKL vs sRANKL:  $p < 0.04$ ). Taken together, these results indicate that sICAM can positively modulate osteoclast function.

To verify to which extent sICAM could actually affect osteoclast maturation when compared to membrane-bound ICAM-1, we co-cultured osteoblasts with monocytes in different conditions and looked at osteoclast formation (Figure 3). When compared to control, the addition of anti-ICAM-1 mAb almost completely inhibited osteoclast formation, whilst sICAM did not significantly modify TRAP 5b activity. However, osteoclast function (Figure 4), as measured by resorption area in wells, was significantly increased in the presence of sICAM (2.6-fold) whilst anti-ICAM-1 mAb significantly inhibited it. Comparing monocultures and co-cultures (Figure 2 and 4), it is interesting to note that sICAM induces the same increase in the resorption area in both culture systems (close to 2.5-fold), confirming its importance. Further, in co-culture, both TRAP 5b activity and the resorption area following the addition of anti-ICAM-1 mAb are similar to values observed in monoculture.

We next evaluated if the effect of both ICAM-1 and sICAM on osteoclastogenesis could be explained in part by their respective actions on OPG/RANK/RANKL axis (Figure 5). sICAM did not affect the expression of in pre-osteoclast (not shown). However, RANKL expression by osteoblasts was significantly increased when ICAM-1 engagement occurred (2-fold,  $p \leq 0.01$ ). These results show that ICAM-1 does play a direct role in osteoclast formation and function in addition to its role as a stabilizer of osteoblast and pre-osteoclast. However, the action of sICAM in this setting does not appear to be secondary to an effect on ODF expression.

Finally, we tested the effect of sICAM and ICAM-1 on pre-osteoclast and osteoblast survival respectively (Figure 6). sICAM induced a significant increase in pre-osteoclast survival compared to control (20% increase) as opposed to anti-ICAM-1 mAb, which induced a 20% decrease in osteoblast viability. This indicates the ability of both mediators to modify cell survival.

## DISCUSSION

Cell-cell interactions between the osteoblasts/stromal cells and osteoclasts precursors are considered a prerequisite for osteoclast maturation and function (5, 6, 22-24). Some of these interactions are mediated through adhesion molecules such as ICAM-1, whose membrane expression in osteoblast was previously described (8, 20). Because its presence on osteoblast is increased following exposure to mediators involved in osteoclast maturation and because both osteoclast maturation and function can be blocked by antibody directed against it, ICAM-1 is considered an important mediator in osteoclastogenesis (4-6). However, apart from providing a high affinity adhesion between the osteoblast and the osteoclast precursor, no other action has been described so far for ICAM-1 in the setting of bone metabolism (4). Further, we are not aware of any reports on the potential role of sICAM in osteoclast development. In this study, we report for the first time that sICAM does increase osteoclast function which is intriguingly not associated with an increase in osteoclast recruitment. Moreover, we also report for the first time that ICAM-1 engagement increases RANKL mRNA expression in osteoblasts.

The finding of an isolated increase in osteoclast function following exposure to sICAM without a concomitant increase in osteoclast number is intriguing. sICAM does

not appear to affect the production of major osteoclast differentiation factors nor does it change RANK expression. It would therefore appear that sICAM is able to increase the amount of bone that each individual osteoclast can remodel, at least in part through increased survival. Interestingly, in studies looking at osteoclast activity, mediators such as IL-1 $\alpha$  and BMP-2 have recently been identified to act solely on osteoclast function and not on osteoclastogenesis through mechanisms still unknown (25, 26). Potential targets of such mediators could either be degradative enzymes such as cathepsin K or metalloproteinases, or osteoclast survival. Although no relation between degradative enzymes and sICAM has been reported in the literature, sICAM ability to confer cellular protection against apoptosis in a multiple myeloma setting has been described (21). Whether sICAM is actually protecting the osteoclast against apoptosis allowing it to resorb more bone remains to be shown, but it does appear that sICAM possesses the ability to increase pre-osteoclast survival.

On the other hand, the increase in RANKL mRNA expression in osteoblast following ICAM-1 engagement would postulate in favour of an active role of ICAM-1 in osteoclastogenesis both by supporting cellular adhesion (facilitating RANKL/RANK interaction) but also by increasing RANKL expression by osteoblasts, which has never been reported. It has been previously described that ICAM-1<sup>+</sup> osteoblasts could support osteoclastogenesis but did not proliferate well being stopped in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase of the cell cycle (20). It has also been shown that co-cultures of osteoblasts and osteoclast precursors result in a decrease in alkaline phosphatase activity and presumably a decrease in bone matrix deposition (27). Further, the same group stated that ICAM-1<sup>+</sup> osteoblast might be apoptotic because of increased Fas and c-Myc expression combined with

reduced bcl-2 expression (20). Finally, osteoblast adhesion to myeloma cells mediated through ICAM-1 appeared to promote the transduction of apoptogenic signals (21). Taken together with the decrease in osteoblast survival following ICAM-1 engagement demonstrated in this study, these observations could imply that osteoblast/pre-osteoclast adhesion through ICAM-1 would result in a dual effect on bone homeostasis. We therefore propose the following actions for ICAM-1 in osteoclast biology. First, engagement of the ICAM-1/LFA-1 axis would lead to an increase in RANKL expression and provide a high affinity link between osteoblasts and osteoclast precursors, facilitating RANKL/RANK interaction and therefore osteoclastogenesis. At the same time, the arrest of osteoblast proliferation combined with the generation of apoptotic signals in these cells would lead to a reduction of bone matrix deposition favouring an overall imbalance between bone resorption and bone formation. Moreover, the presence of sICAM (and possibly the engagement of ICAM-1 with LFA-1 on osteoclast precursors) would lead to an increase in osteoclast function at least in part through increased survival.

Limitations of this study include the limited number of osteoclast differentiation factors tested following sICAM stimulation and the timing at which the experiments were conducted given that we screened for mRNA production at the fusion stage of osteoclast development. It is possible that the recorded effect of sICAM on osteoclast function is secondary to the generation of untested mediators or on mediators tested but secreted later in the maturation/activation process. Further, by studying both differentiation and function at the same time, it becomes difficult to assess the effect of sICAM on bone resorption only, because of the simultaneous presence of PBMC, pre-osteoclast, resting osteoclasts and active osteoclasts in culture. Fuller et al recently described an experiment

where mature, active osteoclasts were sedimented on bone slices allowing the study of activation only (25). We are now planning such experiments to clarify the action of sICAM, mainly looking at its effect on apoptosis.

In this study, we wanted to determine the ability of sICAM and ICAM-1 to modify osteoclast recruitment and function. Although not affecting osteoclast recruitment, sICAM can increase bone resorption at least in part through increase pre-osteoclast survival. Further, in addition to providing a high affinity adhesion between osteoblasts and osteoclast precursors, ICAM-1 can stimulate RANKL expression thereby providing a positive effect in osteoclast maturation and function. In light of these results and based on previous animal and clinical trials targeting ICAM-1 in rheumatoid arthritis and multiple myeloma, it appears that the ICAM-1/LFA-1 axis is an important regulator in osteoclast physiology and osteoclast-dependent diseases.

**Table 1. RT-PCR primers**

| <b>MOLECULES</b> | <b>PRIMERS</b>                      |
|------------------|-------------------------------------|
| GAPDH            | 5'-CCACCCATGGCAAATCCATGGCA-3'(s)    |
|                  | 5'-TCTAGACGGCAGGTCAGGTCCAQCC-3'(as) |
| RANKL            | 5'-GCCAGTGGGAGATGTTAG-3'(s)         |
|                  | 5'-TTAGCTGCAAGTTTTCCC-3'(as)        |
| RANK             | 5'-TTAAGCCAGTGCTTCACGGG-3'(s)       |
|                  | 5'-ACGTAGACCACGATGATGTCCG-3'(as)    |
| OPG              | 5'-GCTAACCTCACCTTCGAG-3'(s)         |
|                  | 5'-TGATTGGACCTGGTTACC-3'(as)        |

## LEGENDS

**Figure 1. Differentiation of human monocytes into osteoclast.** PBMC were cultured for 20 days onto BD BioCoat™ Osteologic™ Bone Cell Culture System plate (n=8). Osteoclast formation was assed by an ELISA specific for osteoclast-derived TRAP 5b released in the supernatant (days 17 to 20). Results are expressed as mean +/- SEM. \*p≤0.05 group vs control. M-CSF 50 ng/ml, sRANKL 30 ng/ml, sICAM 1µg/ml.

**Figure 2. Resorption area following monocytes stimulation with various mediators.** PBMC were cultured for 20 days onto BD BioCoat™ Osteologic™ Bone Cell Culture System plate (n=8). Osteoclast function was assed by computer analysis of the resorption area. Results are expressed as mean +/- SEM. \*p≤0.05 group vs control. M-CSF 50 ng/ml, sRANKL 30 ng/ml, sICAM 1µg/ml.

**Figure 3. TRAP-5b activity following co-culture of human pre-osteoclast and osteoblast with various mediators.** Osteoblast and PBMC were plated onto BD BioCoat™ Osteologic™ Bone Cell Culture System plate (n=8) for 20 days. Osteoclast formation was assed by an ELISA specific for osteoclast-derived TRAP 5b released in the supernatant (days 17 to 20). Results are expressed as mean +/- SEM. \*p≤0.05 group vs control. M-CSF 50 ng/ml, sRANKL 30 ng/ml, anti-ICAM-1 mAb 2µg/ml.

**Figure 4. Resorption area following co-culture of human pre-osteoclast and osteoblast with various mediators.** Osteoblast and PBMC were plated onto BD BioCoat™ Osteologic™ Bone Cell Culture System plate (n=8) for 20 days. Osteoclast function was assed by computer analysis of the resorption area. Results are expressed as mean +/- SEM. \*p≤0.001 group vs control; \*\*p≤0.01 group vs control; §p≤0.0001 group vs control. M-CSF 50 ng/ml, sRANKL 30 ng/ml, anti-ICAM-1 2µg/ml.



**Figure 5. RANKL and OPG expression by human Ob following ICAM-1 engagement.** Normal human osteoblasts were cultured overnight with increasing concentrations of anti-ICAM-1 mAb. **A)** RANKL, OPG and GAPDH expression were analyzed with semi-quantitative RT-PCR. **B)** Results expressed as the ratio of RANKL/GAPDH or OPG/GAPDH band intensity and represent the mean and the SEM of 4 different experiments (n=4). \* $p \leq 0.01$  group vs control.

**Figure 6. Survival analysis of PBMC and normal human osteoblasts following incubation with sICAM or Anti-ICAM-1 mAb.** **A)** Pre-osteoclast incubated overnight with increasing concentration of sICAM and **B)** normal human osteoblasts incubated overnight with increasing concentration of anti-ICAM-1 mAb were submitted to an MTT assay and cell viability recorded. Results are expressed as mean +/- SEM (n=5).

**Figure 1. Differentiation of human monocytes into osteoclast.**

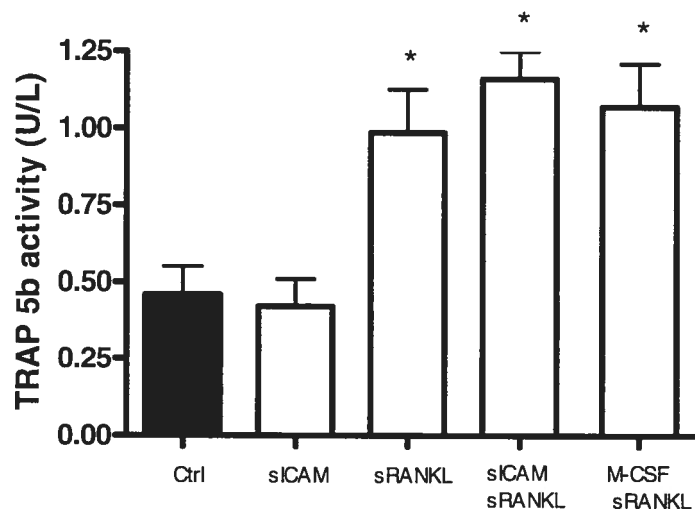


Figure 2. Resorption area following monocytes stimulation with various mediators

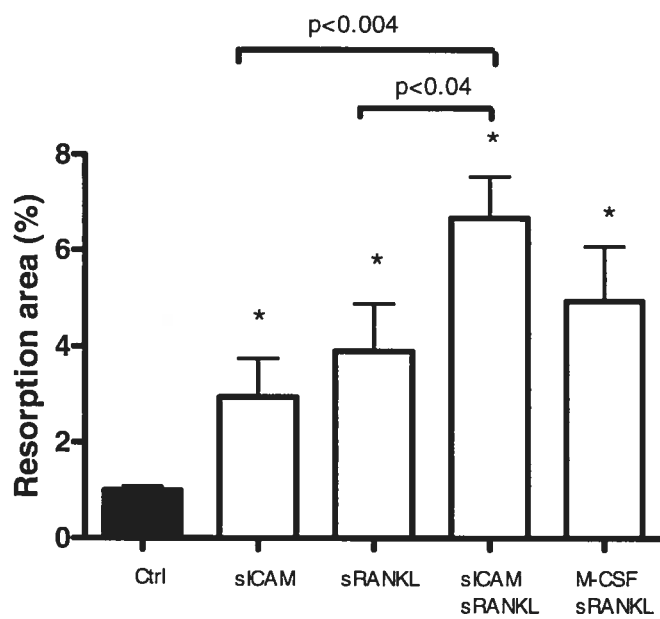


Figure 3. TRAP-5b activity following co-culture of human pre-osteoclast and osteoblast with various mediators

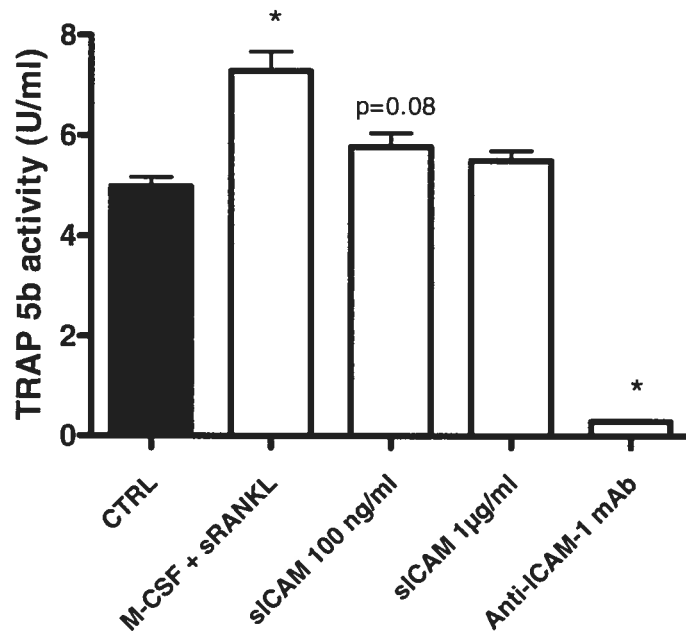
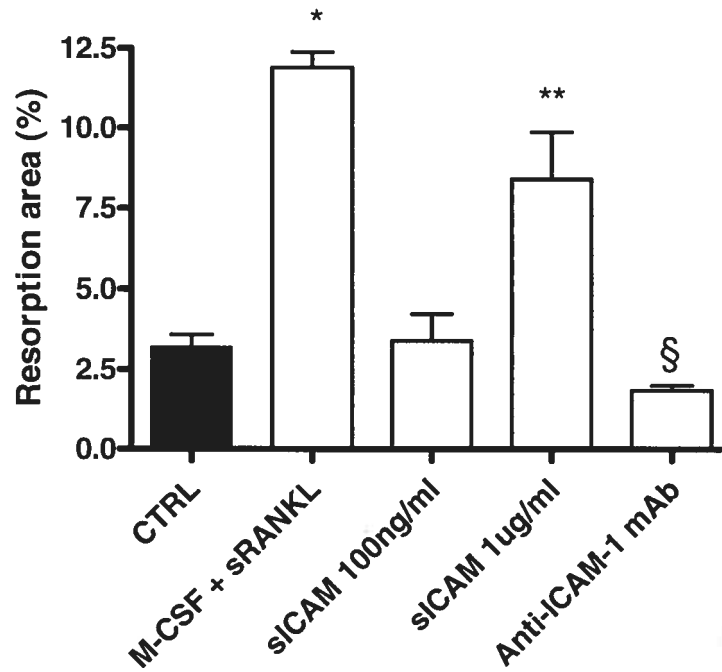
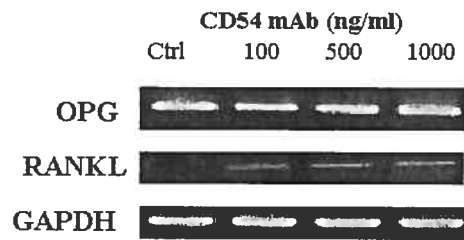


Figure 4. Resorption area following co-culture of human pre-osteoclast and osteoblast with various mediators



**Figure 5. RANKL and OPG expression by human Ob following ICAM-1 engagement**

A)



B)

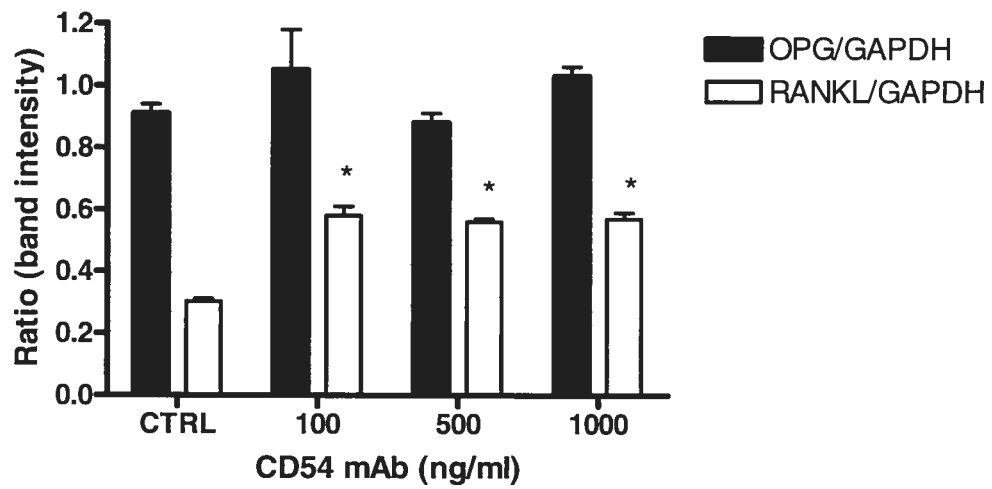
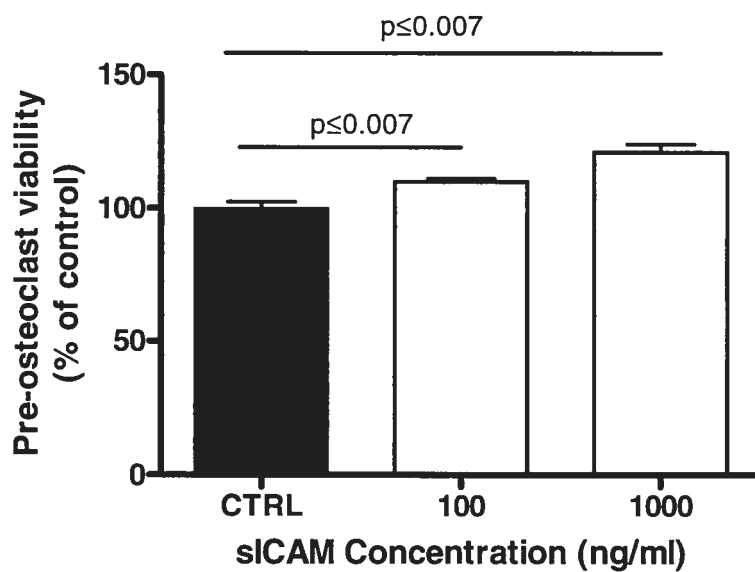
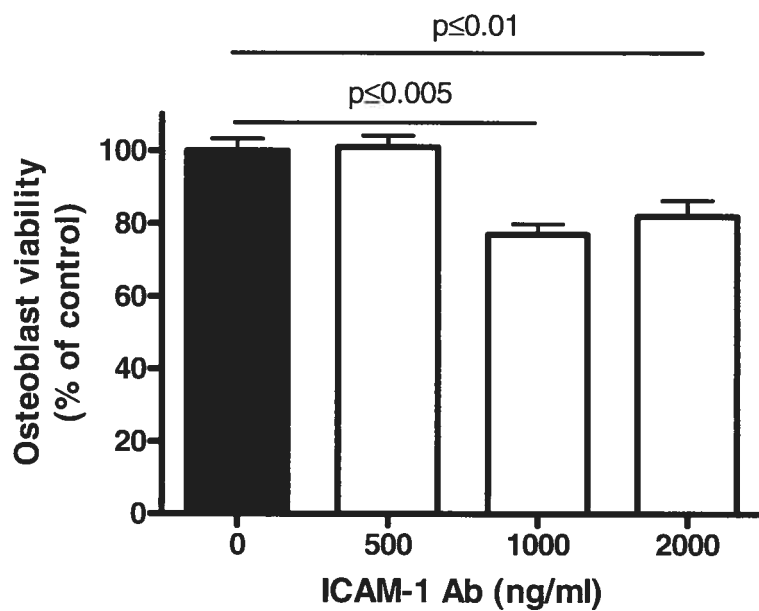


Figure 6. Survival analysis of PBMC and normal human osteoblasts following incubation with sICAM or Anti-ICAM-1 mAb.

A)



B)



## Reference List

1. Rodan GA, Martin TJ 9/1/2000 Therapeutic approaches to bone diseases. *Science* 289:1508-1514.
2. Hofbauer LC, Heufelder AE 8/1998 Osteoprotegerin and its cognate ligand: a new paradigm of osteoclastogenesis. *Eur J Endocrinol* 139:152-154.
3. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T 3/31/1998 Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3597-3602.
4. Okada Y, Morimoto I, Ura K, Watanabe K, Eto S, Kumegawa M, Raisz L, Pilbeam C, Tanaka Y 8/2002 Cell-to-Cell adhesion via intercellular adhesion molecule-1 and leukocyte function-associated antigen-1 pathway is involved in 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$ , PTH and IL-1 $\alpha$ -induced osteoclast differentiation and bone resorption *Endocr J* 49:483-495.
5. Kurachi T, Morita I, Murota S 9/13/1993 Involvement of adhesion molecules LFA-1 and ICAM-1 in osteoclast development. *Biochim Biophys Acta* 1178:259-266.
6. Harada H, Kukita T, Kukita A, Iwamoto Y, Iijima T 9/1998 Involvement of lymphocyte function-associated antigen-1 and intercellular adhesion molecule-1 in osteoclastogenesis: a possible role in direct interaction between osteoclast precursors. *Endocrinology* 139:3967-3975.
7. Lavigne P, Benderdour M, Shi Q, Lajeunesse D, Fernandes JC 3/2005 Involvement of ICAM-1 in bone metabolism: a potential target in the treatment of bone diseases? *Expert Opin Biol Ther* 5:313-320.
8. Lavigne P, Benderdour M, Lajeunesse D, Shi Q, Fernandes JC 8/2004 Expression of ICAM-1 by osteoblasts in healthy individuals and in patients suffering from osteoarthritis and osteoporosis. *Bone* 35:463-470.
9. Rieckmann P, Michel U, Albrecht M, Bruck W, Wockel L, Felgenhauer K 7/1995 Soluble forms of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) block lymphocyte attachment to cerebral endothelial cells *J Neuroimmunol* 60:9-15.
10. Kusterer K, Bojunga J, Enghofer M, Heidenthal E, Usadel KH, Kolb H, Martin S 8/1998 Soluble ICAM-1 reduces leukocyte adhesion to vascular endothelium in ischemia-reperfusion injury in mice. *Am J Physiol* 275:G377-G380.



