

## Effets de la 1,25 dihydroxyvitamine D<sub>3</sub> sur la morphologie et l'activité phosphatase alcaline des cellules ostéoblastiques ROS 17/2,8 : influence du temps et de la dose

P Chavassieux \*, G Boivin, C Terrier,  
CM Serre, D Lagarde, PJ Meunier

Faculté Alexis Carrel, INSERM Unité 234, rue G-Paradin, 69372 Lyon cedex 08, France

(15<sup>e</sup> réunion du groupe Développement, INRA, Paris, 24-26 mai 1989)

**Résumé** — Des cellules ostéoblastiques (ROS 17/2,8) ont été exposées à la 1,25 dihydroxyvitamine D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>), soit pendant 4 j à des concentrations comprises entre 0,001 et 1 000 nmol.l<sup>-1</sup>, soit pendant des durées variables de 1 à 21 j à 10 nmol.l<sup>-1</sup>. L'activité phosphatase alcaline (PA) des cellules augmente en fonction de la dose et atteint un maximum pour une concentration de 10 nmol.l<sup>-1</sup> (+ 55%). A des doses supérieures (100 et 1 000 nmol.l<sup>-1</sup>), la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> induit une diminution de 40% de l'activité PA. En présence de 10 nmol.l<sup>-1</sup> de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, l'activité PA augmente dès le 1<sup>er</sup> j (+ 20%) pour atteindre un maximum après 8 j (+ 130%). Après 15 et 21 j, on note une baisse de cette activité. Les études ultrastructurales montrent une prédominance des microtubules dans les régions périnucléaires, après exposition à la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>.

**ostéoblaste / 1,25 dihydroxyvitamine D<sub>3</sub> / phosphatase alcaline / cytosquelette**

**Summary** — Time and dose-dependent effects of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> on the morphology and the alkaline phosphatase activity of ROS 17/2,8 cells. Osteosarcoma-derived osteoblastic cells were exposed to 1,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) either to 0.001-1 000 nmol.l<sup>-1</sup> for 4 days or to 10 nmol.l<sup>-1</sup> for 1-21 days. Between 0.01 and 10 nmol.l<sup>-1</sup>, a dose-dependent increase in alkaline phosphatase (AP) activity was found, which rose to a maximum level at 10 nmol.l<sup>-1</sup> (+ 55%). At higher doses (100 and 1 000 nmol.l<sup>-1</sup>), 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> induced a decrease in AP activity of 40%. After 1 day at 10 nmol.l<sup>-1</sup> a slight increase in AP activity was noted (+ 20%) which augmented with the duration of exposure. This stimulatory effect was highest after 8 days (+ 130%). In contrast, after 15 and 21 days, AP activity decreased by 30%. Under 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, microtubules were observed mainly in the perinuclear region.

**osteoblast / 1,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> / alkaline phosphatase / cytoskeleton**

\* Correspondance et tirés à part

## INTRODUCTION

La vitamine D est connue pour son action sur le tissu osseux. Manolagas *et al* (1980) et Boivin *et al* (1987) ont montré que les cellules ostéoblastiques possédaient des récepteurs à la 1,25 dihydroxyvitamine D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>), métabolite actif de la vitamine D. *In vitro*, la vitamine D influence la synthèse de collagène (Raisz *et al*, 1980), l'activité phosphatase alcaline (Majeska et Rodan, 1982), la sécrétion d'ostéocalcine (Price et Baukol, 1980) des cellules ostéoblastiques. De plus, elle induit des modifications de la forme des cellules (Thomas et Rodan, 1983) associées à une réorganisation du cytosquelette (Gronowicz *et al*, 1986). Le but de cette étude est de préciser les effets de la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> sur l'activité, la morphologie et l'ultrastructure des cellules ostéoblastiques ROS 17/2,8 dérivées d'un ostéosarcome de rat, en fonction de la durée du traitement et de la concentration de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>.

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

Les cellules ROS 17/2,8 sont exposées, soit pendant 4 j à des concentrations croissantes de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (de 0,001 à 1 000 nmol.l<sup>-1</sup>) soit à 10 nmol.l<sup>-1</sup> pendant 1, 2, 3, 4, 8, 15 ou 21 j. Des cellules considérées comme témoins sont cultivées pendant les mêmes temps, en absence de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>.

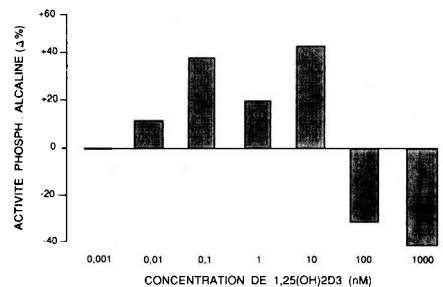
À la fin des expérimentations, l'activité phosphatase alcaline des cellules a été mesurée grâce à la méthode de Lowry, 1955, et la morphologie des cellules a été étudiée en microscopie optique et électronique (centre de microscopie électronique et de pathologie ultrastructurale, Faculté Alexis Carrel, Lyon).

