

SOMMAIRE

Résumé	p 9
Liste des abréviations	p 13
Liste des figures et des tableaux	p 15

1. REVUE GENERALE p 18

1.1. Développement du squelette	p 19
1.1.1. Origine embryologique	p 19
1.1.2. Morphogenèse des membres	p 20
1.1.3. Mécanisme moléculaire de la formation des membres	p 22
1.1.4. De l'ébauche cartilagineuse à l'ossification endochondrale	p 23
1.1.5. Processus de l'ossification endochondrale	p 25
1.1.6. Processus de vascularisation	p 28
1.1.7. Le périoste et le périchondre	p 30
1.1.8. Processus de minéralisation	p 30
1.2. Développement de l'organe dentaire	p 33
1.2.1. Généralités	p 33
1.2.2. Embryologie	p 33
1.2.3. Processus physiologique de l'odontogenèse	p 33
1.2.4. Les différents tissus constitutifs de la dent	p 35
1.2.5. Processus de la dentinogenèse	p 36
1.2.6. Dentinogenèse imparfaite	p 37
1.3. Les dysplasies squelettiques les plus fréquentes	p 39
1.3.1. Définition	p 39
1.3.2. Données épidémiologiques	p 39
1.3.3. Etiopathogénie	p 39
1.3.4. Classification	p 39
1.3.5. Manifestations cliniques	p 42
1.3.6. Diagnostic	p 47
1.3.7. Traitement	p 47

1.4. Les Sphingolipides	p 48
1.4.1. Généralités	p 48
1.4.2. Métabolisme des sphingolipides	p 49
1.4.3. Sphingolipides : structure et fonction	p 51
1.4.3.1. La sphingomyéline	p 51
1.4.3.2. Le céramide	p 52
1.4.3.3. La sphingosine	p 53
1.4.3.4. La sphingosine-1-phosphate	p 54
1.4.3.5. Tableau de synthèse des lipides biactifs	p 55
1.4.4. Le rhéostat sphingolipidique	p 56
1.4.5. Les enzymes de la voie des sphingolipides	p 57
1.4.5.1. Les Sphingomyélinases	p 57
a-Sphingomyélinase acide	p 58
b-Sphingomyélinase alcaline	p 59
c-Sphingomyélinases neutres	p 59
<i>Sphingomyélinase neutre de type 2</i>	p 60
▪ Structure	p 60
▪ Localisation et mécanisme d'activation	p 61
1.4.5.2. Les Céramidases	p 62
a-Céramidases acides	p 62
b-Céramidase neutre	p 63
c-Céramidases alcalines	p 63
1.4.5.3. Les Sphingosines kinases	p 64
1.4.6. Les sphingolipides dans l'ostéochondrogenèse	p 66
1.5. Sphingolipides et os : phénotype des souris <i>fro/fro</i> et <i>smpd3</i> KO	p 69
1.5.1. Souris fragilitas ossium (<i>fro/fro</i>)	p 69
1.5.1.1. Historique	p 69
1.5.1.2. Mutation <i>smpd3</i>	p 69
1.5.1.3. Phénotype de la souris <i>fro/fro</i>	p 70
1.5.1.4. Corrélation en physiopathologie humaine	p 71
1.5.2. Souris <i>smpd3</i> knock-out	p 71
1.5.2.1. Historique	p 71
1.5.2.2. Mutation <i>smpd3</i> ^{-/-}	p 71
1.5.2.3. Phénotype de la souris <i>smpd3</i> knock-out	p 72
1.5.2.4. Corrélation en physiopathologie humaine	p 73
1.5.3. Comparaison des modèles murins <i>fro/fro</i> et <i>smpd3</i>^{-/-}	p 73