11. Myers DE, Collier FM, Minkin C, Wang H, Holloway WR, Malakellis M, Nicholson GC 12/17/1999 Expression of functional RANK on mature rat and human osteoclasts. *FEBS Lett* 463:295-300.
12. Lukacs NW, Chensue SW, Strieter RM, Warmington K, Kunkel SL 6/15/1994 Inflammatory granuloma formation is mediated by TNF-alpha-inducible intercellular adhesion molecule-1. *J Immunol* 152:5883-5889.
13. McCabe SM, Riddle L, Nakamura GR, Prashad H, Mehta A, Berman PW, Jardieu P 9/1993 sICAM-1 enhances cytokine production stimulated by alloantigen. *Cell Immunol* 150:364-375.
14. Schmal H, Czermak BJ, Lentsch AB, Bless NM, Beck-Schimmer B, Friedl HP, Ward PA 10/1/1998 Soluble ICAM-1 activates lung macrophages and enhances lung injury. *J Immunol* 161:3685-3693.
15. Van Seventer GA, Shimizu Y, Horgan KJ, Shaw S 6/15/1990 The LFA-1 ligand ICAM-1 provides an important costimulatory signal for T cell receptor-mediated activation of resting T cells. *J Immunol* 144:4579-4586.
16. Konig A, Muhlbauer RC, Fleisch H 12/1988 Tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 stimulate bone resorption in vivo as measured by urinary [3H]tetracycline excretion from prelabeled mice. *J Bone Miner Res* 3:621-627.
17. Kotake S, Sato K, Kim KJ, Takahashi N, Udagawa N, Nakamura I, Yamaguchi A, Kishimoto T, Suda T, Kashiwazaki S 1/1996 Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptors in the synovial fluids from rheumatoid arthritis patients are responsible for osteoclast-like cell formation. *J Bone Miner Res* 11:88-95.
18. Kukita T, Nomiyama H, Ohmoto Y, Kukita A, Shuto T, Hotokebuchi T, Sugioka Y, Miura R, Iijima T 3/1997 Macrophage inflammatory protein-1 alpha (LD78) expressed in human bone marrow: its role in regulation of hematopoiesis and osteoclast recruitment. *Lab Invest* 76:399-406.
19. Thomson BM, Mundy GR, Chambers TJ 2/1/1987 Tumor necrosis factors alpha and beta induce osteoblastic cells to stimulate osteoclastic bone resorption. *J Immunol* 138:775-779.
20. Tanaka Y, Maruo A, Fujii K, Nomi M, Nakamura T, Eto S, Minami Y 10/2000 Intercellular adhesion molecule 1 discriminates functionally different populations of human osteoblasts: characteristic involvement of cell cycle regulators. *J Bone Miner Res* 15:1912-1923.
21. Silvestris F, Cafforio P, Calvani N, Dammacco F 8/2004 Impaired osteoblastogenesis in myeloma bone disease: role of upregulated apoptosis by cytokines and malignant plasma cells. *Br J Haematol* 126:475-486.

22. Jimi E, Nakamura I, Amano H, Taguchi Y, Tsurukai T, Tamura M, Takahashi N, Suda T 8/1996 Osteoclast function is activated by osteoblastic cells through a mechanism involving cell-to-cell contact. *Endocrinology* 137:2187-2190.
23. Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, Sasaki T, Yamaguchi A, Kodama H, Martin TJ, Suda T 10/1989 The bone marrow-derived stromal cell lines MC3T3-G2/PA6 and ST2 support osteoclast-like cell differentiation in cocultures with mouse spleen cells. *Endocrinology* 125:1805-1813.
24. Tanaka Y, Morimoto I, Nakano Y, Okada Y, Hirota S, Nomura S, Nakamura T, Eto S 10/1995 Osteoblasts are regulated by the cellular adhesion through ICAM-1 and VCAM-1. *J Bone Miner Res* 10:1462-1469.
25. Fuller K, Kirstein B, Chambers TJ 4/2006 Murine osteoclast formation and function: differential regulation by humoral agents. *Endocrinology* 147:1979-1985.
26. Wildemann B, Kadow-Romacker A, Lubberstedt M, Raschke M, Haas NP, Schmidmaier G 1/2005 Differences in the fusion and resorption activity of human osteoclasts after stimulation with different growth factors released from a polylactide carrier. *Calcif Tissue Int* 76:50-55.
27. Orlandini SZ, Formigli L, Benvenuti S, Lasagni L, Franchi A, Masi L, Bernabei PA, Santini V, Brandi ML 7/1995 Functional and structural interactions between osteoblastic and preosteoclastic cells in vitro. *Cell Tissue Res* 281:33-42.

**4.4 ARTICLE 4: Expert Opinion on Biological Therapy 2005; 5 (3): 313-320.****Involvement of ICAM-1 in bone metabolism: a potential target in the treatment of bone diseases?**

<sup>1,2</sup>Patrick Lavigne, <sup>1</sup>Mohamed Benderdour, <sup>1</sup>Qin Shi, <sup>3</sup>Daniel Lajeunesse and <sup>1,3</sup>Julio C. Fernandes\*

<sup>1</sup>Orthopaedics Research Laboratory, Department of Orthopaedics, Centre hospitalier Sacré-Coeur, Montréal, Québec, Canada

<sup>2</sup>Department of Orthopaedics, Centre hospitalier Maisonneuve-Rosemont, Montréal, Québec, Canada

<sup>3</sup>Osteoarthritis Research Unit, Department of Orthopaedics, Centre hospitalier de l'Université de Montréal-Hôpital Notre-Dame, Montréal, Québec, Canada

**Tel:** (514) 338-2222 ext. 2489

**Fax:** (514) 338-2694

**Email:** [REDACTED]

\*To whom correspondence should be addressed

## Abstract

Bone diseases such as osteoporosis (OP), osteoarthritis (OA) and rheumatoid arthritis (RA) affect a great proportion of individuals with debilitating consequences in terms of pain and progressive limitation of function. Current treatment of these pathologies have been unable to alter the natural evolution of the disease and as such, a clearer understanding of the pathophysiology is necessary in order to generate new treatment alternatives. One therapeutic strategy could involve the targeting of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1).

In bone, ICAM-1 is expressed at the surface of osteoblasts (Ob) and its counter receptor, leucocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) at the surface of osteoclasts (Oc) precursors. ICAM-1 blockade between the Ob and the pre-Oc results in an inhibition of Oc recruitment and a modulation of inflammation, which could potentially help in controlling disease activity in bone pathologies. So far, clinical studies on ICAM-1 blockade in bone diseases were limited to RA. As new discoveries on the role of this adhesion molecule are being reported, ICAM-1 could become a potential target for other bone diseases as well.

## Introduction

ICAM-1 is a glycoprotein belonging to the immunoglobulin supergene family which mediates cellular interactions by binding to its counter receptor LFA-1 ( $\beta_2$

subfamily; CD11a/CD18) and Mac-1 (CD11b/CD18) [155, 156]. It contains 5 extracellular domains that spans the cell membrane and a short cytoplasmic tail, the first domain being responsible for LFA-1 binding while the third domain interacts with Mac-1 [156-159]. ICAM-1 is present at the surface of hematopoietic and non-hematopoietic cells. Its expression is upregulated in the presence of various inflammatory mediators, particularly tumor necrosis factor (TNF) - $\alpha$ , interleukin (IL) -1 and interferon (IFN) - $\gamma$  [160–162].

Adhesion molecules mediate interaction of cells to each other and between cells and extracellular matrix [163]. One important role attributed to ICAM-1 is control of inflammatory cell trafficking, allowing transendothelial migration from the blood to the tissues [155, 157]. Furthermore, leukocyte migration through ICAM-1 is believed to be an initiating step in angiogenesis [164, 165] while ICAM-1/LFA-1 interaction is also implicated in a multitude of autoimmune and inflammatory diseases, viral infection processes and cancer.

A soluble form of ICAM-1 (sICAM) is described although its generation is not completely understood and appears to be cell-type dependent. In endothelial cells, sICAM levels reflect membrane expression and proteolytic cleavage has been suggested as a potential mechanism of producing sICAM [166-168]. On the other hand, there are some reports about distinct mRNA coding for sICAM, suggesting more than one mode of sICAM production [169, 170]. The physiologic relevance of sICAM is however

controversial. In some settings, sICAM and ICAM-1 have a similar physiological role whereas in others, it appears that their action is opposite. For example, both ICAM-1 and sICAM are angiogenic whereas in bronchial epithelial cells, ICAM-1 promotes infectivity and sICAM prevents it [165, 170-172].

Unfortunately, ICAM-1 role in bone metabolism has not generated as much attention so far other than its application in RA. This review focuses on the implication of ICAM-1 in bone physiology and its potential application as a therapeutic target in bone diseases.

### **ICAM-1 and bone physiology**

Although there are many reports on the expression of ICAM-1 in RA tissues or synovial fluids, literature regarding the physiologic action of ICAM-1 in bone diseases is very scarce. Since the first report about the implication of ICAM-1 in Oc recruitment in 1993, there has been very few studies investigating the physiological action of ICAM-1 in bone. Kurachi in 1993 first reported decreased Oc formation and function following addition of anti-LFA-1 and anti-ICAM-1 in a coculture model of mouse spleen and stromal cells [4]. A few years later, Tanaka et al. demonstrated that ICAM-1 molecules were expressed at the surface of human Ob recovered from OA patients. Furthermore, adhesion of Ob through ICAM-1 induced IL-6 and IL-1 $\beta$  mRNA while cross-linking ICAM-1 with anti-CD54 antibody stimulated IL-6 production by the Ob. They concluded

that an intracellular signal was transduced following ICAM-1/LFA-1 interaction resulting in the formation of bone resorbing cytokines [5].

The same group also reported that Ob could be separated in 2 subsets based on ICAM-1 expression at the surface of human Ob. The ICAM-1<sup>+</sup> subgroup was characterized by higher adhesion to Oc precursors and superior production of osteoclast differentiation factor (ODF) than ICAM-1<sup>-</sup> subset. The ICAM-1<sup>+</sup> Ob was also able to induce Oc-like cell formation, a property not shared by ICAM-1<sup>-</sup> Ob, and the addition of anti-ICAM-1 monoclonal antibody (mAb) resulted in an inhibition of Oc-cell formation by ICAM-1<sup>+</sup> Ob. They concluded that the high affinity adhesion provided by the interaction between ICAM-1 and LFA-1 was necessary to maximize ODF function during Oc maturation [6].

These studies have demonstrated the importance of ICAM-1/LFA-1 interaction in Oc formation. To date, no other function than stabilizing the Ob and the Oc precursor, with the resultant facilitation of RANK/RANKL ligation has been postulated so far for ICAM-1 in this process. However, many studies have reported anomalies in the expression of ICAM-1 or in the production of sICAM in bone pathologies, but these are unfortunately mainly descriptive reports. In order to physiologically relate ICAM-1 to anomalies in bone metabolism, further studies are needed focussing on intracellular changes in Ob and pre-Oc following cellular adhesion through ICAM-1.

### **ICAM-1 in bone pathologies**

Alterations in inflammatory modulation and dysregulation in Oc control resulting in bone loss are key components of skeletal pathologies. While no exact physiological role has been shown for ICAM-1 in bone diseases, many studies have evaluated the presence of membrane-bound ICAM-1 and the presence of sICAM in RA, OA and OP and are reported in the following sections.

#### *ICAM-1 in RA*

It is generally accepted that the infiltration of leukocytes in the inflamed tissues plays a central role in the pathogenesis of RA [173]. In view of ICAM-1 capacity to regulate transendothelial migration of leukocytes into areas of inflammation, many studies have evaluated adhesion molecules and its implication in the pathophysiology of RA.

ICAM-1 was shown to be primarily distributed on endothelial cells of the synovium in RA and its expression was more important in pathological state than in normal tissues [174-176]. ICAM-1 was also strongly expressed at the pannus/cartilage junction, on synovial lining macrophages, fibroblasts and leukocytes [174, 176-183]. Inflammatory mediators found in RA such as IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  have all been shown to increase ICAM-1 expression and cellular adhesion in various settings [160, 181, 184-186].



Furthermore, serum sICAM levels were shown to be elevated in RA and in rheumatoid vasculitis patients when compared to normal individuals [187-192]. Although conflicting reports exist regarding sICAM levels and disease activity [188, 191, 193-195], recent reports implicate sICAM in vascular damage rather than articular destruction in RA [196].

Cell-cell interaction between leukocytes and RA synovial fibroblasts mediated through ICAM-1 resulted in increased production of macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ , again implicating ICAM-1 in inflammatory cell trafficking [197]. Interestingly, OA and RA synovial cells apparently seem to be regulated in a pathology-dependent manner. ICAM-1 and RANKL expression in RA synovial fibroblasts were shown to be induced by fibroblast growth factor-2 with the resultant increase in Oc maturation, a property not shared by OA synovial fibroblast [198]. Also, engagement of  $\beta_1$  integrin was able to upregulate ICAM-1 and Fas on RA synovial cells, leading to increased Fas-mediated apoptosis, a phenomenon again not observed in OA synovium [1].

Taken together, these reports suggests a particular ICAM-1 expression in RA articular cells. This pattern of ICAM-1 expression is probably secondary to the influence of inflammatory mediators on RA cells. Increase ICAM-1 expression potentially allow the recruitment of more inflammatory cells, the production of more inflammatory mediators and therefore, the generation of the inflammatory cascade found in RA.

*ICAM-1 in OA*

Although OA and RA cells do not behave in the same manner, ICAM-1 is also involved in the pathophysiology of OA. OA is the most prevalent joint disease in the world resulting in disabling pain and loss of function. Although its pathophysiology is not well understood, interactions between bone and cartilage combined with abnormal mechanical loading of the articulation plays a prominent role in the development of the pathology.

ICAM-1 has been reported in OA tissues and implicated in mediation of inflammation and apoptosis. It was described that ICAM-1 expression on OA Ob could discriminate 2 different population of Ob, the ICAM-1<sup>+</sup> subset having the ability to recruit OC, a property not shared by ICAM-1<sup>-</sup> Ob [6]. Furthermore, the ICAM-1<sup>+</sup> subset was reported to produce more IL-6 and we have shown an increased IL-6 and prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) production from ICAM-1<sup>+</sup> OA Ob [6, 199]. The report of a particular ICAM-1 expression from OA Ob combined with increased IL-6 and PGE<sub>2</sub>, two bone resorbing mediators, indicate an altered bone metabolism in OA possibly mediated, at least in part, by ICAM-1.

Interestingly, conflicting reports exist about ICAM-1 expression on OA chondrocytes. While, very weak ICAM-1 and LFA-1 expression was reported in normal synovium [200], normal [201] and OA chondrocytes [202, 203], others have shown that ICAM-1 was induced on chondrocytes in inflammatory conditions [201] and that ICAM-1 was highly expressed on OA chondrocytes [204]. Furthermore, ICAM-1 is believed to

promote cytotoxic killing of chondrocytes in infiltrated areas of cartilage via CD11 receptor on T cells [205] while protecting chondrocytes from apoptosis by binding hyaluronan [204].

While the exact meaning of these findings remains to be clarified, ICAM-1 implication in cell-cell signalling and its presence in OA makes it a possible pivotal player in cross-talk between bone and cartilage in the pathogenesis of OA.

#### *ICAM-1 in OP*

According to the World Health Organization (WHO), OP is the most common metabolic bone disorder, as it affects more than one woman out of three [206]. OP results from an imbalance between bone resorption and bone formation. At the cellular level, the Oc removes more bone than the Ob is able to form, which translates into a reduction of total bone mass.

There has not been much attention directed to ICAM-1 in OP. We have reported that ICAM-1 was specifically expressed at the surface of Ob recovered from osteoporotic patients when compared to Ob taken from healthy individuals [199]. We have proposed that the degree of ICAM-1 expression on the Ob was a reflection of the capacity of the Ob to recruit Oc and therefore shift the balance of bone homeostasis toward resorption.

Gao et al, in an elegant study in an ovariectomized mouse model, reported increased ICAM-1 expression on spleen cells when compared to non-ovariectomized mice spleen cells [207]. They have postulated that estrogen deficiency was resulting in higher ICAM-1 expression on Oc precursors and could account, at least in part, for the increased resorption state in OP.

### **ICAM-1 as a therapeutic target**

Because of its ability to modulate inflammation, ICAM-1 has been used as a target for a many different diseases. Clinical studies using humanised mAb directed at ICAM-1 or LFA-1 have reported improvement in clinical outcome with a good safety profile. As this review focuses on bone pathologies, we refer the reader to excellent reviews describing the inhibition of ICAM-1/LFA-1 interaction in other settings [208-211].

Different studies have reported modification of ICAM-1 expression profile following conventional drug treatment in RA. Methylprednisolone [212], Methotrexate [213, 214], Leflunomide [213, 214] and its active metabolite [215], nonsteroidal antiinflammatory drugs and colchicine have all been described to reduce ICAM-1 expression. Smith et al have also reported, evaluating different anti-RA drugs, that ICAM-1 expression was lowered in patients with a clinical response to these drugs [200]. The importance of these observations is that a reduction of ICAM-1 expression could impair leukocyte trafficking, modify clinical symptoms and potentially prevent

progression of the disease. When tested in animal models, development of arthritis was altered by administration of mAb directed against ICAM-1 or LFA-1, providing evidence of the key role played by ICAM-1 in RA [195, 216-218].

Human studies have also provided insights into the potential of ICAM-1 as a therapeutic target in bone pathologies. In a study on refractory RA, Kavanaugh et al have demonstrated the potential of mAb in the treatment of RA. 32 patients with RA who had tried at least 2 different disease-modifying antirheumatic drugs without much benefits were enrolled in this study and given a mouse antiCD54 mAb (IgG2a). Of the 23 patients who received a 5-day treatment, clinical improvement was reported in 13 patients for 29 days and in 9 for 60 days. Side effects were minor and consisted primarily of headaches, fever and pruritus [219]. The same group also reported on 10 patients with early RA treated with the same mAb (IgG2a). 7 out of 10 patients showed a marked or moderate response to the treatment for a month, while 3 patients demonstrated prolonged effect for more than 7 months. Again, side effects were minor and comparable to their first study [220]. However, when a second course of treatment was administered to 8 patients, adverse effects included urticaria, angioedema, petechial rash, myalgia/arthritis in addition to the same side effects reported in previous studies [221]. The importance of side effects led to the conclusion that repeated infusion of this mouse mAb was not desirable in the treatment of RA.

The efficacy of antisense oligodeoxynucleotide therapy directed against ICAM-1 was also assessed in the setting of RA. ISIS 2302 was administered for 4 weeks in a

randomized placebo controlled trial to 43 patients. No significant difference between placebo and ISIS 2302 was recorded for the 6-month duration of follow-up. The treatment was well tolerated and side effects were mostly headaches, nausea and diarrhea. Given the lack of response and a good safety profile of this ICAM-1 antisense agent, the authors concluded that a study using higher dosage of ISI 2302 should be conducted [222].

Most of the reports about ICAM-1 targeting in bone diseases have been conducted on RA and none have directly studied its potential therapeutic application in OA or OP. However, in vitro, hyaluronan was shown to exert an antiapoptotic effect mediated through binding with CD44 and ICAM-1 [204]. Also, in a randomized study, 40 patients with knee OA were infiltrated with hyaluronic acid. There was an association between the improvement of function and pain scores and the decrease in sICAM recovered in the synovial fluid [223]. These 2 studies were not design to target ICAM-1 directly but nonetheless, revealed potential benefits of ICAM-1 therapy in OA. Unfortunately, no study so far has evaluated the potential of targeting ICAM-1 in OP.

### **Conclusions and expert opinion**

Adhesion molecules such as ICAM-1 are key modulators of inflammatory processes and are involved in Oc maturation and apoptosis. All these physiological events can be found in bone pathologies to various degree. Inflammation and Oc recruitment are major determinant of RA while OP is characterized by an imbalance

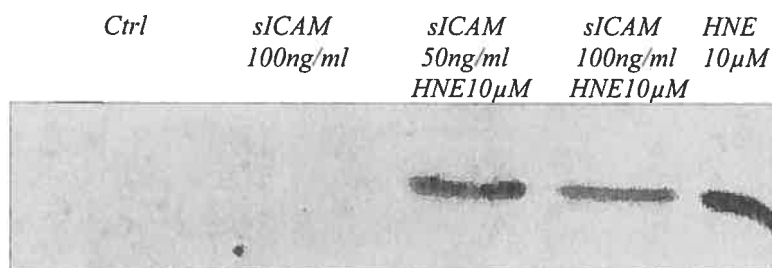
toward Oc maturation and bone loss. The exact pathophysiology of OA is not completely understood, but clinical symptoms can be related to altered inflammatory mediator production and to some degree, abnormal Oc activity.

Some benefits of ICAM-1 therapy has been described in RA, although the specific type of ICAM-1 inhibitor and the study format needs to be rethink. The literature curenly available on adhesion molecules and their implication in OA and OP is limited. The pathogenesis of these diseases, particularly OP where intense Oc activity is recorded could potentially be modified using anti-ICAM-1 treatment, as in vitro studies have reported the inhibition of Oc maturation with ICAM-1 blocking. Modulating inflammation and Oc activity through adhesion molecules could also allow targeting ICAM-1 in the setting of aseptic loosening of orthopaedic implants. Only 3 studies have reported specific distribution of ICAM-1 in this pathology [224-226][74,75,76]. Aseptic loosening being characterized by particle-induced inflammation and increased Oc activity leading to disastrous bone loss, ICAM-1 blockade could possibly prevent or delay the need for revision arthroplasty in this setting.

ICAM-1 certainly has some potential in the therapeutic arsenal directed against these bone diseases. However, we first need a better definition of the role played by ICAM-1 and a better understanding the mechanisms underlying these diseases in order to design molecules of potential therapeutic efficacy.