## RÉSULTATS

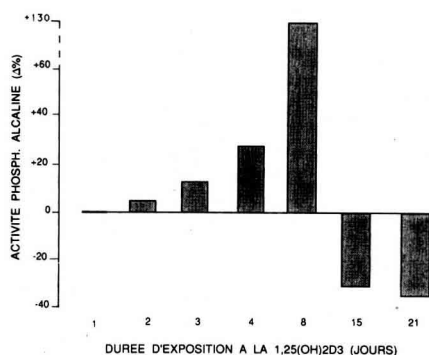
L'activité phosphatase alcaline des cellules ROS 17/2,8 croît en présence de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> en fonction de la dose, pour atteindre un maximum à 10 nmol.l<sup>-1</sup> (+ 54% par rapport aux témoins) (fig 1) et en fonction du temps (+ 130% après 8 j) (fig 2). Aux concentrations et temps supérieurs, cette activité est diminuée par rapport aux témoins (figs 1 et 2).

L'observation en microscopie optique ne montre pas de modifications morphologiques des cellules ROS 17/2,8.

Les observations ultrastructurales montrent que, quelles que soient la durée et la dose, la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> n'induit aucune modification de la répartition des microfilaments. Comme dans les cellules témoins (fig 3A) ils prédominent dans les régions périphériques, sous la membrane cytoplasmique. Les microtubules sont observés au niveau de la région périnucléaire des cellules témoins et traitées mais ils sont plus abondants dans les cellules exposées à la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (fig 3B). De nombreux ribosomes et polysomes sont observés dans



**Fig 1.** Évolution de l'activité phosphatase alcaline des cellules ROS 17/2,8 après 4 j d'exposition à différentes doses de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (Δ%: l'activité phosphatase alcaline des cellules exposées à la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> est exprimée en pourcentage de celle des cellules témoins).



**Fig 2.** Évolution de l'activité phosphatase alcaline des cellules ROS 17/2,8 après exposition à  $10 \text{ nmol.l}^{-1}$  de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  en fonction du temps d'exposition ( $\Delta\%$ : l'activité phosphatase alcaline des cellules exposées à la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  est exprimée en pourcentage de celle des cellules témoins).