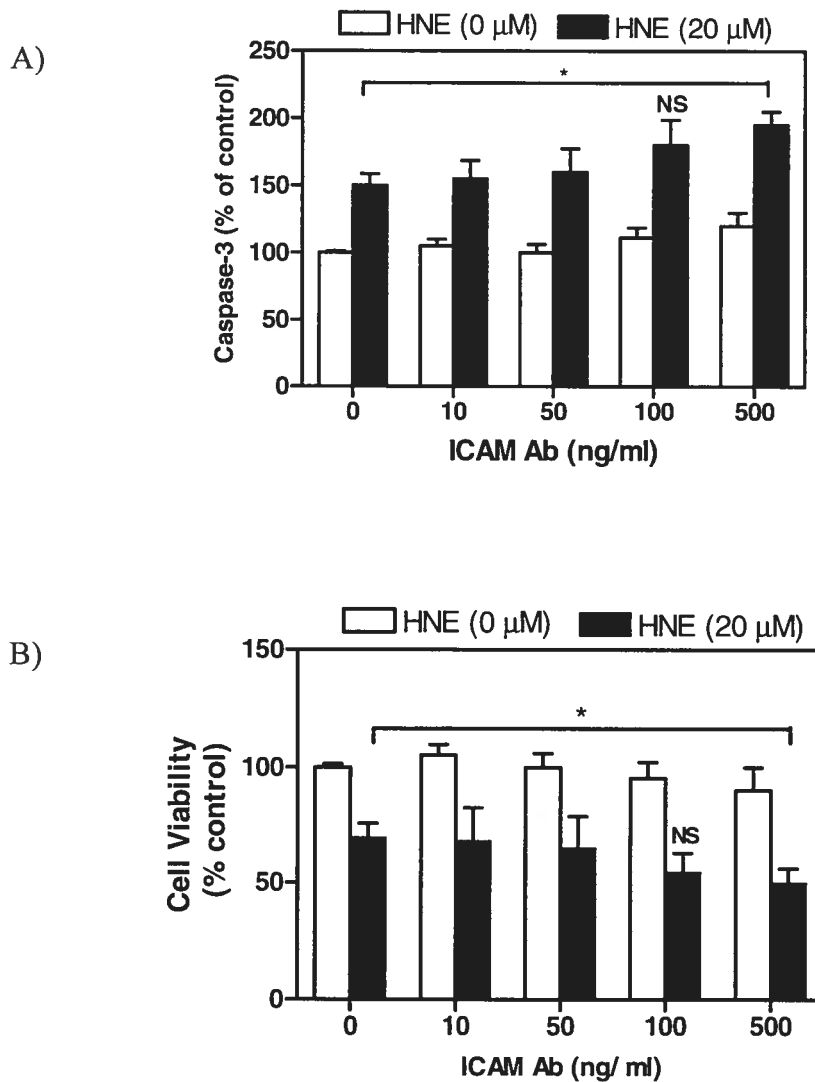
#### 4.5 Résultats complémentaires

Certaines expériences complémentaires ont été réalisées dans le but de pousser plus loin nos études. Ces résultats sont présentés ici pour ouvrir la porte à la discussion et aux perspectives futures. Les figures qui suivent représentent donc les premières expériences réalisées pour confirmer les hypothèses qui sont présentées dans la discussion de l'article 3 ainsi que dans la conclusion de cet ouvrage.



**Figure 12. Détermination de la Caspase-3 dans les monocytes humains après stimulation avec divers médiateurs.** Les monocytes humains furent extraits du sang de donneurs sains et pré-incubés pour 2h avec ou sans sICAM. Le HNE fut ensuite ajouté comme initiateur de l'apoptose. La présence de la Caspase-3 fut évaluée par western blot (n=3). HNE: 5-hydroxynonéal.





**Figure 13. L'engagement de ICAM-1 entraîne une augmentation de l'expression de la caspase-3 et une diminution de la viabilité cellulaire en présence d'un initiateur de l'apoptose.**

A) Expression de la caspase-3 chez le monocyte en présence de ICAM-1 telle qu'évaluée par western blot (avec ou sans HNE).

B) Viabilité cellulaire des monocytes en présence de ICAM-1 (avec ou sans HNE).

## CHAPÎTRE 5. DISCUSSION ET PERSPECTIVES FUTURES

### 5.1 DISCUSSION GÉNÉRALE

Un grand nombre de processus biologiques cellulaires comme la prolifération, l'apoptose, la différenciation, l'adhésion, la production de cytokines et de chémokines nécessite des mécanismes de signalisation intercellulaires. Cet échange d'information entre les cellules d'un même environnement peut se faire par l'entremise de médiateurs solubles ou par le biais de récepteurs membranaires. Le concept de «cross-talk» entre les molécules d'adhésion et les cytokines semble avoir pris de l'importance au cours des dernières années et on reconnaît maintenant son rôle essentiel dans une multitude de processus autant physiologiques que physiopathologiques dans tout l'organisme. L'os ne fait d'ailleurs pas exception, puisque la modulation de la résorption et de la formation osseuse nécessite une signalisation intercellulaire complexe impliquant facteurs solubles, hormones systémiques et adhésion cellulaire.

Dans cet ouvrage, nous nous sommes penchés sur l'importance de l'adhésion cellulaire dans la biologie des Oc. Plus particulièrement, nous avons non seulement décrit l'expression et la présence accrue de ICAM-1 et de sICAM dans l'OP, pathologie ostéoclaste-dépendante, mais avons aussi démontré une double action de ces molécules sur l'homéostasie osseuse. En effet, un Ob au phénotype ICAM-1 favorise le recrutement des Oc et l'expression de RANKL, tout en prédisposant à l'apoptose des Ob. Ce phénotype particulier des Ob-ICAM-1<sup>+</sup> semble donc favoriser la diminution de la masse osseuse tel que l'on retrouve dans l'OP. Le premier article inclut dans cet ouvrage confirme d'ailleurs la prépondérance d'Ob-ICAM-1<sup>+</sup> dans l'OP. De son côté, sICAM

semble quant à lui accroître la capacité de résorption des Oc par un mécanisme incomplètement élucidé. Il appert par contre que cet effet soit du moins en partie secondaire à une protection des pré-Oc/Oc contre l'apoptose.

Jusqu'ici, peu de choses étaient connues quant à l'action de ICAM-1 et de sICAM dans le métabolisme osseux. Bien que des niveaux anormaux de la protéine circulante et de la protéine membranaire soient décrits dans de multiples pathologies, on attribuait jusqu'ici à ICAM-1 le seul rôle de « colle » cellulaire favorisant du même coup l'interaction de l'axe RANKL/RANK et donc la formation et l'activité des Oc. Autrement dit, la formation et la fonction des Oc sont accrues lorsque ICAM-1 est présent à la surface cellulaire des Ob ou des cellules stromales. Pour ce qui est de sICAM, il n'existe aucun article s'attardant à sa fonction physiologique dans l'os. Cette étude est donc intéressante puisqu'elle décrit à la fois des modifications de l'expression cellulaire de ICAM-1 et des niveaux sériques de sICAM en fonction de différentes pathologies, mais aussi tente d'offrir une explication mécanistique pour ces modifications observées.

Nous avons donc ici démontré dans un premier temps une expression membranaire accrue de ICAM-1 à la surface des Ob prélevés chez des patients OP ayant subi une fracture pathologique (par manquement). Cette découverte laissait donc suggérer qu'un phénotype ICAM-1<sup>+</sup> chez les Ob se traduisait cliniquement par un métabolisme osseux axé vers la diminution de la masse osseuse et une activité ostéoclastique accrue. De façon intéressante, il était déjà décrit que des augmentations de l'expression de

ICAM-1 dans les tissus autres que osseux était retrouvées dans les pathologies inflammatoires telles que l'arthrite rhumatoïde et le déscollement aseptique de prothèse, toutes deux caractérisées par une perte osseuse importante. Cette première étude venait donc réaffirmer la présence d'un phénotype ICAM-1<sup>+</sup> dans les pathologies dites Oc-dépendantes, mais démontrait pour la première fois la présence de ce phénotype particulier dans l'os.

Ensuite, nous avons aussi pu démontrer que la présence de sICAM dans le sang pouvait en partie être reliée à l'activité ostéoclastique de l'os de par ses niveaux sériques inversement proportionnels à la densité osseuse de patients normaux et OP. Cette étude est intéressante puisque bien que les concentrations sériques de sICAM semblent affectées par une multitude de pathologies (maladies inflammatoires, cancers, maladies cardiaques ischémiques), la littérature existante ne faisait pas état de variations de sICAM avec la masse osseuse. De plus, le fait que la concentration sérique sICAM soit proportionnelle à celle de TRAP 5b laisse croire que sICAM pourrait être utile comme marqueur du turnover osseux. Ces conclusions sont bien sûr limitées par le faible nombre de patients dans le groupe OP.

Bien qu'hypothétique, il est tout à fait plausible de croire que l'expression membranaire particulière de ICAM-1 et que la concentration sérique supérieure de sICAM dans l'OP est en partie médiée par l'absence d'estrogènes dans l'organisme. En effet, tel que décrit par le groupe de Gao et al dans un modèle de souris OP (ovariectomie) [207], l'absence d'estrogènes résulte en une augmentation de l'expression

membranaire de ICAM-1 à la surface des Oc. De notre côté, nous avons démontré chez des patients OP que l'expression de ICAM-1 à la surface des Ob était aussi accrue. Il semble donc que la présence d'estrogènes soit un modulateur important de l'expression de ICAM-1 dans l'os. Par contre, le mécanisme par lequel les estrogènes affectent l'expression de cette molécule d'adhésion reste toujours inconnu.

Par ailleurs, la concentration sérique de sICAM semble aussi affectée par l'absence d'estrogènes circulants. Il est d'ailleurs décrit dans plusieurs types cellulaires et dans plusieurs pathologies différentes que l'expression membranaire de ICAM-1 et la concentration circulante de sICAM sont accrues. Ce qui est intrigant ici par contre, c'est que toutes les patientes de l'étude étaient sous hormonothérapie de remplacement et qu'il est reconnu qu'un supplément d'estrogènes oral ou transdermique est capable de diminuer la concentration sérique de sICAM (cellules endothéliales) [258]. Le fait que la concentration de sICAM demeure élevée chez les patientes OP sous HRT non traitées par biphosphonates seulement est donc un phénomène surprenant compte tenu de cette étude. Par contre, puisque la concentration de sICAM semble suivre celle de TRAP 5b sans être affectée par l'hormonothérapie de remplacement nous laisse croire que la présence de sICAM reflète le turnover osseux et que sa concentration circulante provient en partie du squelette. Les cellules osseuses répondent telles différemment à l'apport d'estrogènes exogènes comparé à d'autres types cellulaires? Est-ce que la synthèse de novo de sICAM chez l'Ob échappe à l'effet inhibiteur de l'estrogène contrairement à l'expression et au clivage de ICAM-1 membranaire? Les biphosphonates affectent-ils le profil d'expression de ICAM-1 et de sICAM? Toutes ces questions restent à ce jour sans réponse mais feront

l'objet d'études ultérieures qui pourraient éventuellement permettre de générer de nouvelles cibles thérapeutiques mais aussi offrir une meilleure compréhension du rôle qu'exerce ICAM-1 dans l'OP.

Ces deux études observationnelles ont démontré que ICAM-1 à la surface des Ob et sICAM sanguin étaient tous deux reliés à la physiologie osseuse. La troisième étude voulait quant à elle confirmer que ces deux médiateurs ne constituaient simplement pas un épiphénomène secondaire, mais avaient bel et bien un rôle actif dans l'homéostasie osseuse.

En effet, nous avons pu démontrer que l'engagement de ICAM-1 était capable de stimuler l'expression de RANKL à la surface des Ob et confirmer que la liaison intercellulaire entre le pré-Oc et l'Ob médiée par ICAM-1 est essentielle, du moins *in vitro*, pour la maturation et la fonction des Oc. De plus, nous avons également démontré que sICAM, bien qu'il n'affecte pas le processus de maturation des Oc, est par ailleurs capable d'exercer un effet stimulateur de l'activité de ces derniers par un mécanisme toujours inconnu. En combinant les résultats de cette dernière étude avec l'étude visant à évaluer la concentration sanguine de sICAM, il est par contre possible de soulever quelques points intéressants. D'abord, il faut noter que la concentration sérique de sICAM est augmentée dans le groupe OP seul et est comparable à la normale dans le groupe OP-Tx (Figure 2, article 2). Par contre, la concentration de TRAP 5b est diminuée par les biphosphonates comparée à la normale. Puisque les biphosphonates altèrent la machinerie enzymatique des pré-Oc/Oc, il est attendu d'observer une diminution de la

sécrétion de TRAP 5b, puisque moins d'Oc sont formés/activés avec ce médicament. Cette action des biphosphonates explique du même coup que la concentration de TRAP 5b soit inférieure dans le groupe OP-Tx comparé aux normaux, car la formation/l'activité des Oc est grande partie inhibée par ce traitement alors que des Oc sont en maturation de façon continue dans une situation physiologique. Puisque la concentration de sICAM n'est pas modifiée par ce médicament, la production de sICAM semble donc être secondaire en partie à l'activité d'autres cellules et non uniquement à celle des Oc. Ceci expliquerait également les variations plus faibles de sICAM comparés à celles de TRAP 5b chez les normaux et les OP. On pourrait donc penser que sICAM représente plus un marqueur de l'activité catabolique de l'os de façon globale et non uniquement un marqueur de l'activité des Oc.

Par ailleurs, les concentrations de sICAM sériques retrouvés *in vivo* chez les patients OP (280 ng/ml) demeurent inférieures (3.5 fois) aux concentrations nécessaires pour accroître la résorption osseuse *in vitro* (1000 ng/ml). D'un autre côté, les concentrations sériques de TRAP 5b étant aussi inférieures aux concentrations basales retrouvées *in vitro* (2.8 fois), il est fort probable que les concentrations de sICAM utilisées expérimentalement reflètent la situation retrouvée localement dans l'os *in vivo*. Cette observation est d'ailleurs soutenue par le fait que la concentration sérique de TRAP 5b chez les OP comparée aux normaux est 1.3 fois supérieure, tandis que l'activité de cette enzyme est 1.4 fois supérieure *in vitro* lorsque l'on compare notre contrôle positif avec la situation basale.

Placé dans un contexte de physiologie osseuse, ce travail revêt une importance particulière puisqu'il décrit non seulement l'effet pro-ostéoclastogène de ICAM-1 et de sICAM, mais aussi, lorsque l'on ajoute les connaissances acquises sur cette molécule d'adhésion dans d'autres contextes, on peut aussi croire que ICAM-1 affecte négativement la formation osseuse. Il a en effet été décrit que les Ob ICAM-1<sup>+</sup> ont tendance à proliférer lentement puisque bloqués en phase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> du cycle cellulaire, semblent produire moins de phosphatase alcaline lorsque placés en co-culture, démontrent une expression accrue de Fas et myc et parallèlement montrent une diminution de bcl-2 [6]. De plus, les ostéoblastes qui adhèrent aux cellules de MM par l'entremise de ICAM-1 deviennent apoptotiques [250, 251].

Suite aux résultats de nos études et de celles déjà publiées, nous croyons que le phénotype ICAM-1<sup>+</sup> pour un Ob pourrait se traduire *in vivo* par 1) une diminution de la formation de la masse osseuse de par l'effet apoptotique secondaire à l'engagement de ICAM-1; 2) une augmentation de la production de facteurs de différenciation des Oc (IL-1, IL-6 et RANKL) menant à une différenciation accrue de ces derniers; et 3) une stabilisation de l'interaction cellulaire ostéoblaste/pré-ostéoclaste permettant à RANKL d'être présenté de façon optimale à RANK (effet pro-ostéoclastogène). La résultante d'un phénotype ICAM-1<sup>+</sup> dans le métabolisme osseux est donc une augmentation de la destruction de l'os en favorisant le recrutement et la fonction des Oc, tout en diminuant la formation de l'os en diminuant le nombre et l'activité des Ob présents par un arrêt du cycle cellulaire et une propension à l'apoptose. À cet égard, il est d'ailleurs intéressant de noter que les Ob OA présentent une distribution mixte de ICAM-1 à leur surface. En



effet, 50% des specimens expriment fortement ICAM-1 tandis que l'autre 50% l'exprime faiblement. Puisque les Ob OA ont tendance à être métaboliquement plus actifs que les Ob normaux (prolifération accrue et production supérieure d'alcaline phosphatase) [292], cette distribution mixte ne peut être clairement expliquée en rapport de la littérature existante, pas plus que la présence d'un sous-groupe produisant fortement IL-6 et PGE<sub>2</sub> (voir article 1).

De façon intéressante, sICAM, qui mime l'engagement ICAM-1/LFA-1 pourrait très bien exercer son effet sur l'activité accrue des Oc en lui conférant une action protectrice contre l'apoptose. Il existe en effet des études démontrant dans d'autres types cellulaires que l'Ob que le signal intracellulaire transmis dans la cellule au phénotype ICAM-1<sup>+</sup> suite à un engagement ICAM-1/LFA-1 semble mener vers l'arrêt de prolifération et l'apoptose (tel que mentionné ci-haut) alors que le signal transmis dans la cellule LFA-1<sup>+</sup> par l'intermédiaire de ICAM-1 ou de sICAM montre des propriétés inverses à savoir une prolifération accrue et une protection contre l'apoptose [250, 251, 259, 260]. Appliquées à l'adhésion entre l'Ob et l'Oc, ces propriétés semblent appuyer notre hypothèse du double rôle de ICAM-1 dans le métabolisme osseux soit une diminution de la formation osseuse et une augmentation de la résorption. D'autres cibles potentielles de sICAM pour accroître la fonction des Oc pourraient par ailleurs être les cathepsines ou les métalloprotéases, deux groupes d'enzymes responsables de la destruction de la matrice osseuse. Il est aussi possible que sICAM agit par l'entremise d'un autre médiateur qui n'a pas été testé dans nos expériences. Par contre, les seules

pistes existantes dans la littérature jusqu'ici semblent nous orienter vers l'apoptose pour expliquer le rôle joué par sICAM dans l'ostéoclastogénèse.

De façon à confirmer l'effet protecteur de sICAM (et donc de l'engagement à LFA-1) sur l'apoptose du pré-ostéoclaste, nous avons vérifié l'effet de ce médiateur sur l'expression de la caspase-3. Pour ce faire, nous avons extrait des monocytes humains et les avons stimulés avec un inducteur d'apoptose avec ou sans préincubation avec sICAM. L'expression de la caspase-3 fut alors évaluée par technique de western blot. Tel que démontré sur la figure 12, nous avons ainsi observé que l'expression de la caspase-3 était moindre lorsque les monocytes étaient incubés avec sICAM préalablement à l'ajout de l'inducteur d'apoptose. Bien que préliminaires, ces résultats semblent en effet confirmer notre hypothèse d'un rôle protecteur contre l'apoptose pour sICAM qui pourrait ainsi augmenter la durée de vie de l'Oc et par conséquent, la quantité d'os résorbé par cellule.

D'un autre côté, il semble que l'engagement de ICAM-1 engendre l'effet inverse chez les monocytes, à savoir une augmentation de l'apoptose par l'expression accrue de la caspase-3 ainsi qu'une augmentation de la mortalité cellulaire (Figure 13). En effet, ICAM-1 potentialise l'apoptose et la mortalité cellulaire en présence d'un initiateur de la cascade apoptotique, le 5-hydroxynonéal (HNE). De plus, il semble que seule l'engagement de ICAM-1 puisse entraîner ce phénomène, comme en témoigne la tendance à la hausse de l'expression de la caspase-3 et à la baisse de la viabilité cellulaire en fonction des concentrations croissantes de ICAM-1. Nous sommes à répéter ces expériences avec des concentrations de ICAM-1 similaires à celle employées pour bloquer l'ostéoclastogénèse dans cet ouvrage pour confirmer ceci. Combiné aux résultats

présentés dans cet ouvrage, il appert alors que l'engagement de ICAM-1, en plus de bloquer l'adhésion cellulaire, contribue également à la diminution du nombre de cellules par un mécanisme apoptotique, ce qui pourrait aussi logiquement mener à une diminution du recrutement et à la fonction des Oc. Nous sommes d'ailleurs présentement en train de préparer des études visant à étudier la mécanique de l'apoptose spécifique à ICAM-1 chez l'Ob et l'Oc.

## 5.2 Conclusions

Les molécules d'adhésion cellulaire comme ICAM-1 sont des joueurs clés dans la modulation des processus inflammatoires et sont impliquées dans la maturation des Oc et dans l'apoptose. Tous ces événements physiologiques sont présents à divers degrés dans les pathologies osseuses. L'inflammation et le recrutement des Oc sont des processus importants de RA tandis que l'OP est caractérisée par un déséquilibre de l'homéostasie osseuse vers la maturation des Oc et la perte de la masse osseuse. De son côté, la pathophysiologie exacte de l'OA est mal comprise mais les symptômes cliniques de la maladie peuvent être reliés à la présence dans l'articulation d'inflammation, mais aussi à une activité métabolique osseuse anormale.

Des bénéfices de cibler ICAM-1 sont décrits dans RA, même si l'inhibiteur spécifique de ICAM-1 et le format de l'étude à entreprendre doivent être repensés. De plus, la littérature actuelle disponible sur l'implication des molécules d'adhésion dans l'OA et l'OP est limitée. La pathogénèse de ces maladies, surtout dans le cas de l'OP où une activité importante des Oc est décrite, pourrait potentiellement être modifiée en

bloquant ICAM-1 de façon spécifique, puisque les études in vitro montrent une inhibition de l'activité des Oc lorsque cette molécule est ciblée. La modulation des mécanismes inflammatoires et de l'activité des Oc en ciblant ICAM-1 pourrait aussi être utile pour contrer le décèlement aseptique des implants orthopédiques. Seulement 3 études ont rapporté une expression spécifique de ICAM-1 dans ce type de pathologie [224-226]. Puisque le déscollement aseptique est caractérisé par une inflammation générale induite par les particules provenant des implants ainsi que par une activité ostéoclastique accrue menant à une perte de la masse osseuse catastrophique, cibler ICAM-1 dans cette maladie pourrait prévenir ou retarder le besoin d'une chirurgie de révision.

ICAM-1 possède certainement une place dans l'arsenal thérapeutique pour contrer les maladies osseuses. Par contre, nous devons mieux définir le rôle physiologique qu'exerce ICAM-1 dans ces diverses pathologies de façon à produire la molécule idéale qui exercera un effet maximum pour les patients.

## CHAPITRE 6 PERSPECTIVES FUTURES

Jusqu'ici, très peu d'équipes se sont intéressées à développer les connaissances physiopathologiques portant sur ICAM-1 et sICAM dans un contexte osseux pas plus qu'à leurs applications potentielles comme cible thérapeutique dans les pathologies osseuses. Il existe en effet beaucoup de littérature sur l'implication de ICAM-1 dans le processus inflammatoire, sur la présence de ICAM-1 et de sICAM en quantité supérieure à la normale dans une multitude de cancers. De plus, comme démontré dans cet ouvrage, ICAM-1 et sICAM semblent avoir une fonction importante dans le maintien/destruction de la masse osseuse. Par conséquent, il ne fait selon moi aucun doute que ICAM-1 et/ou sICAM pourraient être des médiateurs importants dans les cancers osseux primaires et secondaires. L'étude de leurs implications dans ces cancers pourrait permettre de générer des cibles thérapeutiques potentielles visant à minimiser la destruction osseuse et ainsi assurer un meilleur contrôle local des tumeurs, ce qui se traduirait par une diminution de la douleur, une meilleure fonction et donc, une qualité de vie supérieure.

En effet, il existe un besoin important de nouvelles cibles pour le traitement des cancers osseux. L'ostéosarcome (OS) est la tumeur maligne la plus commune et son traitement actuel combine la chimiothérapie suivie de la résection de la tumeur (85% des patients) ou de l'amputation du membre (15% des patients). La survie à 5 ans avec ce traitement est de 70%, mais aucune amélioration n'a été rapportée dans les 15 dernières années malgré la venue de nouveaux agents chimiothérapeutiques [271]. Les métastases osseuses quant à elles sont présentes dans 70% des tumeurs de la prostate et du sein

[272]. Ces métastases sont généralement incurables puisque seulement 20% des patients avec néoplasie du sein métastatique à l'os sont toujours vivants 5 ans plus tard [273]. Les fractures pathologiques, les compressions nerveuses et la douleur qui en résulte affectent grandement la qualité de vie de ces patients. L'incapacité à prévenir et à traiter les métastases osseuses est responsable de la majorité des complications observées dans cette population, complications qui sont souvent mortelles.

Les mécanismes sous-jacents la progression tumorale sont complexes mais peuvent être regroupés en 5 grands groupes : 1) Production importante de signaux de croissance cellulaire avec une baisse relative des signaux inhibiteurs; 2) Capacité angiogénique accrue; 3) Résistance à l'apoptose; 4) Capacité d'échapper aux mécanismes de surveillance cellulaire normaux; et 5) Potentiel métastatique.

Une cible thérapeutique idéale pour les tumeurs osseuses, qu'elles soient primaires ou secondaires, serait celle qui pourrait ralentir/inhiber la destruction osseuse tout en affectant un ou plusieurs des mécanismes ci-haut mentionnés. De façon intéressante, ICAM-1 et sICAM sont connus pour influencer la plupart des ces mécanismes.

En effet, l'exemple du myélome multiple (MM) qui cause des lésions osseuses lytiques chez les patients qui en sont atteints décrit le mieux l'action de ICAM-1 et de sICAM dans le cancer. Ces deux protéines sont surexprimées dans le MM et l'expression de LFA-1 et de ICAM-1 est proportionnelle à l'activité de la maladie et au potentiel de croissance de la tumeur [274-276]. Aussi, alors que les Oc normaux sont ICAM-1<sup>-</sup>, les

Oc dans le MM deviennent ICAM-1<sup>+</sup> ce qui suggère l'implication de cette molécule dans la destruction osseuse du MM [277]. De plus, les Ob dans le MM expriment fortement ICAM-1 et ont tendance à devenir apoptotiques suite à l'adhésion aux cellules du MM, ce qui favorise encore plus fortement la destruction de l'os au détriment de sa formation [250, 251]. Par contre, la présence de sICAM *in vitro* inhibe cette même adhésion et prévient du même coup l'apoptose des Ob ce qui tend à confirmer l'effet protecteur sur l'apoptose décrit dans cet ouvrage. Toutes ces études suggèrent donc que la fonction de ICAM-1/sICAM dans le MM implique le «homing» des cellules MM dans l'os, la modulation de leurs interactions cellules-cellules, favorise une activité ostéoclastique plus élevée et interfère avec les mécanismes normaux d'apoptose.

Dans l'OS, les évidences de l'implication de ICAM-1 sont toutefois moins évidentes bien que les lignées cellulaires ostéosarcomateuses Saos-2 et MG-63 expriment la molécule [278]. Par contre, il est démontré dans les cellules Saos-2 que p53 induit l'expression de ICAM-1, ce qui suggère que ICAM-1 est impliqué dans l'apoptose de ce type cellulaire [244]. De plus, 80% des cancers humains montrent des anomalies de signalisation de p53 et que la surexpression de cette protéine confère une protection contre la formation tumorale mais accroît la sénescence cellulaire [278, 279]. Puisqu'il est démontré que l'expression de ICAM est faible dans l'OS et que dans le MM, l'expression de ICAM-1 est proportionnelle à l'apoptose des Ob, on pourrait croire qu'une faible expression de ICAM-1 favorise la prolifération des cellules tumorales dans l'OS. Dans les tumeurs secondaires de l'os comme le cancer de la prostate et du sein métastatiques, l'expression du gène de ICAM-1 est relié au locus de susceptibilité de la

tumeur primaire, mais est aussi un marqueur de probabilité métastatique pour ces tumeurs [280, 281].

De son côté, la concentration de sICAM circulante est supérieure à la normale dans une grande variété de cancers, niveaux qui peuvent être reliés à la progression de la tumeur, à son volume, à la présence de tumeur mais aussi au pronostic de la maladie [2782-287]. Également, sICAM est capable d'inhiber l'interaction des cellules tumorales avec les lymphocytes T, prévenant du même coup la destruction de la tumeur par le système immunitaire ce qui confère donc à la tumeur la possibilité d'échapper aux mécanismes de contrôle de l'organisme [288, 289].

Malgré les évidences qui démontrent que 1) ICAM-1/sICAM sont pro-ostéoclastogènes; que 2) l'expression tissulaire de ICAM-1 est supérieure dans les pathologies ostéoclastes-dépendantes; que 3) les concentrations sériques de sICAM sont proportionnelles au turnover osseux; que 4) ICAM-1/sICAM sont des facteurs angiogéniques; que 5) ICAM-1/sICAM modulent la cascade apoptotique; que 6) ICAM-1/sICAM favorisent dans certains cas la croissance tumorale; que 7) la concentration de sICAM est reliée au volume tumoral, à son risque de progression, à son potentiel métastatique et à son pronostic; et que 8) sICAM permet à la tumeur d'échapper aux mécanismes de surveillance de l'organisme, aucune étude n'a évalué le potentiel de cet axe comme cible thérapeutique dans la prévention/traitement des tumeurs osseuses primaires et secondaires. Puisque 30% des patients atteints d'OS et 80% des patients souffrant du cancer du sein avec métastases osseuses sont décédés à 5 ans, il ne fait nul



doute qu'il faille trouver de nouvelles alternatives pour soulager les patients qui en souffrent. Je crois que l'étude de l'action de ICAM-1 et de sICAM dans ces pathologies pourrait permettre la mise au point d'un nouvel axe de traitement dans ce domaine.

### **6.1 Conclusion**

Cet ouvrage a donc permis de faire avancer les connaissances physiopathologiques quant aux rôles de ICAM-1 et de sICAM dans le processus d'ostéoclastogénèse et de la régulation du métabolisme osseux en général. Il reste cependant à clarifier l'action définitive de sICAM sur les Oc, en particulier en ce qui a trait aux mécanismes apoptotiques des Ob et des Oc. Éclaircir ces mécanismes et les appliquer à des pathologies comme les tumeurs osseuses primaires et secondaires pourrait permettre d'ouvrir la voie à une nouvelle génération de cibles thérapeutiques impliquant ICAM-1 et/ou sICAM dans ce type de maladies.

## RÉFÉRENCES

1. Nakayamada S, Okada Y, Saito K, Tamura M, Tanaka Y. Beta1 integrin/focal adhesion kinase-mediated signaling induces intercellular adhesion molecule 1 and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand on osteoblasts and osteoclast maturation  
21. *J Biol Chem* 2003;278:45368-74.
2. Nakayamada S, Saito K, Fujii K, Yasuda M, Tamura M, Tanaka Y. beta1 integrin-mediated signaling induces intercellular adhesion molecule 1 and Fas on rheumatoid synovial cells and Fas-mediated apoptosis  
22. *Arthritis Rheum* 2003;48:1239-48.
3. Hofbauer LC. Osteoprotegerin ligand and osteoprotegerin: novel implications for osteoclast biology and bone metabolism. *Eur J Endocrinol* 1999;141:195-210.
4. Kurachi T, Morita I, Murota S. Involvement of adhesion molecules LFA-1 and ICAM-1 in osteoclast development  
2. *Biochim Biophys Acta* 1993;1178:259-66.
5. Tanaka Y, Morimoto I, Nakano Y, et al. Osteoblasts are regulated by the cellular adhesion through ICAM-1 and VCAM-1  
14. *J Bone Miner Res* 1995;10:1462-9.
6. Tanaka Y, Maruo A, Fujii K, et al. Intercellular adhesion molecule 1 discriminates functionally different populations of human osteoblasts: characteristic involvement of cell cycle regulators  
12. *J Bone Miner Res* 2000;15:1912-23.
7. Hall BK, Miyake T. All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. *Bioessays* 2000;22:138-47.
8. Abad V, Meyers JL, Weise M, et al. The role of the resting zone in growth plate chondrogenesis. *Endocrinology* 2002;143:1851-7.
9. Minina,E., Wenzel,H.M., Kreschel,C., Karp,S., Gaffield,W., McMahon,A.P., and Vortkamp,A. BMP and Ihh/PTHrP signaling interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation. *Development* 2001; 128:4523-4534.
10. Schmid,T.M., and Linsenmayer,T.F. Immunohistochemical localization of short chain cartilage collagen (type X) in avian tissues. *J. Cell Biol.* 1985; 100:598-605.
11. Wang,W., and Kirsch,T. Retinoic acid stimulates annexin-mediated growth plate chondrocyte mineralization. *J. Cell Biol.* 2002; 157:1061-1069.

12. Kronenberg, H.M. Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 2003; 423:332-336.
13. Ruoslahti, E. Integrins. *J. Clin. Invest* 1991; 87:1-5.
14. Rossi, A., and Superti-Furga, A. Mutations in the diastrophic dysplasia sulfate transporter (DTDST) gene (SLC26A2): 22 novel mutations, mutation review, associated skeletal phenotypes, and diagnostic relevance. *Hum. Mutat.* 2001; 17:159-171.
15. Werb, Z. ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell* 1997; 91:439-442.
16. Drop, S.L., De Waal, W.J., and De Muinck Keizer-Schrama SM. Sex steroid treatment of constitutionally tall stature. *Endocr. Rev.* 1998; 19:540-558.
17. Woods, K.A., Camacho-Hubner, C., Savage, M.O., and Clark, A.J. Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene. *N. Engl. J. Med.* 1996; 335:1363-1367.
18. Isaksson, O.G., Lindahl, A., Nilsson, A., and Isgaard, J. 1987. Mechanism of the stimulatory effect of growth hormone on longitudinal bone growth. *Endocr. Rev.* 8:426-438.
19. Schlesinger, S., MacGillivray, M.H., and Munschauer, R.W. 1973. Acceleration of growth and bone maturation in childhood thyrotoxicosis. *J. Pediatr.* 83:233-236.
20. Rivkees, S.A., Bode, H.H., and Crawford, J.D. 1988. Long-term growth in juvenile acquired hypothyroidism: the failure to achieve normal adult stature. *N. Engl. J. Med.* 318:599-602.
21. Gothe, S., Wang, Z., Ng, L., Kindblom, J.M., Barros, A.C., Ohlsson, C., Vennstrom, B., and Forrest, D. 1999. Mice devoid of all known thyroid hormone receptors are viable but exhibit disorders of the pituitary-thyroid axis, growth, and bone maturation. *Genes Dev.* 13:1329-1341.
22. Lewinson, D., Bialik, G.M., and Hochberg, Z. 1994. Differential effects of hypothyroidism on the cartilage and the osteogenic process in the mandibular condyle: recovery by growth hormone and thyroxine. *Endocrinology* 135:1504-1510.
23. Okubo, Y., and Reddi, A.H. 2003. Thyroxine downregulates Sox9 and promotes chondrocyte hypertrophy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 306:186-190.
24. Lewinson, D., Harel, Z., Shenzer, P., Silbermann, M., and Hochberg, Z. 1989. Effect of thyroid hormone and growth hormone on recovery from hypothyroidism of epiphyseal growth plate cartilage and its adjacent bone. *Endocrinology* 124:937-945.

25. Annefeld, M. 1992. Changes in rat epiphyseal cartilage after treatment with dexamethasone and glycosaminoglycan-peptide complex. *Pathol. Res. Pract.* 188:649-652.
26. Abu, E.O., Horner, A., Kusec, V., Triffitt, J.T., and Compston, J.E. 2000. The localization of the functional glucocorticoid receptor alpha in human bone. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 85:883-889.
27. Mocetti, P., Silvestrini, G., Ballanti, P., Patacchioli, F.R., Di, G.R., Angelucci, L., and Bonucci, E. 2001. Bcl-2 and Bax expression in cartilage and bone cells after high-dose corticosterone treatment in rats. *Tissue Cell* 33:1-7.
28. Allen, D.B. 1996. Growth suppression by glucocorticoid therapy. *Endocrinol. Metab Clin. North Am.* 25:699-717.
29. Smith, E.P., Boyd, J., Frank, G.R., Takahashi, H., Cohen, R.M., Specker, B., Williams, T.C., Lubahn, D.B., and Korach, K.S. 1994. Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *N. Engl. J. Med.* 331:1056-1061.
30. Nilsson, O., Chrysis, D., Pajulo, O., Boman, A., Holst, M., Rubinstein, J., Martin, R.E., and Savendahl, L. 2003. Localization of estrogen receptors-alpha and -beta and androgen receptor in the human growth plate at different pubertal stages. *J. Endocrinol.* 177:319-326.
31. Nasatzky, E., Schwartz, Z., Soskolne, W.A., Brooks, B.P., Dean, D.D., Boyan, B.D., and Ornoy, A. 1994. Evidence for receptors specific for 17 beta-estradiol and testosterone in chondrocyte cultures. *Connect. Tissue Res.* 30:277-294.
32. St-Jacques, B., Hammerschmidt, M., and McMahon, A.P. 1999. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev.* 13:2072-2086.
33. Weir, E.C., Philbrick, W.M., Amling, M., Neff, L.A., Baron, R., and Broadus, A.E. 1996. Targeted overexpression of parathyroid hormone-related peptide in chondrocytes causes chondrodysplasia and delayed endochondral bone formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93:10240-10245.
34. Chung, U.I., Schipani, E., McMahon, A.P., and Kronenberg, H.M. 2001. Indian hedgehog couples chondrogenesis to osteogenesis in endochondral bone development. *J. Clin. Invest* 107:295-304.
35. Minina, E., Kreschel, C., Naski, M.C., Ornitz, D.M., and Vortkamp, A. 2002. Interaction of FGF, Ihh/Pthlh, and BMP signaling integrates chondrocyte proliferation and hypertrophic differentiation. *Dev. Cell* 3:439-449.

36. Yi,S.E., Daluiski,A., Pederson,R., Rosen,V., and Lyons,K.M. 2000. The type I BMP receptor BMPRII is required for chondrogenesis in the mouse limb. *Development* 127:621-630.
37. Baur,S.T., Mai,J.J., and Dymecki,S.M. 2000. Combinatorial signaling through BMP receptor IB and GDF5: shaping of the distal mouse limb and the genetics of distal limb diversity. *Development* 127:605-619.
38. Akiyama,H., Chaboissier,M.C., Martin,J.F., Schedl,A., and de,C.B. 2002. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev.* 16:2813-2828.
39. Otto,F., Thornell,A.P., Crompton,T., Denzel,A., Gilmour,K.C., Rosewell,I.R., Stamp,G.W., Beddington,R.S., Mundlos,S., Olsen,B.R. et al 1997. *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 89:765-771.
40. Li YC, Amling M, Pirro AE, et al. Normalization of mineral ion homeostasis by dietary means prevents hyperparathyroidism, rickets, and osteomalacia, but not alopecia in vitamin D receptor-ablated mice  
1. *Endocrinology* 1998;139:4391-6.
41. Kurnik BR, Hruska KA. Mechanism of stimulation of renal phosphate transport by 1,25-dihydroxycholecalciferol  
4. *Biochim Biophys Acta* 1985;817:42-50.
42. Yagci A, Werner A, Murer H, Biber J. Effect of rabbit duodenal mRNA on phosphate transport in *Xenopus laevis* oocytes: dependence on 1,25-dihydroxy-vitamin-D3. *Pflugers Arch* 1992;422:211-6.
43. Friedman PA, Gesek FA. Vitamin D3 accelerates PTH-dependent calcium transport in distal convoluted tubule cells  
22. *Am J Physiol* 1993;265:F300-F308.
44. Brown AJ, Zhong M, Finch J, et al. Rat calcium-sensing receptor is regulated by vitamin D but not by calcium  
13. *Am J Physiol* 1996;270:F454-F460.
45. Dusso AS, Thadhani R, Slatopolsky E. Vitamin D receptor and analogs  
5. *Semin Nephrol* 2004;24:10-6.
46. Panda DK, Miao D, Bolivar I, et al. Inactivation of the 25-hydroxyvitamin D 1alpha-hydroxylase and vitamin D receptor demonstrates independent and interdependent effects of calcium and vitamin D on skeletal and mineral homeostasis  
3. *J Biol Chem* 2004;279:16754-66.

47. Kitazawa S, Kajimoto K, Kondo T, Kitazawa R. Vitamin D3 supports osteoclastogenesis via functional vitamin D response element of human RANKL gene promoter  
8. *J Cell Biochem* 2003;89:771-7.
48. Kondo T, Kitazawa R, Maeda S, Kitazawa S. 1 alpha,25 dihydroxyvitamin D3 rapidly regulates the mouse osteoprotegerin gene through dual pathways  
4. *J Bone Miner Res* 2004;19:1411-9.
49. Aubin JE, Bonnelye E. Osteoprotegerin and its ligand: A new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption  
30. *Medscape Womens Health* 2000;5:5.
50. Riggs BL, Khosla S, Melton LJ, III. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton  
36. *Endocr Rev* 2002;23:279-302.
51. Smith MR, McGovern FJ, Zietman AL, et al. Pamidronate to prevent bone loss during androgen-deprivation therapy for prostate cancer. *N Engl J Med* 2001;345:948-55.
52. Stepan JJ, Lachman M, Zverina J, Pacovsky V, Baylink DJ. Castrated men exhibit bone loss: effect of calcitonin treatment on biochemical indices of bone remodeling  
1. *J Clin Endocrinol Metab* 1989;69:523-7.
53. Falahati-Nini A, Riggs BL, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Eastell R, Khosla S. Relative contributions of testosterone and estrogen in regulating bone resorption and formation in normal elderly men  
50. *J Clin Invest* 2000;106:1553-60.
54. Jilka RL, Takahashi K, Munshi M, Williams DC, Roberson PK, Manolagas SC. Loss of estrogen upregulates osteoblastogenesis in the murine bone marrow. Evidence for autonomy from factors released during bone resorption  
1. *J Clin Invest* 1998;101:1942-50.
55. Eghbali-Fatourehchi G, Khosla S, Sanyal A, Boyle WJ, Lacey DL, Riggs BL. Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. *J Clin Invest* 2003;111:1221-30.
56. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Spelsberg TC, Riggs BL. Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology* 1999;140:4367-70.
57. Kawano H, Sato T, Yamada T, et al. Suppressive function of androgen receptor in bone resorption  
5. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:9416-21.

58. Khosla S, Riggs BL. Androgens, estrogens, and bone turnover in men  
28. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:2352-3.
59. Kousteni S, Bellido T, Plotkin LI, et al. Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity  
8. *Cell* 2001;104:719-30.
60. Huang H, Kamm RD, Lee RT. Cell mechanics and mechanotransduction: pathways, probes, and physiology  
1. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;287:C1-11.
61. Deschner J, Hofman CR, Piesco NP, Agarwal S. Signal transduction by mechanical strain in chondrocytes  
1. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2003;6:289-93.
62. Hughes-Fulford M. Signal transduction and mechanical stress  
8. *Sci STKE* 2004;2004:RE12.
63. Ahima RS, Flier JS. Leptin  
4. *Annu Rev Physiol* 2000;62:413-37.
64. Tartaglia LA. The leptin receptor  
1. *J Biol Chem* 1997;272:6093-6.
65. Takeda S, Eleftheriou F, Levasseur R, et al. Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system  
1. *Cell* 2002;111:305-17.
66. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis  
1. *Endocr Rev* 2000;21:115-37.
67. Parfitt AM. Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone  
1. *J Cell Biochem* 1994;55:273-86.
68. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 1997;89:747-54.
69. Komori T, Yagi H, Nomura S, et al. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts  
17. *Cell* 1997;89:755-64.
70. Suda T, Jimi E, Nakamura I, Takahashi N. Role of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 in osteoclast differentiation and function  
3. *Methods Enzymol* 1997;282:223-35.

71. Wada S, Martin TJ, Findlay DM. Homologous regulation of the calcitonin receptor in mouse osteoclast-like cells and human breast cancer T47D cells  
1. *Endocrinology* 1995;136:2611-21.
72. Boskey AL. Biomineralization: conflicts, challenges, and opportunities  
1. *J Cell Biochem Suppl* 1998;30-31:83-91.
73. Roodman GD. Advances in bone biology: the osteoclast  
1. *Endocr Rev* 1996;17:308-32.
74. Nakamura I, Gailit J, Sasaki T. Osteoclast integrin  $\alpha$ V $\beta$ 3 is present in the clear zone and contributes to cellular polarization. *Cell Tissue Res* 1996;286:507-15.
75. Vaananen HK. Mechanism of bone turnover  
1. *Ann Med* 1993;25:353-9.
76. Kameda T, Ishikawa H, Tsutsui T. Detection and characterization of apoptosis in osteoclasts in vitro  
1. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;207:753-60.
77. Calvani N, Silvestris F, Cafforio P, Dammacco F. Osteoclast-like cell formation by circulating myeloma B lymphocytes: role of RANK-L  
8. *Leuk Lymphoma* 2004;45:377-80.
78. Horwood NJ, Kartsogiannis V, Quinn JM, Romas E, Martin TJ, Gillespie MT. Activated T lymphocytes support osteoclast formation in vitro  
25. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;265:144-50.
79. Quinn JM, Horwood NJ, Elliott J, Gillespie MT, Martin TJ. Fibroblastic stromal cells express receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand and support osteoclast differentiation  
21. *J Bone Miner Res* 2000;15:1459-66.
80. Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families  
29. *Endocr Rev* 1999;20:345-57.
81. Martin TJ, Romas E, Gillespie MT. Interleukins in the control of osteoclast differentiation  
1. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1998;8:107-23.
82. Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, et al. Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:7260-4.