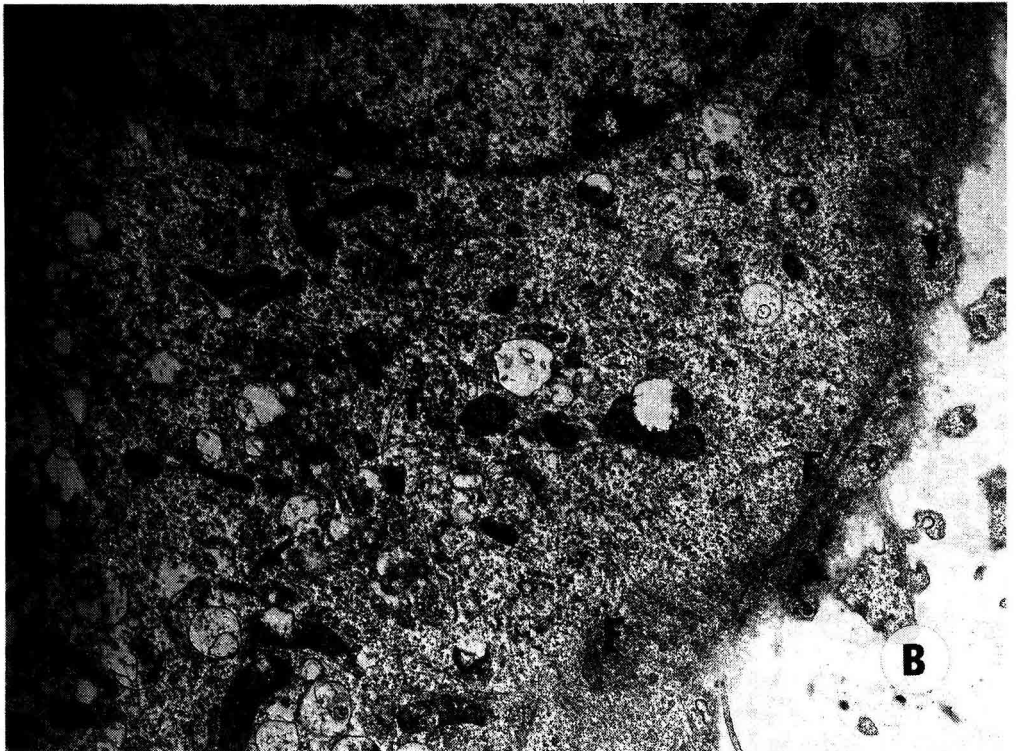
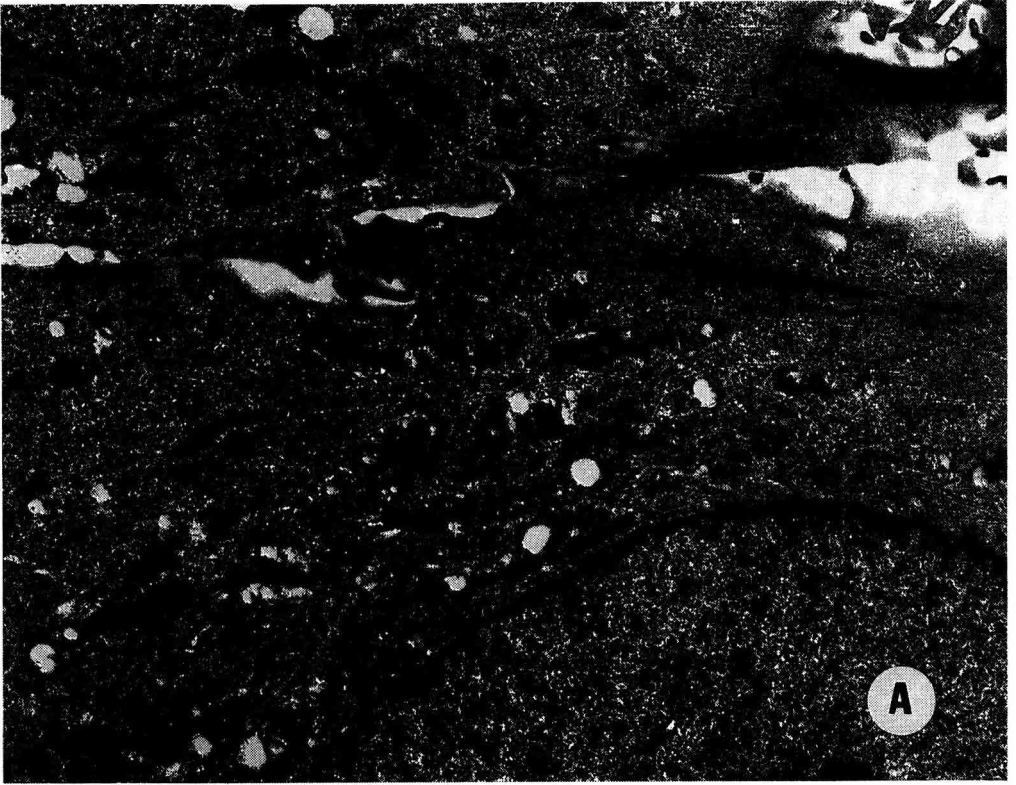
les cellules traitées par la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Au contact de la membrane cytoplasmique de ces cellules, on note la présence de *coated vesicles* (fig 3B). Ces différents aspects sont observés quels que soient les temps d'exposition et la dose de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .

## DISCUSSION

L'activité phosphatase alcaline des cellules ROS 17/2,8 est modulée par la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . La stimulation de cette activité enzymatique par le métabolite actif de la vitamine D est un des critères permettant de déterminer la nature ostéoblastique d'une population cellulaire (Majeska et Rodan, 1984). En fait, il apparaît que l'effet de la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  sur l'activité cellulaire dépend de la dose et du temps d'exposition. Un effet positif est observé pour des concentrations physiologiques ( $0,001 \text{ nmol.l}^{-1}$ ) et jusqu'à des concentrations

$10\,000$  fois supérieures ( $10 \text{ nmol.l}^{-1}$ ). En revanche, une exposition prolongée (15 et 21 j) à  $10 \text{ nmol.l}^{-1}$ , ou une exposition brève à de fortes doses, induit une inhibition de cette activité. Outre l'activité phosphatase alcaline, de précédentes études ont montré que la production de diverses protéines, telles l'ostéocalcine, le collagène de type I, la fibronectine, ou l'ostéopontine (Price et Baukol, 1980; Raisz *et al*, 1980; Francheschi *et al*, 1985; Prince et Butler, 1987) était modulée par la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Ces résultats sont aussi corroborés par les observations ultrastructurales. Le nombre de ribosomes et des polysomes croît avec l'activité phosphatase alcaline, témoignant d'une augmentation de la synthèse protéique sous  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . De précédentes études ont suggéré que la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  agissait sur la production de protéine kinase (Rudack-Garcia et Henry, 1981). Par ailleurs, Pols *et al* (1986) observent une diminution de la réponse à l'hormone parathyroïdienne des cellules exposées simultanément à la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Ces résultats suggèrent un effet de la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  sur le système adénylate cyclase.