83. Udagawa N, Takahashi N, Jimi E, et al. Osteoblasts/stromal cells stimulate osteoclast activation through expression of osteoclast differentiation factor/RANKL but not macrophage colony-stimulating factor: receptor activator of NF-kappa B ligand. *Bone* 1999;25:517-23.
84. Tondravi MM, McKercher SR, Anderson K, et al. Osteopetrosis in mice lacking haematopoietic transcription factor PU.1  
1. *Nature* 1997;386:81-4.
85. Burgess TL, Qian Y, Kaufman S, et al. The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts  
1. *J Cell Biol* 1999;145:527-38.
86. Lacey DL, Timms E, Tan HL, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998;93:165-76.
87. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:3597-602.
88. Fuller K, Wong B, Fox S, Choi Y, Chambers TJ. TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts  
1. *J Exp Med* 1998;188:997-1001.
89. Boyce BF, Yoneda T, Lowe C, Soriano P, Mundy GR. Requirement of pp60c-src expression for osteoclasts to form ruffled borders and resorb bone in mice  
1. *J Clin Invest* 1992;90:1622-7.
90. Sanjay A, Houghton A, Neff L, et al. Cbl associates with Pyk2 and Src to regulate Src kinase activity, alpha(v)beta(3) integrin-mediated signaling, cell adhesion, and osteoclast motility  
1. *J Cell Biol* 2001;152:181-95.
91. Soriano P, Montgomery C, Geske R, Bradley A. Targeted disruption of the c-src proto-oncogene leads to osteopetrosis in mice  
2. *Cell* 1991;64:693-702.
92. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 1997;390:175-9.
93. Kartsogiannis V, Zhou H, Horwood NJ, et al. Localization of RANKL (receptor activator of NF kappa B ligand) mRNA and protein in skeletal and extraskelatal tissues. *Bone* 1999;25:525-34.
94. Wong BR, Rho J, Arron J, et al. TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. *J Biol Chem* 1997;272:25190-4.

95. Kong YY, Feige U, Sarosi I, et al. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* 1999;402:304-9.
96. Lum L, Wong BR, Josien R, et al. Evidence for a role of a tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-converting enzyme-like protease in shedding of TRANCE, a TNF family member involved in osteoclastogenesis and dendritic cell survival. *J Biol Chem* 1999;274:13613-8.
97. Nagai M, Kyakumoto S, Sato N. Cancer cells responsible for humoral hypercalcemia express mRNA encoding a secreted form of ODF/TRANCE that induces osteoclast formation. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;269:532-6.
98. Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK, Fortun Y, Redini F, Heymann D. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;15:457-75.
99. Jimi E, Akiyama S, Tsurukai T, et al. Osteoclast differentiation factor acts as a multifunctional regulator in murine osteoclast differentiation and function. *J Immunol* 1999;163:434-42.
100. Lacey DL, Tan HL, Lu J, et al. Osteoprotegerin ligand modulates murine osteoclast survival in vitro and in vivo. *Am J Pathol* 2000;157:435-48.
101. O'Brien EA, Williams JH, Marshall MJ. Osteoprotegerin ligand regulates osteoclast adherence to the bone surface in mouse calvaria. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;274:281-90.
102. Quinn JM, Elliott J, Gillespie MT, Martin TJ. A combination of osteoclast differentiation factor and macrophage-colony stimulating factor is sufficient for both human and mouse osteoclast formation in vitro. *Endocrinology* 1998;139:4424-7.
103. Kaden JJ, Bickelhaupt S, Grobholz R, et al. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulate aortic valve calcification. *J Mol Cell Cardiol* 2004;36:57-66.
104. Seshasayee D, Wang H, Lee WP, et al. A novel in vivo role for osteoprotegerin ligand in activation of monocyte effector function and inflammatory response. *J Biol Chem* 2004;279:30202-9.
105. Myers DE, Collier FM, Minkin C, et al. Expression of functional RANK on mature rat and human osteoclasts. *FEBS Lett* 1999;463:295-300.
106. Armstrong AP, Tometsko ME, Glaccum M, Sutherland CL, Cosman D, Dougall WC. A RANK/TRAF6-dependent signal transduction pathway is essential for

- osteoclast cytoskeletal organization and resorptive function. *J Biol Chem* 2002;277:44347-56.
107. Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:3540-5.
  108. Darnay BG, Haridas V, Ni J, Moore PA, Aggarwal BB. Characterization of the intracellular domain of receptor activator of NF-kappaB (RANK). Interaction with tumor necrosis factor receptor-associated factors and activation of NF-kappaB and c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem* 1998;273:20551-5.
  109. Wong BR, Besser D, Kim N, et al. TRANCE, a TNF family member, activates Akt/PKB through a signaling complex involving TRAF6 and c-Src. *Mol Cell* 1999;4:1041-9.
  110. Tan KB, Harrop J, Reddy M, et al. Characterization of a novel TNF-like ligand and recently described TNF ligand and TNF receptor superfamily genes and their constitutive and inducible expression in hematopoietic and non-hematopoietic cells. *Gene* 1997;204:35-46.
  111. Emery JG, McDonnell P, Burke MB, et al. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 1998;273:14363-7.
  112. Hofbauer LC, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, Riggs BL, Khosla S. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha, but not interleukin-6, stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells. *Bone* 1999;25:255-9.
  113. Takai H, Kanematsu M, Yano K, et al. Transforming growth factor-beta stimulates the production of osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor by bone marrow stromal cells. *J Biol Chem* 1998;273:27091-6.
  114. Lee SK, Lorenzo JA. Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acid expression in murine bone marrow cultures: correlation with osteoclast-like cell formation. *Endocrinology* 1999;140:3552-61.
  115. Kitazawa R, Kitazawa S, Maeda S. Promoter structure of mouse RANKL/TRANCE/OPGL/ODF gene. *Biochim Biophys Acta* 1999;1445:134-41.
  116. Hofbauer LC, Gori F, Riggs BL, et al. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrinology* 1999;140:4382-9.
  117. Hughes DE, Dai A, Tiffée JC, Li HH, Mundy GR, Boyce BF. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. *Nat Med* 1996;2:1132-6.

118. Nicholson GC, Moseley JM, Sexton PM, Mendelsohn FA, Martin TJ. Abundant calcitonin receptors in isolated rat osteoclasts. Biochemical and autoradiographic characterization. *J Clin Invest* 1986;78:355-60.
119. Yan T, Riggs BL, Boyle WJ, Khosla S. Regulation of osteoclastogenesis and RANK expression by TGF-beta1. *J Cell Biochem* 2001;83:320-5.
120. Locklin RM, Khosla S, Turner RT, Riggs BL. Mediators of the biphasic responses of bone to intermittent and continuously administered parathyroid hormone. *J Cell Biochem* 2003;89:180-90.
121. Sasaki N, Kusano E, Ando Y, et al. Changes in osteoprotegerin and markers of bone metabolism during glucocorticoid treatment in patients with chronic glomerulonephritis. *Bone* 2002;30:853-8.
122. Lubberts E, van den BL, Oppers-Walgreen B, et al. IL-17 promotes bone erosion in murine collagen-induced arthritis through loss of the receptor activator of NF-kappa B ligand/osteoprotegerin balance. *J Immunol* 2003;170:2655-62.
123. Giuliani N, Bataille R, Mancini C, Lazzaretti M, Barille S. Myeloma cells induce imbalance in the osteoprotegerin/osteoprotegerin ligand system in the human bone marrow environment. *Blood* 2001;98:3527-33.
124. Michigami T, Ihara-Watanabe M, Yamazaki M, Ozono K. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) is a key molecule of osteoclast formation for bone metastasis in a newly developed model of human neuroblastoma. *Cancer Res* 2001;61:1637-44.
125. Thomas RJ, Guise TA, Yin JJ, et al. Breast cancer cells interact with osteoblasts to support osteoclast formation. *Endocrinology* 1999;140:4451-8.
126. Hughes AE, Ralston SH, Marken J, et al. Mutations in TNFRSF11A, affecting the signal peptide of RANK, cause familial expansile osteolysis. *Nat Genet* 2000;24:45-8.
127. Whyte MP, Hughes AE. Expansile skeletal hyperphosphatasia is caused by a 15-base pair tandem duplication in TNFRSF11A encoding RANK and is allelic to familial expansile osteolysis. *J Bone Miner Res* 2002;17:26-9.
128. Whyte MP, Obrecht SE, Finnegan PM, et al. Osteoprotegerin deficiency and juvenile Paget's disease. *N Engl J Med* 2002;347:175-84.
129. Bekker PJ, Holloway DL, Rasmussen AS, et al. A single-dose placebo-controlled study of AMG 162, a fully human monoclonal antibody to RANKL, in postmenopausal women. 2004. *J Bone Miner Res* 2005;20:2275-82.

130. Bekker PJ, Holloway D, Nakanishi A, Arrighi M, Leese PT, Dunstan CR. The effect of a single dose of osteoprotegerin in postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 2001;16:348-60.
131. Body JJ, Greipp P, Coleman RE, et al. A phase I study of AMG-007, a recombinant osteoprotegerin construct, in patients with multiple myeloma or breast carcinoma related bone metastases. *Cancer* 2003;97:887-92.
132. Armour KE, Armour KJ, Gallagher ME, et al. Defective bone formation and anabolic response to exogenous estrogen in mice with targeted disruption of endothelial nitric oxide synthase  
1. *Endocrinology* 2001;142:760-6.
133. Lowik CW, Nibbering PH, van de RM, Papapoulos SE. Inducible production of nitric oxide in osteoblast-like cells and in fetal mouse bone explants is associated with suppression of osteoclastic bone resorption  
1. *J Clin Invest* 1994;93:1465-72.
134. van't Hof RJ, Ralston SH. Cytokine-induced nitric oxide inhibits bone resorption by inducing apoptosis of osteoclast progenitors and suppressing osteoclast activity  
1. *J Bone Miner Res* 1997;12:1797-804.
135. Shevde NK, Bendixen AC, Dienger KM, Pike JW. Estrogens suppress RANK ligand-induced osteoclast differentiation via a stromal cell independent mechanism involving c-Jun repression  
1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:7829-34.
136. Koga T, Inui M, Inoue K, et al. Costimulatory signals mediated by the ITAM motif cooperate with RANKL for bone homeostasis  
1. *Nature* 2004;428:758-63.
137. Mocsai A, Humphrey MB, Van Ziffle JA, et al. The immunomodulatory adapter proteins DAP12 and Fc receptor gamma-chain (FcRgamma) regulate development of functional osteoclasts through the Syk tyrosine kinase  
1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:6158-63.
138. Mundy GR. Cytokines and local factors which affect osteoclast function  
1. *Int J Cell Cloning* 1992;10:215-22.
139. Centrella M, McCarthy TL, Canalis E. Transforming growth factor-beta and remodeling of bone  
1. *J Bone Joint Surg Am* 1991;73:1418-28.
140. Eriksen EF. Normal and pathological remodeling of human trabecular bone: three dimensional reconstruction of the remodeling sequence in normals and in metabolic bone disease  
3. *Endocr Rev* 1986;7:379-408.

141. Howard GA, Bottemiller BL, Turner RT, Rader JJ, Baylink DJ. Parathyroid hormone stimulates bone formation and resorption in organ culture: evidence for a coupling mechanism  
1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78:3204-8.
142. Nakamura M, Udagawa N, Matsuura S, et al. Osteoprotegerin regulates bone formation through a coupling mechanism with bone resorption  
1. *Endocrinology* 2003;144:5441-9.
143. Grigoriadis AE, Wang ZQ, Cecchini MG, et al. c-Fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling  
1. *Science* 1994;266:443-8.
144. Karsdal MA, Henriksen K, Sorensen MG, et al. Acidification of the osteoclastic resorption compartment provides insight into the coupling of bone formation to bone resorption  
2. *Am J Pathol* 2005;166:467-76.
145. Schaller S, Henriksen K, Sveigaard C, et al. The chloride channel inhibitor NS3736 [corrected] prevents bone resorption in ovariectomized rats without changing bone formation  
1. *J Bone Miner Res* 2004;19:1144-53.
146. Xing L, Venegas AM, Chen A, et al. Genetic evidence for a role for Src family kinases in TNF family receptor signaling and cell survival  
5. *Genes Dev* 2001;15:241-53.
147. Brockstedt H, Bollerslev J, Melsen F, Mosekilde L. Cortical bone remodeling in autosomal dominant osteopetrosis: a study of two different phenotypes  
2. *Bone* 1996;18:67-72.
148. Dobnig H, Turner RT. Evidence that intermittent treatment with parathyroid hormone increases bone formation in adult rats by activation of bone lining cells  
1. *Endocrinology* 1995;136:3632-8.
149. Frolik CA, Black EC, Cain RL, et al. Anabolic and catabolic bone effects of human parathyroid hormone (1-34) are predicted by duration of hormone exposure  
1. *Bone* 2003;33:372-9.
150. Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Roberson P, Parfitt AM, Manolagas SC. Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone  
1. *J Clin Invest* 1999;104:439-46.
151. Stanislaus D, Yang X, Liang JD, et al. In vivo regulation of apoptosis in metaphyseal trabecular bone of young rats by synthetic human parathyroid

- hormone (1-34) fragment  
1. Bone 2000;27:209-18.
152. Black DM, Greenspan SL, Ensrud KE, et al. The effects of parathyroid hormone and alendronate alone or in combination in postmenopausal osteoporosis  
1. N Engl J Med 2003;349:1207-15.
153. Finkelstein JS, Hayes A, Hunzelman JL, Wyland JJ, Lee H, Neer RM. The effects of parathyroid hormone, alendronate, or both in men with osteoporosis  
1. N Engl J Med 2003;349:1216-26.
154. Demiralp B, Chen HL, Koh AJ, Keller ET, McCauley LK. Anabolic actions of parathyroid hormone during bone growth are dependent on c-fos  
1. Endocrinology 2002;143:4038-47.
155. Smith CW, Marlin SD, Rothlein R, Toman C, Anderson DC. Cooperative interactions of LFA-1 and Mac-1 with intercellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils in vitro  
1. J Clin Invest 1989;83:2008-17.
156. Staunton DE, Dustin ML, Erickson HP, Springer TA. The arrangement of the immunoglobulin-like domains of ICAM-1 and the binding sites for LFA-1 and rhinovirus  
9. Cell 1990;61:243-54.
157. Springer TA. Adhesion receptors of the immune system  
1. Nature 1990;346:425-34.
158. van de SA, van der Saag PT. Intercellular adhesion molecule-1  
1. J Mol Med 1996;74:13-33.
159. Vonderheide RH, Tedder TF, Springer TA, Staunton DE. Residues within a conserved amino acid motif of domains 1 and 4 of VCAM-1 are required for binding to VLA-4  
2. J Cell Biol 1994;125:215-22.
160. Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA, Springer TA. Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1)  
32. J Immunol 1986;137:245-54.
161. Pober JS, Gimbrone MA, Jr., Lapierre LA, et al. Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon. J Immunol 1986;137:1893-6.
162. Pober JS, Bevilacqua MP, Mendrick DL, Lapierre LA, Fiers W, Gimbrone MA, Jr. Two distinct monokines, interleukin 1 and tumor necrosis factor, each

- independently induce biosynthesis and transient expression of the same antigen on the surface of cultured human vascular endothelial cells. *J Immunol* 1986;136:1680-7.
163. Petruzzelli L, Takami M, Humes HD. Structure and function of cell adhesion molecules  
1. *Am J Med* 1999;106:467-76.
  164. Polverini PJ. Role of the macrophage in angiogenesis-dependent diseases  
1. *EXS* 1997;79:11-28.
  165. Yasuda M, Shimizu S, Ohhinata K, et al. Differential roles of ICAM-1 and E-selectin in polymorphonuclear leukocyte-induced angiogenesis  
1. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;282:C917-C925.
  166. Champagne B, Tremblay P, Cantin A, St PY. Proteolytic cleavage of ICAM-1 by human neutrophil elastase  
1. *J Immunol* 1998;161:6398-405.
  167. Leeuwenberg JF, Smeets EF, Neefjes JJ, et al. E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 are released by activated human endothelial cells in vitro  
1. *Immunology* 1992;77:543-9.
  168. Lyons PD, Benveniste EN. Cleavage of membrane-associated ICAM-1 from astrocytes: involvement of a metalloprotease  
6. *Glia* 1998;22:103-12.
  169. Wakatsuki T, Kimura K, Kimura F, et al. A distinct mRNA encoding a soluble form of ICAM-1 molecule expressed in human tissues  
18. *Cell Adhes Commun* 1995;3:283-92.
  170. Whiteman SC, Bianco A, Knight RA, Spiteri MA. Human rhinovirus selectively modulates membranous and soluble forms of its intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) receptor to promote epithelial cell infectivity  
1. *J Biol Chem* 2003;278:11954-61.
  171. Gho YS, Kleinman HK, Sosne G. Angiogenic activity of human soluble intercellular adhesion molecule-1  
1. *Cancer Res* 1999;59:5128-32.
  172. Marlin SD, Staunton DE, Springer TA, Stratowa C, Sommergruber W, Merluzzi VJ. A soluble form of intercellular adhesion molecule-1 inhibits rhinovirus infection  
1. *Nature* 1990;344:70-2.
  173. Jalkanen S. Leukocyte-endothelial cell interaction and the control of leukocyte migration into inflamed synovium  
2. *Springer Semin Immunopathol* 1989;11:187-98.



174. el-Gabalawy H, Gallatin M, Vazeux R, Peterman G, Wilkins J. Expression of ICAM-R (ICAM-3), a novel counter-receptor for LFA-1, in rheumatoid and nonrheumatoid synovium. Comparison with other adhesion molecules  
1. *Arthritis Rheum* 1994;37:846-54.
175. Ishikawa H, Nishibayashi Y, Kita K, Ohno O, Imura S, Hirata S. Adhesion molecules in the lymphoid cell distribution in rheumatoid synovial membrane  
3. *Bull Hosp Jt Dis* 1993;53:23-8.
176. Szekanecz Z, Haines GK, Lin TR, et al. Differential distribution of intercellular adhesion molecules (ICAM-1, ICAM-2, and ICAM-3) and the MS-1 antigen in normal and diseased human synovia. Their possible pathogenetic and clinical significance in rheumatoid arthritis  
1. *Arthritis Rheum* 1994;37:221-31.
177. Gerritsen ME, Kelley KA, Ligon G, et al. Regulation of the expression of intercellular adhesion molecule 1 in cultured human endothelial cells derived from rheumatoid synovium  
1. *Arthritis Rheum* 1993;36:593-602.
178. Hale LP, Martin ME, McCollum DE, et al. Immunohistologic analysis of the distribution of cell adhesion molecules within the inflammatory synovial microenvironment  
5. *Arthritis Rheum* 1989;32:22-30.
179. Ishikawa H, Hirata S, Nishibayashi Y, Imura S, Kubo H, Ohno O. The role of adhesion molecules in synovial pannus formation in rheumatoid arthritis  
2. *Clin Orthop Relat Res* 1994;297-303.
180. Johnson BA, Haines GK, Harlow LA, Koch AE. Adhesion molecule expression in human synovial tissue  
6. *Arthritis Rheum* 1993;36:137-46.
181. Lindsley HB, Smith DD, Cohick CB, Koch AE, Davis LS. Proinflammatory cytokines enhance human synoviocyte expression of functional intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)  
1. *Clin Immunol Immunopathol* 1993;68:311-20.
182. Tessier P, Audette M, Cattaruzzi P, McColl SR. Up-regulation by tumor necrosis factor alpha of intercellular adhesion molecule 1 expression and function in synovial fibroblasts and its inhibition by glucocorticoids  
6. *Arthritis Rheum* 1993;36:1528-39.
183. Tessier PA, Cattaruzzi P, McColl SR. Inhibition of lymphocyte adhesion to cytokine-activated synovial fibroblasts by glucocorticoids involves the attenuation of vascular cell adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1 gene expression  
5. *Arthritis Rheum* 1996;39:226-34.

184. Bevilacqua MP, Pober JS, Wheeler ME, Cotran RS, Gimbrone MA, Jr. Interleukin 1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes, and related leukocyte cell lines. *J Clin Invest* 1985;76:2003-11.
185. Chin JE, Winterrowd GE, Krzesicki RF, Sanders ME. Role of cytokines in inflammatory synovitis. The coordinate regulation of intercellular adhesion molecule 1 and HLA class I and class II antigens in rheumatoid synovial fibroblasts  
1. *Arthritis Rheum* 1990;33:1776-86.
186. Wicks IP, Leizer T, Wawryk SO, et al. The effect of cytokines on the expression of MHC antigens and ICAM-1 by normal and transformed synoviocytes  
3. *Autoimmunity* 1992;12:13-9.
187. Blann AD, Herrick A, Jayson MI. Altered levels of soluble adhesion molecules in rheumatoid arthritis, vasculitis and systemic sclerosis  
1. *Br J Rheumatol* 1995;34:814-9.
188. Cush JJ, Rothlein R, Lindsley HB, Mainolfi EA, Lipsky PE. Increased levels of circulating intercellular adhesion molecule 1 in the sera of patients with rheumatoid arthritis  
2. *Arthritis Rheum* 1993;36:1098-102.
189. Kuryliszyn-Moskal A, Bernacka K, Klimiuk PA. Circulating intercellular adhesion molecule 1 in rheumatoid arthritis--relationship to systemic vasculitis and microvascular injury in nailfold capillary microscopy  
1. *Clin Rheumatol* 1996;15:367-73.
190. Littler AJ, Buckley CD, Wordsworth P, Collins I, Martinson J, Simmons DL. A distinct profile of six soluble adhesion molecules (ICAM-1, ICAM-3, VCAM-1, E-selectin, L-selectin and P-selectin) in rheumatoid arthritis  
2. *Br J Rheumatol* 1997;36:164-9.
191. Mason JC, Kapahi P, Haskard DO. Detection of increased levels of circulating intercellular adhesion molecule 1 in some patients with rheumatoid arthritis but not in patients with systemic lupus erythematosus. Lack of correlation with levels of circulating vascular cell adhesion molecule 1  
4. *Arthritis Rheum* 1993;36:519-27.
192. Nassonov EL, Samsonov MY, Chichasova NV, et al. Soluble adhesion molecules in rheumatoid arthritis  
1. *Rheumatology (Oxford)* 2000;39:808-10.
193. Machold KP, Kiener HP, Graninger W, Graninger WB. Soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus  
1. *Clin Immunol Immunopathol* 1993;68:74-8.

194. Ugur M, Yildirim K, Kiziltunc A, Erdal A, Karatay S, Senel K. Correlation between soluble intercellular adhesion molecule 1 level and extracellular superoxide dismutase activity in rheumatoid arthritis: a possible association with disease activity  
1. *Scand J Rheumatol* 2004;33:239-43.
195. Wahl SM, Allen JB, Hines KL, et al. Synthetic fibronectin peptides suppress arthritis in rats by interrupting leukocyte adhesion and recruitment  
2. *J Clin Invest* 1994;94:655-62.
196. Witkowska AM, Kuryliszyn-Moskal A, Borawska MH, Hukalowicz K, Markiewicz R. A study on soluble intercellular adhesion molecule-1 and selenium in patients with rheumatoid arthritis complicated by vasculitis  
1. *Clin Rheumatol* 2003;22:414-9.
197. Hanyuda M, Kasama T, Isozaki T, et al. Activated leucocytes express and secrete macrophage inflammatory protein-1alpha upon interaction with synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis via a beta2-integrin/ICAM-1 mechanism  
1. *Rheumatology (Oxford)* 2003;42:1390-7.
198. Nakano K, Okada Y, Saito K, Tanaka Y. Induction of RANKL expression and osteoclast maturation by the binding of fibroblast growth factor 2 to heparan sulfate proteoglycan on rheumatoid synovial fibroblasts  
1. *Arthritis Rheum* 2004;50:2450-8.
199. Lavigne P, Benderdour M, Lajeunesse D, Shi Q, Fernandes JC. Expression of ICAM-1 by osteoblasts in healthy individuals and in patients suffering from osteoarthritis and osteoporosis  
16. *Bone* 2004;35:463-70.
200. Smith MD, Slavotinek J, Au V, et al. Successful treatment of rheumatoid arthritis is associated with a reduction in synovial membrane cytokines and cell adhesion molecule expression  
1. *Rheumatology (Oxford)* 2001;40:965-77.
201. Davies ME, Dingle JT, Pigott R, Power C, Sharma H. Expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) on human articular cartilage chondrocytes  
23. *Connect Tissue Res* 1991;26:207-16.
202. Iannone F, Corrado A, Grattagliano V, Cantatore FP, Patella V, Lapadula G. [Phenotyping of chondrocytes from human osteoarthritic cartilage: chondrocyte expression of beta integrins and correlation with anatomic injury]  
1. *Reumatismo* 2001;53:122-30.
203. Lapadula G, Iannone F, Zuccaro C, et al. Chondrocyte phenotyping in human osteoarthritis  
1. *Clin Rheumatol* 1998;17:99-104.

204. Lisignoli G, Grassi F, Zini N, et al. Anti-Fas-induced apoptosis in chondrocytes reduced by hyaluronan: evidence for CD44 and CD54 (intercellular adhesion molecule 1) involvement  
1. *Arthritis Rheum* 2001;44:1800-7.
205. Horner A, Davies ME, Franz B. Chondrocyte-peripheral blood mononuclear cell interactions: the role of ICAM-1  
1. *Immunology* 1995;86:584-90.
206. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group  
5. *World Health Organ Tech Rep Ser* 1994;843:1-129.
207. Gao Y, Morita I, Kubota T, Murota S, Aso T. Expression of adhesion molecules LFA-I and ICAM-I on osteoclast precursors during osteoclast differentiation and involvement of estrogen deficiency  
8. *Climacteric* 2000;3:278-87.
208. Anderson ME, Siahaan TJ. Targeting ICAM-1/LFA-1 interaction for controlling autoimmune diseases: designing peptide and small molecule inhibitors  
1. *Peptides* 2003;24:487-501.
209. Dedrick RL, Bodary S, Garovoy MR. Adhesion molecules as therapeutic targets for autoimmune diseases and transplant rejection  
1. *Expert Opin Biol Ther* 2003;3:85-95.
210. McMurray RW. Adhesion molecules in autoimmune disease  
2. *Semin Arthritis Rheum* 1996;25:215-33.
211. Yusuf-Makagiansar H, Anderson ME, Yakovleva TV, Murray JS, Siahaan TJ. Inhibition of LFA-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 as a therapeutic approach to inflammation and autoimmune diseases  
1. *Med Res Rev* 2002;22:146-67.
212. Youssef PP, Triantafillou S, Parker A, et al. Effects of pulse methylprednisolone on cell adhesion molecules in the synovial membrane in rheumatoid arthritis. Reduced E-selectin and intercellular adhesion molecule 1 expression  
1. *Arthritis Rheum* 1996;39:1970-9.
213. Kraan MC, Reece RJ, Barg EC, et al. Modulation of inflammation and metalloproteinase expression in synovial tissue by leflunomide and methotrexate in patients with active rheumatoid arthritis. Findings in a prospective, randomized, double-blind, parallel-design clinical trial in thirty-nine patients at two centers  
1. *Arthritis Rheum* 2000;43:1820-30.
214. Kraan MC, Smeets TJ, van Loon MJ, Breedveld FC, Dijkmans BA, Tak PP. Differential effects of leflunomide and methotrexate on cytokine production in

## rheumatoid arthritis

1. *Ann Rheum Dis* 2004;63:1056-61.
215. Cutolo M, Sulli A, Ghiorzo P, Pizzorni C, Craviotto C, Villaggio B. Anti-inflammatory effects of leflunomide on cultured synovial macrophages from patients with rheumatoid arthritis  
1. *Ann Rheum Dis* 2003;62:297-302.
216. Iigo Y, Takashi T, Tamatani T, et al. ICAM-1-dependent pathway is critically involved in the pathogenesis of adjuvant arthritis in rats  
1. *J Immunol* 1991;147:4167-71.
217. Jasin HE, Lightfoot E, Davis LS, Rothlein R, Faanes RB, Lipsky PE. Amelioration of antigen-induced arthritis in rabbits treated with monoclonal antibodies to leukocyte adhesion molecules  
1. *Arthritis Rheum* 1992;35:541-9.
218. Kakimoto K, Nakamura T, Ishii K, et al. The effect of anti-adhesion molecule antibody on the development of collagen-induced arthritis  
2. *Cell Immunol* 1992;142:326-37.
219. Kavanaugh AF, Davis LS, Nichols LA, et al. Treatment of refractory rheumatoid arthritis with a monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule 1  
7. *Arthritis Rheum* 1994;37:992-9.
220. Kavanaugh AF, Davis LS, Jain RI, Nichols LA, Norris SH, Lipsky PE. A phase I/II open label study of the safety and efficacy of an anti-ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1; CD54) monoclonal antibody in early rheumatoid arthritis  
4. *J Rheumatol* 1996;23:1338-44.
221. Kavanaugh AF, Schulze-Koops H, Davis LS, Lipsky PE. Repeat treatment of rheumatoid arthritis patients with a murine anti-intercellular adhesion molecule 1 monoclonal antibody  
1. *Arthritis Rheum* 1997;40:849-53.
222. Maksymowych WP, Blackburn WD, Jr., Tami JA, Shanahan WR, Jr. A randomized, placebo controlled trial of an antisense oligodeoxynucleotide to intercellular adhesion molecule-1 in the treatment of severe rheumatoid arthritis  
1. *J Rheumatol* 2002;29:447-53.
223. Karatay S, Kiziltunc A, Yildirim K, Karanfil RC, Senel K. Effects of different hyaluronic acid products on synovial fluid levels of intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in knee osteoarthritis  
1. *Ann Clin Lab Sci* 2004;34:330-5.
224. Rieckmann P, Michel U, Albrecht M, Bruck W, Wockel L, Felgenhauer K. Soluble forms of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) block lymphocyte

- attachment to cerebral endothelial cells  
1. *J Neuroimmunol* 1995;60:9-15.
225. Chihara J, Yamamoto T, Kurachi D, Nakajima S. Soluble ICAM-1 in sputum of patients with bronchial asthma  
1. *Lancet* 1994;343:1108.
226. Rothlein R, Mainolfi EA, Czajkowski M, Marlin SD. A form of circulating ICAM-1 in human serum  
1. *J Immunol* 1991;147:3788-93.
227. Shijubo N, Imai K, Shigehara K, et al. Soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in sera and bronchoalveolar lavage fluid of patients with idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary sarcoidosis  
1. *Clin Exp Immunol* 1994;95:156-61.
228. Teppo AM, von WE, Honkanen E, Ahonen J, Gronhagen-Riska C. Soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) after kidney transplantation: the origin and role of urinary sICAM-1?  
1. *Transplantation* 2001;71:1113-9.
229. Tsukada N, Matsuda M, Miyagi K, Yanagisawa N. Increased levels of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and tumor necrosis factor receptor in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis  
1. *Neurology* 1993;43:2679-82.
230. Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system  
1. *Nature* 2000;407:789-95.
231. Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, Green DR, Verma IM. Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB  
1. *Science* 1996;274:787-9.
232. Adams JM. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis  
1. *Genes Dev* 2003;17:2481-95.
233. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis  
2. *Genes Dev* 1999;13:1899-911.
234. Glantschnig H, Fisher JE, Wesolowski G, Rodan GA, Reszka AA. M-CSF, TNFalpha and RANK ligand promote osteoclast survival by signaling through mTOR/S6 kinase  
1. *Cell Death Differ* 2003;10:1165-77.
235. Zhang Q, Badell IR, Schwarz EM, et al. Tumor necrosis factor prevents alendronate-induced osteoclast apoptosis in vivo by stimulating Bcl-xL

- expression through Ets-2  
2. *Arthritis Rheum* 2005;52:2708-18.
236. Woo KM, Kim HM, Ko JS. Macrophage colony-stimulating factor promotes the survival of osteoclast precursors by up-regulating Bcl-X(L)  
1. *Exp Mol Med* 2002;34:340-6.
237. Wu X, McKenna MA, Feng X, Nagy TR, McDonald JM. Osteoclast apoptosis: the role of Fas in vivo and in vitro  
2. *Endocrinology* 2003;144:5545-55.
238. Gori F, Hofbauer LC, Dunstan CR, Spelsberg TC, Khosla S, Riggs BL. The expression of osteoprotegerin and RANK ligand and the support of osteoclast formation by stromal-osteoblast lineage cells is developmentally regulated  
1. *Endocrinology* 2000;141:4768-76.
239. Kitajima I, Nakajima T, Imamura T, et al. Induction of apoptosis in murine clonal osteoblasts expressed by human T-cell leukemia virus type I tax by NF-kappa B and TNF-alpha  
3. *J Bone Miner Res* 1996;11:200-10.
240. Tsuboi M, Kawakami A, Nakashima T, et al. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta increase the Fas-mediated apoptosis of human osteoblasts  
2. *J Lab Clin Med* 1999;134:222-31.
241. Urayama S, Kawakami A, Nakashima T, et al. Effect of vitamin K2 on osteoblast apoptosis: vitamin K2 inhibits apoptotic cell death of human osteoblasts induced by Fas, proteasome inhibitor, etoposide, and staurosporine  
1. *J Lab Clin Med* 2000;136:181-93.
242. Debais F, Lefevre G, Lemonnier J, et al. Fibroblast growth factor-2 induces osteoblast survival through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent, -beta-catenin-independent signaling pathway  
1. *Exp Cell Res* 2004;297:235-46.
243. Hill PA, Tumber A, Meikle MC. Multiple extracellular signals promote osteoblast survival and apoptosis  
1. *Endocrinology* 1997;138:3849-58.
244. Hay E, Lemonnier J, Fromigue O, Marie PJ. Bone morphogenetic protein-2 promotes osteoblast apoptosis through a Smad-independent, protein kinase C-dependent signaling pathway  
1. *J Biol Chem* 2001;276:29028-36.
245. Gorgoulis VG, Zacharatos P, Kotsinas A, Kletsas D, Mariatos G, Zoumpourlis V et al. p53 activates ICAM-1 (CD54) expression in an NF-kappaB-independent manner. *EMBO J* 2003; 22(7):1567-1578.

246. Levine AJ p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997; 88:323–331.
247. El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993; 75:817–825.
248. Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell* 1994; 79:573–582.
249. Thompson EB. The many roles of c-Myc in apoptosis. *Annu Rev Physiol* 1998; 60:575–600.
250. Silvestris F, Cafforio P, Tucci M, Grinello D, Dammacco F. Upregulation of osteoblast apoptosis by malignant plasma cells: a role in myeloma bone disease. *Br J Haematol* 2003; 122(1):39-52.
251. Silvestris F, Cafforio P, Calvani N, Dammacco F. Impaired osteoblastogenesis in myeloma bone disease: role of upregulated apoptosis by cytokines and malignant plasma cells. *Br J Haematol* 2004; 126(4):475-486.
252. Lajeunesse D, Kiebzak GM, Frondoza C, Sacktor B: Regulation of osteocalcin secretion by human primary bone cells and by the human osteosarcoma cell line MG-63. *Bone Miner* 14:237-250, 1991.
253. Raisz LG, Fall PM: Biphasic effects of prostaglandin E2 on bone formation in cultured fetal rat calvariae: interaction with cortisol. *Endocrinology* 126:1654-1659, 1990.
254. Blankenberg S, Barbaux S, Tiret L. Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2003; 170(2):191-203.
255. Littler AJ, Buckley CD, Wordsworth P, Collins I, Martinson J, Simmons DL. A distinct profile of six soluble adhesion molecules (ICAM-1, ICAM-3, VCAM-1, E-selectin, L-selectin and P-selectin) in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1997; 36(2):164-169.
256. Ponthieux A, Herbeth B, Droesch S, Haddy N, Lambert D, Visvikis S. Biological determinants of serum ICAM-1, E-selectin, P-selectin and L-selectin levels in healthy subjects: the Stanislas study. *Atherosclerosis* 2004; 172(2):299-308.
257. Kostler WJ, Tomek S, Brodowicz T, Budinsky AC, Flamm M, Hejna M et al. Soluble ICAM-1 in breast cancer: clinical significance and biological implications. *Cancer Immunol Immunother* 2001; 50(9):483-490.
258. Sumino H, Ichikawa S, Kasama S, Kumakura H et al. Effect of transdermal hormone replacement therapy on carotid artery wall thickness and levels of



- vascular inflammatory markers in postmenopausal women. *Hypertens Res* 2005; 28(7):579-84.
259. Kohlmeir JE, Chan MA, Benedict SH. Costimulation of naive human CD4 T cells through intercellular adhesion molecule-1 promotes differentiation to a memory phenotype that is not strictly the result of multiple rounds of cell division. *Immunology*. 2006; 118(4):549-58.
260. Fransson J, Tornberg UC, Borrenaeck CA, Carlsson R, Frendeus B. Rapid induction of apoptosis in B-cell lymphoma by functionally isolated human antibodies. *Int J Cancer* 2006; 119(2):349-58.
261. Jullien D, Prinz JC, Langley RGB, et al. T-cell modulation for the treatment of chronic plaque psoriasis with efalizumab (Raptiva®): mechanisms of action. *Dermatology* 2004; 208:297-306.
262. Lee KH, Dinner AR, Tu C, et al. The immunological synapse balances T cell receptor signaling and degradation. *Science* 2003; 302:1218-1222.
263. Papp K, Bissonnette R, Krueger JG, et al. The treatment of moderate to severe psoriasis with a new anti-CD11a monoclonal antibody. *J Am Acad Dermatol* 2001; 45:665-674.
264. Kootstra CJ, Van Der Giezen DM, Van Krieken JH, De Heer E, Bruijn JA. Effective treatment of experimental lupus nephritis by combined administration of anti-CD11a and anti-CD54 antibodies. *Clin Exp Immunol* 1997; 108(2):324-32.
265. Pietersz GA, Sandrin MS, Ling S, Li YQ, McKenzie IFC. LFA-1 and ICAM-1 antibody-idarubicin conjugates separately prolong murine cardiac allograft survival. *Transpl Immunol* 2001; 9(1):7-11.
266. Martin X, Da Silva M, Virieux SR, Hadj Aissa A, Buffet R, Tiollier J, Dubernard JM. Protective effect of an anti-LFA 1 monoclonal antibody (odulimomab) on renal damage due to ischemia and kidney autotransplantation. *Transplant Proc* 2000; 32(2):481.
267. Dubertret L, Sterry W, Bos JD, et al. Clinical experience acquired with the efalizumab (Raptiva) (CLEAR) trial in patients with moderate-to-severe plaque psoriasis: results from a phase III international randomized, placebo-controlled trial. *Br J Dermatol* 2006; 155(1):170-81

268. Buhaescu I, Segall L, Goldsmith D, Covic A. New immunosuppressive therapies in renal transplantation: monoclonal antibodies. *J Nephrol* 2005; 18(5):529-36.
269. Yacyshyn BR, Chey WY, Salzberg B, et al. Double blind, placebo controlled trial of the remission inducing and steroid sparing properties of an ICAM-1 antisense oligodeoxynucleotide, alicaforsen (ISIS 2302), in active steroid dependent Crohn's disease. *Gut*. 2002; 51(1):30-6.
270. Huang Q. Inhibitory effects of sasanquasaponin on over-expression of ICAM-1 and on enhancement of capillary permeability induced by burns in rats. *Burns* 2005; 31(5):637-42.
271. Casas-Ganem J, Healey JH. Advances that are changing the diagnosis and treatment of malignant bone tumors. *Curr Opin Rheumatol* 2005; 17(1):79-85.
272. Coleman RE, Rubens RD. The clinical course of bone metastases from breast cancer. *Br J Cancer* 1987; 55(1):61-66.
273. Coleman RE. Metastatic bone disease: clinical features, pathophysiology and treatment strategies. *Cancer Treat Rev* 2001; 27(3):165-176.
274. Asosingh K, Vankerkhove V, Van R, I, Van Camp B, Vanderkerken K. Selective in vivo growth of lymphocyte function- associated antigen-1-positive murine myeloma cells. Involvement of function-associated antigen-1-mediated homotypic cell-cell adhesion. *Exp Hematol* 2003; 31(1):48-55.
275. Tatsumi T, Shimazaki C, Goto H, Araki S, Sudo Y, Yamagata N et al. Expression of adhesion molecules on myeloma cells. *Jpn J Cancer Res* 1996; 87(8):837-842.
276. Van R, I, Van Camp B. The involvement of adhesion molecules in the biology of multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 1993; 9(6):441-452.
277. Gregoret MG, Gottardi D, Ghia P, Bergui L, Merico F, Marchisio PC et al. Characterization of bone marrow stromal cells from multiple myeloma. *Leuk Res* 1994; 18(9):675-682.
278. Tyner SD, Venkatachalam S, Choi J, Jones S, Ghebranious N, Igelmann H et al. p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature* 2002; 415(6867):45-53.
279. Donehower LA. Does p53 affect organismal aging? *J Cell Physiol* 2002; 192(1):23-33.

280. Kammerer S, Roth RB, Reneland R, Marnellos G, Hoyal CR, Markward NJ et al. Large-scale association study identifies ICAM gene region as breast and prostate cancer susceptibility locus. *Cancer Res* 2004; 64(24):8906-8910.
281. Aalinkeel R, Nair MP, Sufrin G, Mahajan SD, Chadha KC, Chawda RP et al. Gene expression of angiogenic factors correlates with metastatic potential of prostate cancer cells. *Cancer Res* 2004; 64(15):5311-5321.
282. Alexiou D, Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Zbar A, Kremmyda A, Bramis I et al. Serum levels of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 in colorectal cancer patients: correlations with clinicopathological features, patient survival and tumour surgery. *Eur J Cancer* 2001; 37(18):2392-2397.
283. Giavazzi R, Chirivi RG, Garofalo A, Rambaldi A, Hemingway I, Pigott R et al. Soluble intercellular adhesion molecule 1 is released by human melanoma cells and is associated with tumor growth in nude mice. *Cancer Res* 1992; 52(9):2628-2630.
284. Liu YZ, Chen B, She XD. A clinical evaluation of serum concentrations of intercellular adhesion molecule-1 in patients with gastric cancer. *World J Gastroenterol* 1998; 4(3):225-227.
285. Nakata B, Hori T, Sunami T, Ogawa Y, Yashiro M, Maeda K et al. Clinical significance of serum soluble intercellular adhesion molecule 1 in gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6(3):1175-1179.
286. Viac J, Vincent C, Palacio S, Schmitt D, Claudy A. Tumour necrosis factor (TNF) soluble receptors in malignant melanoma: correlation with soluble ICAM-1 levels. *Eur J Cancer* 1996; 32A(3):447-449.
287. Zhang GJ, Adachi I. Serum levels of soluble intercellular adhesion molecule-1 and E-selectin in metastatic breast carcinoma: correlations with clinicopathological features and prognosis. *Int J Oncol* 1999; 14(1):71-77.
288. Becker JC, Dummer R, Hartmann AA, Burg G, Schmidt RE. Shedding of ICAM-1 from human melanoma cell lines induced by IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha. Functional consequences on cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 1991; 147(12):4398-4401.
289. Becker JC, Termeer C, Schmidt RE, Brocker EB. Soluble intercellular adhesion molecule-1 inhibits MHC-restricted specific T cell/tumor interaction. *J Immunol* 1993; 151(12):7224-7232.
290. Gordeladze JO, Reseland JE. A unified model for the action of leptin on bone turnover. *J Cell Biochem* 2003; 88(4):706-712.

291. Komori T. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J Cell Biochem* 2006; 99(5):1233-1239.
292. Massicotte F, Aubry I, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Fernandes J, Lajeunesse D. Abnormal insulin-like growth factor 1 signalling in human osteoarthritic subchondral bone osteoblasts. *Arthritis Res Ther* 2006; 8(6):R177.
293. Voraberger G, Schafer R, Stratowa C. Cloning of the human gene for ICAM-1 and analysis of its 5'-regulatory region. *J Immunol* 1991; 147:2777-2786.
294. Staunton DE, Marlin SD, Stratowa C, Dustin ML, Springer TA. Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene family. *Cell* 1988; 52: 925.