Outre son action sur la synthèse protéique, la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  induit des changements de la forme des cellules ostéoblastiques. Dans notre étude, aucune modification importante de la répartition des microfilaments n'a été observée. Seuls les microtubules apparaissent plus nombreux. Ces résultats s'opposent aux observations en immunofluorescence de Gronowicz *et al* (1986) d'après lesquelles la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  aurait un effet plus marqué sur les microfilaments, lié à une synthèse protéique accrue. Il apparaît nécessaire de prendre en compte la densité cellulaire dans l'interprétation de ces résultats. En effet, une étude précédente a montré que la synthèse des protéines du cytosquelette était influencée par la densité et le stade de différenciation cellulaires (Lomri *et al*, 1987).



En conclusion, la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> paraît stimuler l'activité de synthèse protéique des cellules ostéoblastiques, proportionnellement à la dose et à la durée d'exposition. A fortes concentrations, un effet toxique est observé. Les modifications de l'organisation du cytosquelette semblent étroitement liées au niveau de différenciation cellulaire. Les mécanismes et le rôle physiologique de ces effets restent à déterminer.

## RÉFÉRENCES

- Boivin G, Mesguich P, Pike JW, Bouillon R, Meunier PJ, Haussler MR, Dubois PM, Morel G (1987) Ultrastructural immunocytochemical localization of endogenous 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and its receptors in osteoblasts and osteocytes from neonatal mouse and rat calvaria. *Bone Miner* 3, 125-136
- Francheschi RT, James WM, Zerlauth G (1985) 1,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> specific regulation of growth morphology and fibronectin in a human osteosarcoma cell line. *J Cell Physiol* 123, 401-409
- Gronowicz G, Egan JJ, Rodan GA (1986) The effects of 1,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on the cytoskeleton of rat calvaria and rat osteosarcoma (ROS 17/2,8) osteoblastic cells. *J Bone Miner Res* 5, 441-455
- Lomri A, Marie PJ, Eseurat M, Portier MM (1987) Cytoskeletal protein synthesis and organisation in cultured mouse osteoblastic cells. Effects of cell density. *FEBS Lett* 222, 311-316
- Lowry OH (1955) Micromethods for the assay of enzyme. II Specific procedures. Alkaline Phosphatase. In: *Methods in enzymology* 4, 366-381
- Majeska RJ, Rodan GA (1984) Culture and activity of osteoblasts and osteoblast-like cells. In: *Chemistry and Biology of Mineralized Tissue* (Butler WT, ed). Ebsco Media, Birmingham, 279-285
- Manolagas SC, Haussler M, Deftos LJ (1980) 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptor-like macromolecule in rat osteogenic sarcoma cell lines. *J Biol Chem* 255, 4414-4417
- Pols HAP, Schilte HP, Herrmann-Erlee NMP, Visser TJ, Birkenhäger JC (1986) The effects of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on growth, alkaline phosphatase and adenylyl cyclase of rat osteoblast-like cells. *Bone Miner* 1, 397-405
- Price PA, Baukol SA (1980) 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> increases synthesis of the vitamin K-dependent bone protein by osteosarcoma cells. *J Biol Chem* 255, 11660-11663
- Prince CW, Butler WT (1987) 1,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> regulates the biosynthesis of osteopontin, a bone-derived cell attachment protein, in clonal osteoblast-like osteosarcoma cells. *Collagen Relat Res* 7, 305-313
- Raisz LG, Kream BE, Smith MD, Simmons HA (1980) Comparison of the effects of vitamin D metabolites on collagen synthesis and resorption of fetal rat bone in organ culture. *Calcif Tissue Int* 32, 135-138
- Rudack-Garcia D, Henry HL (1981) Effect of vitamin D status on cyclic AMP-dependent protein kinase activity and its heat-stability in chick kidney. *J Biol Chem* 256, 10781-10783
- Thomas HF, Rodan GA (1983) Morphological effects of 1,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on ROS 17/2,8 cells. *J Dent Res* 62, 228

**Fig 3.** Dans les cellules ROS 17/2,8 témoins (A), ou traitées par la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (B), les microfilaments (F) sont présents au niveau de la membrane cytoplasmique. Après exposition à la 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, les microtubules (T) prédominent dans la région périnucléaire. De nombreux ribosomes ou polysomes (→) ainsi que des coated vesicles (►) sont observées (x 10 000).