**ANNEXE 1****Evidence for two distinct pathways in TNF $\alpha$ -induced membrane and soluble forms of ICAM-1 in human osteoblast-like cells isolated from osteoarthritis patients**

Qin Shi, Mohamed Benderdour, Patrick Lavigne, Pierre Ranger, Julio C. Fernandes\*

Orthopaedics Research Laboratory, Department of Orthopaedics, Sacre-Cœur Hospital,  
Montréal, Québec, Canada

**Short title:** ICAM-1 expression in human osteoblasts

**Key words:** ICAM-1, osteoarthritis, bone, cytokines

\*Address correspondence to:

Orthopaedics Research Laboratory, Department of Orthopaedics, Sacre-Cœur Hospital,  
bureau K-3045, 5400, boul. Gouin Ouest, Montréal, Québec, Canada H4J 1C5

**Tel:** (514) 338-2222 ext. 2489

Fax: (514) 338-2694

Email: [REDACTED]

### Abstract

**OBJECTIVE:** The present study aimed to investigate the modulation of membrane-bound intercellular adhesion molecule-1 (mICAM-1) and soluble ICAM-1 (sICAM-1) expression by tumor necrosis factor-alpha ( $\text{TNF}\alpha$ ) in human osteoarthritic (OA) osteoblasts. **METHOD:** Cultured human primary osteoblasts were stimulated with increasing concentrations of human recombinant  $\text{TNF}\alpha$ . Expression of mICAM-1 and sICAM-1 was evaluated by immunocytochemistry, enzyme-linked immunosorbent assay and semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction. In addition, we investigated the molecular mechanism underlying ICAM-1 induction by  $\text{TNF}\alpha$ , focusing on activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) and nuclear factor-kappaB (NF- $\kappa$ B) pathways. **RESULTS:** Our data showed that  $\text{TNF}\alpha$  dose-dependently increased mICAM-1 and sICAM-1 expression at the protein and mRNA levels in OA osteoblasts. The inhibitor of *de novo* mRNA synthesis, actinomycin D, suppressed  $\text{TNF}\alpha$ -induced mICAM-1 and sICAM-1 expression. Upon examination of the signaling components, we found that  $\text{TNF}\alpha$  was a potent activator of p38, p44/42, p54/46 MAPK, and I $\kappa$ B $\alpha$ . The chemical inhibitors of p38, p44/42 MAPK, and NF- $\kappa$ B blocked  $\text{TNF}\alpha$ -induced mICAM-1 expression but not that of sICAM-1. Transfection experiments revealed that p38 MAPK or I $\kappa$ B kinase alpha (IKK $\alpha$ ) overexpression enhanced  $\text{TNF}\alpha$ -induced mICAM-1 production. Furthermore, osteoblasts treatment with a chemical inhibitor of metalloproteinase-9 (MMP-9) activity, a proteolytic enzyme involved in ICAM-1 cleavage, evoked a significant 25% decrease of  $\text{TNF}\alpha$ -induced sICAM-1 release. **CONCLUSION:** Taken together, these findings illustrate the central role played by  $\text{TNF}\alpha$  in the regulation of ICAM-1. We suggest that  $\text{TNF}\alpha$  differentially regulates sICAM-1 and

mICAM-1 expression and that sICAM-1 release involves, in part, the proteolytic cleavage of mICAM-1 by MMP-9. The capacity of the MMP-9 inhibitor to prevent sICAM-1 production may be useful for the development of novel therapeutic approaches relevant to OA.

## Introduction

Osteoarthritis (OA) is a disease characterized by progressive degradation of articular cartilage accompanied by secondary inflammation of the synovial membranes and abnormal subchondral trabecular bone remodelling<sup>1,2</sup>. Several lines of evidence indicate that patients with OA exhibit high bone turnover involving both bone formation and resorption. Increased bone resorption followed by elevated bone and osteophyte formation have also been observed in experimental models of OA<sup>3,4</sup>. It is believed that alterations in osteoblast metabolism play an important role in osteoclast maturation and activation by producing excess bone-resorbing cytokines and other pro-inflammatory mediators<sup>5</sup>. Such factors include urokinase plasminogen activator (uPA), insulin growth factor-1 (IGF-1) and prostaglandin E2 (PGE<sub>2</sub>)<sup>6-8</sup>. In early experimental dog OA, Pelletier et al. showed a significant loss of subchondral bone associated with the development of OA cartilage lesions and with an increased osteoclast population that stained strongly positive for cathepsin K and metalloproteinase-13 (MMP-13)<sup>3</sup>. The use of a cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor, licofelone, or bone resorption inhibitors, calcitonin or alendronate, suppressed bone resorption and prevented the subsequent increment of bone formation mainly through the inhibition of osteoclast activities<sup>4,9</sup>.

Adhesion molecules, such as integrins, and the immunoglobulin (Ig) superfamily of intercellular and vascular adhesion molecules (ICAM-1 and VCAM-1) play major roles in cell-cell and cell-extracellular matrix interactions<sup>10</sup>. Of these, ICAM-1 binds to its counter receptor leukocyte function-associated-1 molecule (LFA-1 or CD11a/CD18) as well as Mac-1 (CR3 or CD11a/CD18) on neutrophils, T-cells and macrophages<sup>10-12</sup>, providing a mechanism for the selective recruitment of leukocytes in different pathologic situations<sup>13</sup>. Many cytokines, such as interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ) and tumor necrosis factor-alpha (TNF $\alpha$ ), induce ICAM-1 expression on the surface of



synoviocytes<sup>14</sup>, keratocytes<sup>15</sup>, and human airway epithelial cells<sup>16</sup>. A soluble form of ICAM-1 (sICAM-1) is also detected in the serum of normal individuals, and elevated levels are found during various pathological conditions, including inflammatory, immune and malignant diseases<sup>17-19</sup>. However, the role of sICAM-1 and its mode of production remain elusive. Controversy still surrounds the exact origin of sICAM-1. In some cell types, proteolytic cleavage from membrane-bound ICAM-1 (mICAM-1) has been proposed as a mechanism for the generation of sICAM-1, and its presence would therefore reflect membrane expression of the protein<sup>20;21</sup>. On the other hand, some researchers have identified a specific mRNA coding for sICAM-1 in cells, suggesting that at least 2 modes of sICAM-1 production exist<sup>22;23</sup>.

In bone metabolism, ICAM-1 exerts important osteotropic effects by mediating cell-cell adhesion of osteoblasts and osteoclast precursors, thereby facilitating osteoclast differentiation and bone resorption<sup>24;25</sup>. Furthermore, it has been shown that osteoblasts adhere to opposing cells through ICAM-1, VCAM-1 and LFA-3, resulting in the activation of intracellular signals and leading to the production of bone-resorbing cytokines, such as TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6. Interestingly, ICAM-1 expression and sICAM-1 release from cells are increased by these cytokines, which are found to be major contributors to bone diseases<sup>26-28</sup>. Abnormal sICAM-1 levels in bone diseases have been reported solely in rheumatoid arthritis so far, but no direct role has been attributed in disease pathogenesis. Our group has demonstrated the induction of intracellular signaling in pre-osteoclast cells after incubation with sICAM-1 (study in progress), indicating a possible active role for sICAM-1 in osteoclast-dependent diseases. Although widely reported in other cell types, less attention has been paid to the regulation of mICAM-1 expression and sICAM-1 production in osteoblasts<sup>14-16</sup>.

Therefore, the aim of this study was to demonstrate the effect of the bone-resorbing cytokine TNF $\alpha$  on mICAM-1 and sICAM-1 expression in human osteoblasts

isolated from OA patients. We also wanted to examine whether sICAM-1 is cleaved from the membrane of osteoblasts by a proteolytic cleavage mechanism. We believe that clarifying the modulation and production of mICAM-1 and sICAM-1 in the bone environment could lead to a better understanding of their respective roles in bone pathology.

## Materials and methods

### *In vitro* osteoblast culture

Trabecular bone specimens were collected from patients suffering from advanced OA and undergoing primary total knee replacement (n=36). The diagnosis was established according to American College of Rheumatology criteria<sup>29</sup>. The experimental protocol was approved by the Research Ethics Board at Sacre-Cœur Hospital. Bone specimens were taken within 5 mm of the subchondral bone plate. Every specimen was harvested from the most damaged portion of the tibial plateau. Osteoblast cultures were prepared as already described<sup>5</sup>.

Briefly, trabecular bone samples were cut into small pieces of 2 mm<sup>3</sup> prior to their sequential digestion in the presence of 1 mg/ml collagenase type I (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) in BGJb media (Invitrogen Life Technologies, Burlington, ON, Canada) without serum at 37°C for 30, 30, and 240 minutes. After being washed with the same media, the digested bone pieces were cultured in 25 cm<sup>2</sup> plastic cell culture flasks (Corning Incorporated - Life Sciences, Acton, MA, USA) with BGJb medium containing 20% fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen Life Technologies). This medium was replaced every 2 days until cell outgrowths appeared around the explants. It was demonstrated that cells obtained under these culture conditions had an osteoblast-like cell phenotype<sup>30-32</sup>. At confluency, the cells were split once and plated at 50,000 cells/cm<sup>2</sup> in culture plates (Falcon, Lincoln Park, NJ, USA) with Ham's F12/Dulbecco's modified Eagle medium (HAMF12/DMEM; Sigma-Aldrich) containing 10% FBS plus 50 µg/ml ascorbic acid, and grown to confluence again. Only first-passage cells were used in our experiments.

### **Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**

First-passage trabecular osteoblasts were incubated in 0.5% FBS/HAMF12/DMEM for 48 hours with increasing concentrations of TNF $\alpha$  (0-10 ng/ml). After incubation, the culture medium was collected, and sICAM-1 level was quantified with specific commercial kits from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA), according to the manufacturer's instructions. The sensitivity of the assays was 3 pg/ml. Each ELISA was performed in duplicate according to the manufacturer's specifications. Protein level in the cell lysates was measured by the bicinchoninic acid method<sup>33</sup>.

### **Immunocytochemical staining**

Cellular surface ICAM-1 expression was analyzed by immunocytochemical staining<sup>34</sup>. Osteoblasts ( $5 \times 10^3$ ) were transferred to 8-well culture chamber slides (Lab-Tek, Nalge Nunc International, Naperville, IL, USA), and incubated for 16 hours without or with 1 ng/ml TNF $\alpha$  (R&D Systems). Afterwards, the cells were washed twice with PBS and fixed for 15 minutes at room temperature with PBS containing 10% formaldehyde (Tissufix, Laboratoire Gilles Chaput inc., Montreal, QC, Canada). After washing 3 times with PBS, the cells were incubated for 30 minutes in a DAKO antibody diluent buffer containing mouse monoclonal anti-ICAM-1 antibody (DAKO, Carpinteria, CA, USA). In our experiments, we have used different dilution of the anti-mICAM antibody 1:100, 1:500, 1:1000, and 1:10 000. The optimal dilution of the antibody obtained in our experiments was 1:1000. Then, cells were washed with 0.05% Tween-PBS and incubated for 10 minutes with goat anti-mouse IgG-horseradish peroxidase conjugate (DAKO Envision System). Colour was developed with 3,3'-diaminobenzidine (DAKO Liquid DAB) containing hydrogen peroxide, and the slides were examined under a light microscope (Leitz Orthoplan, Wild Leitz, Ville St-Laurent, QC, Canada). The numbers of total and coloured osteoblasts were counted separately, at 400X magnification, from 3

fields of each well. The results were expressed as the percentage of coloured osteoblasts<sup>34</sup>.

### **Semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)**

Total RNA was extracted from the treated osteoblasts using TRIzol reagent (Invitrogen Life Technologies), according to the manufacturer's instructions. RT-PCR was performed in a Thermocycler (Waterman, Biometra GmbH, Göttingen, Germany) with 1 µg of total RNA. These assays were undertaken with enzymes and reagents of the SuperScript one-step RT-PCR kit manufactured by Invitrogen Life Technologies. Each RT-PCR consisted of cDNA synthesis for 30 min at 42°C and denaturation for 5 minutes at 95°C, followed by an amplification cycle consisting of a denaturation step of 45 seconds at 95°C and an annealing/elongation step of 60 seconds at 55°C. For the last cycle, the elongation step was prolonged to 10 minutes at 72°C. Primers for the detection of mICAM-1 and sICAM-1 were based on those described previously by Wakatsuki et al.<sup>23</sup>. The sequences of the forward primer used to detect mICAM-1 and sICAM-1 were: 5'-CAA GGG GAG GTC ACC CGC GAG GTG-3' and 5'-CAA GGG AGG TCA CCC GCG AGC C-3'. Both primers were combined with a common reverse primer having the following sequence: 5'-TGC AGT GCC CAT TAT GAC TG-3'). The sequences for GADPH, which served as a positive control, were 5'-CCACCCATGGCAAATCCATGGCA-3' (forward) and 5'-TCTAGACGGCAGGTCAQGGTCCAQCC-3' (reverse) (BioCorp Inc., Montreal, QC, Canada).

RT-PCR products were separated on 2% agarose gel and stained with ethidium bromide solution (10 ng/ml). Semi-quantitative measurements were made by taking density readings of each band in a digital imaging system (G-image 2000, Canberra

Packard Canada, Mississauga, ON, Canada). cDNA relative units for ICAM-1 were normalized to that of GAPDH. The data were expressed as percentages of the non-treated control value<sup>35</sup>.

### **Western blotting**

Briefly, 20 µg of cellular protein extract were subjected to 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis under reducing conditions and transferred onto nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The membranes were immersed for 3 hours in a blocking solution consisting of TTBS (Tris 20 mM, pH7.4, NaCl 137 mM, 0.1% Tween 20) and 5% skim milk, and washed twice with TTBS for 15 minutes. They were then incubated overnight in TTBS containing 0.25% skim milk, polyclonal rabbit anti-phospho-p38, anti-phospho-p44/42, anti-phospho-p54/46 mitogen-activated protein kinase (MAPK), anti-phospho-IkappaBalpha (IκBα) (1:1,000, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), or anti-MMP-9 (1:1,000, Calbiochem, San Diego, CA, USA). The membranes were washed 3 times with TTBS, and incubated for 1 hour at 22°C with the second antibody anti-rabbit IgG-HRP (1:1,000, Cell Signaling Technology), then washed again. Immunoreactive proteins were visualized with LumiGLO Chemiluminescent substrate (Cell Signaling Technology). The membranes were prepared for autoradiography and exposed to Kodak X-Omat film (Eastman Kodak Ltd., Rochester, NY, USA).

### **Protein kinases, nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B), and MMP-9 inhibition**

Osteoblasts were pre-incubated for 60 minutes with actinomycin D (ActD) (RNA polymerase II inhibitor), MAPK inhibitors (PD98059 and SB202190), NF- $\kappa$ B inhibitor (PDTC), or MMP-9 inhibitor I (Calbiochem) before the addition of 10 ng/ml TNF $\alpha$  for 24 hours at 37°C. After incubation, mICAM-1 and sICAM-1 expressions were measured by immunocytochemical staining and ELISA as described above.

### **Plasmids and transient transfections**

The expression vector for wild type (WT) pCMV-Flag-p38 and dominant negative (DN) pCMV-Flag-p38 p38 MAPK were kind gifts from Dr. R.J. Davis (University of Massachusetts). The expression vector for IkappaB kinase alpha (IKK $\alpha$ ) was generously donated by Dr. M. Karin (University of California, San Diego, La Jolla, CA). Briefly, human MG-63 osteoblast-like line cells (ATCC, Rockville, MD, USA) (around 50% confluence) were transiently transfected with vectors of WT or DN p38 MAPK, followed by stimulation with TNF $\alpha$  (10 ng/ml) in 12-well cluster plates using lipofectamine 2000<sup>TM</sup> reagents (Invitrogen Life Technologies) according to the manufacturer's protocol. Twenty-four hours after transfection, the culture medium was collected and mICAM-1 expression levels were quantified by ELISA as described by Yang et al. with some modifications<sup>36</sup>. Briefly, the cells were washed twice with PBS and fixed at room temperature with 1% (w/v) paraformaldehyde/glutaraldehyde for 30 minutes. After washing with PBS, they were blocked with PBS containing 5% (w/v) BSA and 0.05% (v/v) Tween 20 for 15 minutes before being incubated with monoclonal anti-ICAM-1 antibody (1:100) for 1 hour and then with HRP-labeled anti-mouse antibody (1:1,000) for 30 minutes. After each incubation, the cells were washed twice with PBS. Tetramethylbenzidine substrate (Sigma-Aldrich) was then applied to them for 30

minutes, after which 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> acid was added to stop the reaction. Absorbance was measured at 450 nm.

### **Statistical analysis**

The results are expressed as means  $\pm$  SEM. All assays were performed in duplicate. Statistical significance was assessed by Student's t-test, and P<0.05 was considered significant.



## Results

We first examined the presence of TNF $\alpha$  levels in osteoblast cultures to be certain that endogenous production would not influence ICAM-1 expression. TNF $\alpha$  could not be detected in the cell culture supernatant, even with a high-sensitivity ELISA kit (data not shown). However, the addition of increasing concentrations of TNF $\alpha$  osteoblasts significantly enhanced mICAM-1 and sICAM-1 production (Figure 1A and 1B). These results were confirmed at the mRNA level in OA osteoblasts where, again, dose-dependent increases of mICAM-1 and sICAM-1 were observed after TNF $\alpha$  stimulation, correlating with the protein expression pattern (Figure 1C).

Immunostaining of osteoblasts with ICAM-1 antibody revealed that this protein was expressed at basal levels in unstimulated cells with a mean  $\pm$  SEM of  $29 \pm 6\%$  ( $n = 3$  experiments) (Figure 2A). In the presence of 1 ng/ml TNF $\alpha$  (16 hours of incubation), the percentage of positively-stained osteoblasts increased significantly with a mean  $\pm$  SEM of  $87 \pm 9\%$  ( $n = 3$  experiments) (Figure 2B). Staining specificity was confirmed by substitution of the primary mICAM-1 antibody with an autologous preimmune serum (Figure 2C). Incubation of osteoblasts with 1 ng/ml TNF $\alpha$  for different incubation periods revealed that the effect on mICAM-1 surface expression was time-dependent as heightened surface expression was apparent as early as 4 hours after exposure to TNF $\alpha$ , with a maximal effect at 16 hours (results not shown).

Next, we demonstrated that TNF $\alpha$ -increased mICAM-1 and sICAM-1 mRNA levels required *de novo* mRNA synthesis, by pre-incubating osteoblasts with ActD before adding 10 ng/ml TNF $\alpha$  (Figure 3). The expression of both mICAM-1 (Figure 3A and 3B) and sICAM-1 (Figure 3C and 3D) at the mRNA and protein levels was completely blocked by the RNA synthesis inhibitor ActD.

To gain insight into the signaling pathway activated by  $\text{TNF}\alpha$  in human OA osteoblasts, we first examined the  $\text{TNF}\alpha$ -induced phosphorylation patterns of MAPKs and  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  over increasing periods of time. Our data indicated that  $\text{TNF}\alpha$  stimulated p38, p42/p44, and p54/46 MAPK as well as  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  phosphorylation within 5 minutes (Figure 4). p38 MAPK remained in a phosphorylated state for ~60 minutes of incubation, but p44/42, p54/46 MAPK and  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  activation peaked at 15 minutes, and decreased thereafter at 60 minutes. No change in the total protein level of MAPKs was noted (data not shown).

To better define the  $\text{TNF}\alpha$  signalling cascades involved in ICAM-1 synthesis, OA osteoblasts were pre-incubated with chemical inhibitors of p38 MAPK (SB202190), p44/42 (PD98059), and  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  (PDTC) before adding 10 ng/ml  $\text{TNF}\alpha$ . mICAM-1 protein expression was reduced with SB202190 (Figure 5A), PD98059 (Figure 5B), and PDTC (Figure 5C). In contrast,  $\text{TNF}\alpha$ -induced sICAM-1 release was not affected by any of the chemical inhibitors.

To clarify the role of p38 MAPK and  $\text{IKK}\alpha$  in  $\text{TNF}\alpha$ -mediating mICAM-1 production, we conducted transfection experiments with WT and DN vectors of p38 MAPK or  $\text{IKK}\alpha$  after  $\text{TNF}\alpha$  treatment. Overexpression of WT p38 MAPK or  $\text{IKK}\alpha$  plasmids markedly increased basal mICAM-1 protein expression, and  $\text{TNF}\alpha$  treatment further enhanced mICAM-1 expression compared to  $\text{TNF}\alpha$  alone (Figure 6). However, overexpression of DN p38 MAPK abrogated this effect (data not shown).

Finally, to get a better understanding of MMP-mediated mICAM-1 cleavage, we used MMP-9 inhibitor I to evaluate other possible mechanisms involved in sICAM-1 production. We observed that the addition of MMP-9 inhibitor I (10 nM) significantly reduced 25% of  $\text{TNF}\alpha$ -enhanced sICAM-1 release and did not change basal sICAM-1 production (Figure 7A). To confirm the ability of  $\text{TNF}\alpha$  to induce MMP-9 synthesis, OA

osteoblasts were treated with working concentrations of this cytokine (0.1-10 ng/ml), and MMP-9 was measured in the culture media. Western blotting analysis revealed that TNF $\alpha$  dose-dependently increased MMP-9 release by osteoblasts (Figure 7B).

## Discussion

ICAM-1 has previously been reported to be involved in osteoclast differentiation and bone resorption. In a co-culture system of mouse spleen cells and osteoblasts or stromal cells, cellular interaction through ICAM-1 could be blocked by anti-CD54 monoclonal antibodies, which resulted in decreased osteoclast formation *in vitro*<sup>24;25</sup>. Further, a previous study by our group showed that ICAM-1 expression on human osteoblasts obtained from OA or osteoporotic patients was higher when compared to normal human osteoblasts. Also, IL-6 and PGE<sub>2</sub> levels in supernatant were found to be elevated with high ICAM-1 expression<sup>34</sup>. Several studies have demonstrated increased bone remodelling and osteoclast activity in OA<sup>3</sup>. Biphosphonates, drugs known to inhibit osteoclasts, and licofelone, a COX inhibitor capable of lowering IL-6 and PGE<sub>2</sub> levels, have been seen to reduce osteoclast activity in the setting of OA<sup>3;4</sup>. Because of the role of ICAM-1 in osteoclast recruitment, its differential expression in diseases such as OA, and the increased osteoclast activity observed in OA, understanding the modulation of ICAM-1 expression and the mechanisms regulating it in OA bone could offer new potential therapeutic targets in OA.

So far, no study has looked at the expression and intracellular signaling of mICAM-1 and sICAM-1 in human osteoblasts. As demonstrated in our investigation, stimulation of osteoblasts with TNF $\alpha$  increased mICAM-1 and sICAM-1 expression at the protein and mRNA levels. It is noteworthy that sICAM-1 mRNA expression in response to TNF $\alpha$  occurs at a higher concentration (100-fold) than that of mICAM-1. However, it is possible to detect, in the extracellular milieu, a significant elevation of sICAM-1 after treatment with TNF $\alpha$  at a much lower concentration. This could simply reflect increased cleavage of already present mICAM-1 that is initiated at low TNF $\alpha$  concentration. However, if this were true, sICAM-1 levels would remain high with combined incubation of TNF $\alpha$  and ActD. Furthermore, in contrast to mICAM-1, sICAM-1 levels are not

influenced by protein kinase inhibitors. Taken together, these results suggest that there are 2 separate pathways for the generation and regulation of mICAM-1 expression and sICAM-1 production in human OA osteoblasts.

Our data seem to be in accordance with those of Wakatsuki et al.<sup>23</sup> who reported a specific mRNA coding for sICAM-1. We observed the presence of sICAM-1 mRNA splice in human osteoblasts using the specific primers of Wakatsuki et al.<sup>23</sup>. The meaning of this finding in bone remains to be defined. However, in various inflammatory and malignant pathological conditions, increased expression of sICAM-1 indicates a possible reciprocal relationship between sICAM-1 and inflammation<sup>18;19</sup>. However, the relationship between circulating and membrane-bound ICAM-1 is controversial. Some studies report a similar physiological role for these 2 molecules, whereas others describe opposite actions<sup>22;37-41</sup>. We can only postulate whether sICAM-1 inhibits cellular adhesion or promotes the effect of mICAM-1 in bone metabolism. An anti-osteoclastogenic role for sICAM-1 would place it in the same category as osteoprotegerin (OPG), while a pro-osteoclastogenic role would potentially act in the same manner as soluble receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (sRANKL). Although the exact role of sICAM-1 remains elusive, we believe that increased mICAM-1 expression in response to TNF $\alpha$  stimulation could facilitate the interaction of osteoblasts with osteoclast precursors.

TNF $\alpha$ , a pleiotropic cytokine primarily produced by activated macrophages and T-lymphocytes, has a wide range of biological effects, including inflammation, mitogenesis, differentiation, immune modulation and anti-tumor immunity<sup>42</sup>. TNF $\alpha$  is also considered to be one of most important cytokines implicated in osteoporosis, arthritis and wear debris-induced osteolysis<sup>28</sup>. It supports the differentiation and survival of osteoclasts, but not resorption activity. The ability of osteoblasts to express adhesion

molecules, such as ICAM-1, in addition to their ability to produce and respond to different cytokines, such as  $\text{TNF}\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , transforming growth factor-beta (TGF $\beta$ ), and IL-6, suggests that osteoblasts can function as modulators and/or effectors of inflammatory processes and osteoclastogenesis. We believe that the osteoclastogenic action of these cytokines is, at least in part, modulated through ICAM-1.

Our results disclosed that the induction of ICAM-1 expression could be prevented by co-incubation with ActD (an inhibitor of RNA transcription). This means that the induction of ICAM-1 expression requires *de novo* mRNA synthesis, indicating its regulation at the transcriptional level. Investigations into the signal transduction pathways of  $\text{TNF}\alpha$  showed rapid and significant phosphorylation of p38, p44/42, p54/46 MAPK as well as I $\kappa$ B $\alpha$ . Next, we tested the effect of MAPK- and NF- $\kappa$ B-specific inhibitors on  $\text{TNF}\alpha$ -induced mICAM-1. Our data revealed that all chemical inhibitors, SB202190, PD98059, and PDTC, abrogated  $\text{TNF}\alpha$ -induced mICAM-1 protein expression. Interestingly, these chemical products failed to inhibit sICAM-1 upregulation by  $\text{TNF}\alpha$ . Furthermore, the overexpression of WT p38 MAPK and IKK $\alpha$  enhanced  $\text{TNF}\alpha$ -induced mICAM-1. These results were supported by other recent studies indicating that  $\text{TNF}\alpha$  is a potent inducer of ICAM-1 in various cell types<sup>43;44</sup>. It has been reported that the activation of p38 MAPK and NF- $\kappa$ B appears necessary for the regulation of ICAM-1 expression. In the ICAM-1 promoter, numerous cis-elements have been identified to exert transcriptional control of ICAM-1. Among these elements, NF- $\kappa$ B and activator protein 1 (AP-1) were shown to act as the most critical of these regulatory elements for ICAM-1 transcription<sup>45</sup>. Mutation in the AP-1 and NF- $\kappa$ B sequence attenuates pro-inflammatory cytokine-stimulated ICAM-1 promoter activity<sup>46;47</sup>. While increased sICAM-1 levels can be attributed to its transcriptional regulation, another mechanism has been considered crucial in sICAM-1. This mechanism includes the proteolytic cleavage of mICAM-1 by MMPs. To investigate it, osteoblasts were co-treated with 10 nM of an

inhibitor of MMP-9 and 10 ng/ml TNF $\alpha$ . We observed that the addition of MMP-9 inhibitor I significantly reduced TNF $\alpha$ -enhanced sICAM-1 expression, which was consistent with other reports<sup>20;48</sup>. Other inhibitors of MMP-9, such as Batimastat, have been shown to inhibit TNF $\alpha$ -induced mICAM-1 cleavage in primary glial cells. Further experiments using a specific antibody for splice variant-derived sICAM-1 (relative to conventional cell surface ICAM-1) will be performed to investigate the relationship between ICAM-1 and MMP-9.

## Conclusion

This study reports an increase in ICAM-1 expression after the exposure of human osteoblasts to TNF $\alpha$ . This heightened expression appears to be mediated through activation of MAPK and IKK $\alpha$  cascades. Further, the regulation of sICAM-1 includes 2 mechanisms: (i) shedding/cleavage of conventional cell surface ICAM-1 protein by MMP-9, and (ii) de novo synthesis from a specific coding mRNA. It is well-known that ICAM-1 has a close relationship with inflammation, and TNF $\alpha$  has many effects in producing inflammatory responses. Therapeutic approaches have been taken to induce anti-inflammatory effects by blocking the ICAM-1 or TNF $\alpha$ -dependent pathway with a neutralizing antibody<sup>49</sup>. In bone disease, blockage of the interaction between TNF $\alpha$  and ICAM-1 may inhibit not only inflammation in the joint but also bone resorption by suppressing the osteoblast-mediated formation of osteoclasts<sup>49</sup>. These findings could have clinical implications in the future treatment of bone loss diseases, such as osteoporosis, arthritis and aseptic loosening.

## Acknowledgements

We thank Drs. M. Karen and R.J. Davis respectively for their generous gifts of IKK $\alpha$  and p38 MAPK expression plasmids. This study was supported by *Fonds de la recherche en santé du Québec* and Stryker-Howmedica Osteonics. Dr. Fernandes is a research scholar of the FRSQ.



## Figure legends

**Figure 1.** (A) Effects of  $\text{TNF}\alpha$  on membrane-bound intercellular adhesion molecule (mICAM-1) expression. Osteoarthritic (OA) osteoblasts were incubated for 18 hours in the absence or presence of the indicated concentrations of  $\text{TNF}\alpha$  (n=6). Then, mICAM-1 expression was evaluated by immunocytochemical staining using a specific anti-mICAM-1 antibody. Data are expressed as the percentage of positive osteoblasts and are means  $\pm$  SEM. (B) Effects of  $\text{TNF}\alpha$  on soluble ICAM-1 (sICAM-1) release. OA osteoblasts (n=3) were incubated for 48 hours in the absence or presence of the indicated concentrations of  $\text{TNF}\alpha$ . Then, sICAM-1 production was evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The data were expressed as pg/mg.prot. and are means  $\pm$  SEM. (C) Representative semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) gel for ICAM-1 mRNA analysis. The cells were incubated for 1 hour in the absence or presence of the indicated concentrations of  $\text{TNF}\alpha$ . The experiment was completed with 1  $\mu\text{g}$  RNA for each test and 35 cycles of PCR for ICAM-1 and 25 cycles of PCR for the internal positive control, GAPDH. The gel is representative of 3 independent experiments. mRNA levels (arbitrary units) were then quantified by densitometry. mICAM-1 and sICAM-1 levels were normalized against those of GAPDH mRNA and expressed as a percentage of untreated cells. Statistical analysis was performed by Student's t-test. *P* values are compared to the corresponding value for cells incubated in the absence of  $\text{TNF}\alpha$ . \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001.

**Figure 2.** Representative immunocytochemical staining of mICAM-1 expression. Osteoblasts were incubated for 18 hours in the absence (A) or presence of  $\text{TNF}\alpha$  at 1 ng/ml (B). Then, cell surface ICAM-1 expression was evaluated by immunocytochemical

staining with antibodies specific for this protein, or substitution of primary antibody mICAM-1 with autologous preimmune serum as a control of staining specificity (C). mICAM-1-positive cells were detected with diaminobenzidine, and nuclei were counterstained with Hematoxylin (see Materials and methods, original magnification x 400). Immunocytochemistry data represent 3 independent experiments.

**Figure 3.** TNF $\alpha$ -induced ICAM-1 required *de novo* mRNA synthesis. Human OA osteoblasts were pre-incubated for 1 hour with 10  $\mu$ g/ml actinomycin D (ActD), followed by another incubation for 4 hours with 10 ng/ml TNF $\alpha$ . 1  $\mu$ g of total RNA was processed for RT-PCR analysis to determine the mRNA levels of mICAM-1 (A), sICAM-1 (C), and GAPDH, as described in Materials and methods. Protein levels of mICAM-1 (B) and sICAM-1 (D) were determined by immunocytochemical staining and ELISA. The data are expressed as in the Figure 1 legend (n=3). Statistical analysis was performed by Student's t-test. *P* values are compared to the corresponding value for cells incubated in the absence of TNF $\alpha$ . \*\*\**p*<0.001.

**Figure 4.** Time course of the effect of TNF $\alpha$  on cell signaling pathways. Human OA osteoblasts were treated with 10 ng/ml TNF $\alpha$  for the indicated times. Total cell lysates (approximately 20  $\mu$ g) were prepared and subjected to Western blot analysis with the phosphospecific antibodies anti-phospho-p38 MAPK (n=3), anti-phospho-p44/42 MAPK (n=3), anti-phospho-p54/46 MAPK (n=3), or anti-phospho-I $\kappa$ B $\alpha$  (n=3).

**Figure 5.** Effect of protein kinase inhibitors and NF- $\kappa$ B inhibitor on TNF $\alpha$ -induced ICAM-1. The cells were pre-incubated for 30 minutes with different chemical inhibitors: (A) SB202190 (a p38 MAPK inhibitor), (B) PD98059 (a p44/42 MAPK inhibitor), and (C)

PDTC (a NF- $\kappa$ B inhibitor), followed by another incubation for 24 hours in the presence or absence of 10 ng/ml TNF $\alpha$ . Values are expressed as % of TNF $\alpha$ -treated osteoblasts (n=4). Statistical analysis was performed by Student's t-test. *P* values are compared to the corresponding value for cells incubated in the absence of TNF $\alpha$ . \**p*<0.05, \*\**p*<0.01.

**Figure 6.** Effect of IKK $\alpha$  and p38 MAPK overexpression on TNF $\alpha$ -induced mICAM-1 expression. Transient transfection of MG-63 osteoblasts was performed with 1  $\mu$ g of expression vectors of either IKK $\alpha$ , WT or DN p38 MAPK, as described in Materials and methods. Six hours after transfection, fresh 0.5% FBS/DMEM was added in the absence or presence of 10 ng/ml TNF $\alpha$  for another 24 hours. After incubation, the cells were fixed, and mICAM-1 levels were quantified by ELISA. Values are the means  $\pm$  SEM of 3 experiments. Statistical analysis was performed by Student's t-test. *P* values are compared to the corresponding value for cells incubated in the absence of TNF $\alpha$ . \**p*<0.05, \*\**p*<0.01.

**Figure 7.** Role of MMP-9-mediated sICAM-1 release. (A) Osteoblasts were preincubated for 1 hour in the absence or presence of MMP-9 inhibitor (10 nM), followed by incubation with or without TNF $\alpha$  (10 ng/ml) for another 24 hours. Then, sICAM-1 expression was evaluated by ELISA. (B) Osteoblasts were treated with increasing concentrations of TNF $\alpha$  (0.1-10 ng/ml) for 24 hours, and the culture medium was collected for Western blotting, using rabbit anti-MMP-9 antibody. Values are the means  $\pm$  SEM of 3 experiments. Statistical analysis was performed by Student's t-test. *P* values represent control *versus* MMP-9 inhibitor, control *versus* TNF $\alpha$ , control *versus* TNF $\alpha$  + MMP-9 inhibitor, and TNF $\alpha$  *versus* TNF $\alpha$  + MMP-9 inhibitor. \**p*<0.05, \*\**p*<0.01.

## References

1. Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Howell DS. Etiopathogenesis of osteoarthritis. In: W.J.Koopman, ed. *Arthritis & Allied Conditions. A Textbook of Rheumatology*. Baltimore: Williams & Wilkins; 2000:2195-2245.
2. Lajeunesse D, Reboul P. Subchondral bone in osteoarthritis: a biologic link with articular cartilage leading to abnormal remodeling. *Curr.Opin.Rheumatol*. 2003;15:628-633.
3. Pelletier JP, Boileau C, Brunet J, Boily M, Lajeunesse D, Reboul P, *et al*. The inhibition of subchondral bone resorption in the early phase of experimental dog osteoarthritis by licofelone is associated with a reduction in the synthesis of MMP-13 and cathepsin K. *Bone* 2004;34:527-538.
4. Hayami T, Pickarski M, Wesolowski GA, McLane J, Bone A, Destefano J, *et al*. The role of subchondral bone remodeling in osteoarthritis: reduction of cartilage degeneration and prevention of osteophyte formation by alendronate in the rat anterior cruciate ligament transection model. *Arthritis Rheum* 2004;50:1193-1206.
5. Shi Q, Lajeunesse D, Reboul P, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Dehnade F, *et al*. Metabolic activity of osteoblasts from periprosthetic trabecular bone in failed total hip arthroplasties and osteoarthritis as markers of osteolysis and loosening. *J.Rheumatol*. 2002;29:1437-1445.
6. Lajeunesse D, Martel-Pelletier J, Fernandes JC, Laufer S, Pelletier JP. Treatment with licofelone prevents abnormal subchondral bone cell metabolism in experimental dog osteoarthritis. *Ann.Rheum Dis*. 2004;63:78-83.
7. Pelletier JP, Lajeunesse D, Hilal G, Jovanovic D, Fernandes JC, Martel-Pelletier J. Carprofen reduces the structural changes and the abnormal subchondral bone metabolism of experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis.Cartilage*. 1999;7:327-328.
8. Pelletier JP, Lajeunesse D, Jovanovic DV, Lascau-Coman V, Jolicoeur FC, Hilal G, *et al*. Carprofen simultaneously reduces progression of morphological changes in cartilage and subchondral bone in experimental dog osteoarthritis. *J.Rheumatol*. 2000;27:2893-2902.
9. Manicourt DH, Altman RD, Williams JM, Devogelaer JP, Druetz-Van Egeren A, Lenz ME, *et al*. Treatment with calcitonin suppresses the responses of bone, cartilage, and synovium in the early stages of canine experimental osteoarthritis and significantly reduces the severity of the cartilage lesions. *Arthritis Rheum* 1999;42:1159-1167.
10. Yusuf-Makagiansar H, Anderson ME, Yakovleva TV, Murray JS, Siahaan TJ. Inhibition of LFA-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 as a therapeutic approach to inflammation and autoimmune diseases. *Med.Res.Rev*. 2002;22:146-167.
11. Siegel G, Malmsten M. The role of the endothelium in inflammation and tumor metastasis. *Int.J.Microcirc.Clin.Exp*. 1997;17:257-272.

12. Bo L, Peterson JW, Mork S, Hoffman PA, Gallatin WM, Ransohoff RM, *et al.* Distribution of immunoglobulin superfamily members ICAM-1, -2, -3, and the beta 2 integrin LFA-1 in multiple sclerosis lesions. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 1996;55:1060-1072.
13. Lehmann JC, Jablonski-Westrich D, Haubold U, Gutierrez-Ramos JC, Springer T, Hamann A. Overlapping and selective roles of endothelial intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and ICAM-2 in lymphocyte trafficking. *J.Immunol.* 2003;171:2588-2593.
14. Lindsley HB, Smith DD, Cohick CB, Koch AE, Davis LS. Proinflammatory cytokines enhance human synoviocyte expression of functional intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). *Clin.Immunol.Immunopathol.* 1993;68:311-320.
15. Kumagai N, Fukuda K, Fujitsu Y, Nishida T. Expression of functional ICAM-1 on cultured human keratocytes induced by tumor necrosis factor-alpha. *Jpn.J.Ophthalmol.* 2003;47:134-141.
16. Krunkosky TM, Fischer BM, Martin LD, Jones N, Akley NJ, Adler KB. Effects of TNF-alpha on expression of ICAM-1 in human airway epithelial cells in vitro. Signaling pathways controlling surface and gene expression. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 2000;22:685-692.
17. Rothlein R, Mainolfi EA, Czajkowski M, Marlin SD. A form of circulating ICAM-1 in human serum. *J.Immunol.* 1991;147:3788-3793.
18. Sessler CN, Windsor AC, Schwartz M, Watson L, Fisher BJ, Sugerman HJ, *et al.* Circulating ICAM-1 is increased in septic shock. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 1995;151:1420-1427.
19. van de SA, van der Saag PT. Intercellular adhesion molecule-1. *J.Mol.Med.* 1996;74:13-33.
20. Lyons PD, Benveniste EN. Cleavage of membrane-associated ICAM-1 from astrocytes: involvement of a metalloprotease. *Glia* 1998;22:103-112.
21. Champagne B, Tremblay P, Cantin A, St PY. Proteolytic cleavage of ICAM-1 by human neutrophil elastase. *J.Immunol.* 1998;161:6398-6405.
22. Whiteman SC, Bianco A, Knight RA, Spiteri MA. Human rhinovirus selectively modulates membranous and soluble forms of its intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) receptor to promote epithelial cell infectivity. *J.Biol.Chem.* 2003;278:11954-11961.
23. Wakatsuki T, Kimura K, Kimura F, Shinomiya N, Ohtsubo M, Ishizawa M, *et al.* A distinct mRNA encoding a soluble form of ICAM-1 molecule expressed in human tissues. *Cell Adhes.Commun.* 1995;3:283-292.
24. Kurachi T, Morita I, Murota S. Involvement of adhesion molecules LFA-1 and ICAM-1 in osteoclast development. *Biochim.Biophys.Acta* 1993;1178:259-266.

25. Okada Y, Morimoto I, Ura K, Watanabe K, Eto S, Kumegawa M, *et al.* Cell-to-Cell adhesion via intercellular adhesion molecule-1 and leukocyte function-associated antigen-1 pathway is involved in 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$ , PTH and IL-1 $\alpha$ -induced osteoclast differentiation and bone resorption. *Endocr.J.* 2002;49:483-495.
26. Tanaka Y, Nakayamada S, Okada Y. Osteoblasts and osteoclasts in bone remodeling and inflammation. *Curr.Drug Targets.Inflamm.Allergy* 2005;4:325-328.
27. Williams RO, Feldmann M, Maini RN. Cartilage destruction and bone erosion in arthritis: the role of tumour necrosis factor alpha. *Ann.Rheum Dis.* 2000;59 Suppl 1:i75-i80.
28. Merkel KD, Erdmann JM, McHugh KP, Abu-Amer Y, Ross FP, Teitelbaum SL. Tumor necrosis factor-alpha mediates orthopedic implant osteolysis. *Am.J.Pathol.* 1999;154:203-210.
29. Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K, *et al.* Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis Rheum* 1986;29:1039-1049.
30. Hilal G, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Ranger P, Lajeunesse D. Osteoblast-like cells from human subchondral osteoarthritic bone demonstrate an altered phenotype in vitro: possible role in subchondral bone sclerosis. *Arthritis Rheum* 1998;41:891-899.
31. Lajeunesse D, Kiebzak GM, Frondoza C, Sacktor B. Regulation of osteocalcin secretion by human primary bone cells and by the human osteosarcoma cell line MG-63. *Bone Miner.* 1991;14:237-250.
32. Tanaka Y, Maruo A, Fujii K, Nomi M, Nakamura T, Eto S *et al.* Intercellular adhesion molecule 1 discriminates functionally different populations of human osteoblasts: characteristic involvement of cell cycle regulators. *J.Bone Miner.Res.* 2000;15:1912-1923.
33. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal.Biochem.* 1985;150:76-85.
34. Lavigne P, Benderdour M, Lajeunesse D, Shi Q, Fernandes JC. Expression of ICAM-1 by osteoblasts in healthy individuals and in patients suffering from osteoarthritis and osteoporosis. *Bone* 2004;35:463-470.
35. Narayanan S, Glasser A, Hu YS, McDermott AM. The effect of interleukin-1 on cytokine gene expression by human corneal epithelial cells. *Exp.Eye Res.* 2005;80:175-183.
36. Yang CR, Hsieh SL, Ho FM, Lin WW. Decoy receptor 3 increases monocyte adhesion to endothelial cells via NF-kappa B-dependent up-regulation of intercellular adhesion molecule-1, VCAM-1, and IL-8 expression. *J.Immunol.* 2005;174:1647-1656.

37. Polverini PJ. Role of the macrophage in angiogenesis-dependent diseases. *EXS* 1997;79:11-28.
38. Yasuda M, Shimizu S, Ohhinata K, Naito S, Tokuyama S, Mori Y, *et al.* Differential roles of ICAM-1 and E-selectin in polymorphonuclear leukocyte-induced angiogenesis. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 2002;282:C917-C925.
39. Marlin SD, Staunton DE, Springer TA, Stratowa C, Sommergruber W, Merluzzi VJ *et al.* A soluble form of intercellular adhesion molecule-1 inhibits rhinovirus infection. *Nature* 1990;344:70-72.
40. Gho YS, Kleinman HK, Sosne G. Angiogenic activity of human soluble intercellular adhesion molecule-1. *Cancer Res.* 1999;59:5128-5132.
41. Rieckmann P, Michel U, Albrecht M, Bruck W, Wockel L, Felgenhauer K. Soluble forms of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) block lymphocyte attachment to cerebral endothelial cells. *J.Neuroimmunol.* 1995;60:9-15.
42. Smith CA, Farrah T, Goodwin RG. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 1994;76:959-962.
43. Chen C, Chou C, Sun Y, Huang W. Tumor necrosis factor alpha-induced activation of downstream NF-kappaB site of the promoter mediates epithelial ICAM-1 expression and monocyte adhesion. Involvement of PKCalpha, tyrosine kinase, and IKK2, but not MAPKs, pathway. *Cell Signal.* 2001;13:543-553.
44. Chen CC, Chow MP, Huang WC, Lin YC, Chang YJ. Flavonoids inhibit tumor necrosis factor-alpha-induced up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in respiratory epithelial cells through activator protein-1 and nuclear factor-kappaB: structure-activity relationships. *Mol.Pharmacol.* 2004;66:683-693.
45. Roebuck KA, Finnegan A. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. *J.Leukoc.Biol.* 1999;66:876-888.
46. Voraberger G, Schafer R, Stratowa C. Cloning of the human gene for intercellular adhesion molecule 1 and analysis of its 5'-regulatory region. Induction by cytokines and phorbol ester. *J.Immunol.* 1991;147:2777-2786.
47. Stade BG, Messer G, Riethmuller G, Johnson JP. Structural characteristics of the 5' region of the human ICAM-1 gene. *Immunobiology* 1990;182:79-87.
48. Fiore E, Fusco C, Romero P, Stamenkovic I. Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9/gelatinase B) proteolytically cleaves ICAM-1 and participates in tumor cell resistance to natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Oncogene* 2002;21:5213-5223.
49. Blackburn WD. Management of osteoarthritis and rheumatoid arthritis: prospects and possibilities. *Am.J.Med.* 1996;100:24S-30S.

