2. OBJECTIFS de l'ETUDE	p 77
3. MATERIELS et METHODES	p 80
3.1. Produits et réactifs	p 81
3.2. Animaux	p 82
3.3. Prélèvement d'embryons	p 82
3.4. Cultures cellulaires	p 83
3.4.1. Fibroblastes murins	p 83
3.4.2. Cellules souches mésenchymateuses murines	p 83
3.4.3. Cellules chondrocytaires costales murines	p 83
3.4.4. Cellules chondrocytaires de têtes fémorales murines	p 84
3.4.5. Cellules souches mésenchymateuses de lignée : C3H/10T1/2	p 83
3.4.6. Cellules pré chondrocytaires de lignée : ATDC5	p 85
3.4.7. Cellules pré ostéoblastes de lignée : MC3T3-E1	p 85
3.5. Colorations histologiques	p 85
3.5.1. Coloration Hématoxyline Eosine	p 85
3.5.2. Coloration Bleu Alcyan	p 85
3.5.3. Coloration Von Kossa	p 86
3.5.4. Coloration Rouge Alizarine	p 86
3.5.5. Coloration des squelettes Bleu Alcyan/Rouge Alizarine	p 86
3.6. Immunohistochimie	p 86
3.7. Immunocytochimie	p 87
3.8. Détection de l'apoptose par technique TUNEL	p 88
3.9. RT-PCR quantitative	p 88
3.10. Préparation et oxydation des LDL	p 89
3.11. Evaluation de la toxicité	p 89
3.11.1. MTT	p 89
3.11.2. Syto13/IP	p 90
3.12. Dosage des protéines	p 90
3.13. Western Blot	p 90
3.14. Transfection	p 91

3.15. Statistiques	p 91
4. RESULTATS EXPERIMENTAUX	p 92
4.1. Implication de la nSMase2 dans l'apoptose induite par la privation en nutriments	p 95
4.1.1. Sphingomyélinase et apoptose	p 95
4.2.2. Article	p 98
4.2.3. Discussion	p 107
4.2. Sphingomyélinase neutre et formation de l'os endochondral : Retard de différenciation et de maturation des chondrocytes chez la souris <i>fro/fro</i>	p 111
4.2.1. Accumulation de chondrocytes hypertrophiques et dysfonctionnement de l'apoptose dans les os longs des souris <i>fro/fro</i> nouveaux-nés	p 111
4.2.2. Le retard de maturation des chondrocytes hypertrophiques est associé à un défaut d'expression du facteur de différenciation Runx2 et de MMP13	p 118
4.2.3. Défaut d'expression du VEGF et absence de vascularisation de l'os endochondral chez le nouveau-né <i>fro/fro</i>	p 121
4.2.4. L'inhibition de la nSMase2 altère <i>in vitro</i> la différenciation et la maturation des cellules souches mésenchymateuses en chondrocytes	p 123
4.2.5. Le dysfonctionnement de l'apoptose de chondrocytes pré-hypertrophiques est associé à une diminution des marqueurs d'autophagie et une induction du stress du réticulum endoplasmique	p 125
<i>Autophagie</i>	p 125
<i>ER stress</i>	p 129
4.2.6. Rôle de HAS2 et de l'acide hyaluronique dans le défaut de différenciation des chondrocytes	p 131
4.2.7. Conclusion et perspectives	p 136
4.3. La mutation de la nSMase2 induit un phénotype campomélisque chez la souris <i>fro/fro</i>	p 137
4.3.1. Dysplasie Campomélisque et mutation du gène SOX9	p 138
4.3.2. Expression de Sox9 dans les os longs des souris <i>fro/fro</i>	p 140

4.3.3. Inhibition de la nSMase2 sur l'expression de Sox9 dans la différenciation des chondrocytes	p 144
4.3.4. Réversion partielle de la dysfonction de Sox9 par le C2-céramide perméant	p 146
4.3.5. Hypothèse mécanistique : L'inhibition de PP2A induit une dysfonction de la chondrogenèse	p 148
4.3.5.1. <i>PP2A et chondrogenèse</i>	p 148
4.3.5.2. <i>Etude de l'inhibition de PP2A sur la différenciation des chondrocytes</i>	p 151

5. DISCUSSION GENERALE et PERSPECTIVES	p 155
---	--------------

BIBLIOGRAPHIE	p 162
----------------------	--------------

RESUME

Le phénotype Fragilitas ossium ("fro") chez la souris est caractérisé par un nanisme, une mortalité néonatale élevée, une malformation néonatale des os longs, et une hypominéralisation de type Osteogenesis Imperfecta. Ce phénotype est associé à une mutation du gène *smpd3* qui code pour la sphingomyélinase neutre de type 2 (nSMase2) qui dégrade la sphingomyéline et génère du céramide impliqué dans l'apoptose, la différenciation cellulaire, l'inflammation et l'autophagie. Le rôle des sphingolipides dans le développement osseux est peu connu. Le phénotype de la souris *fro/fro* suggère un rôle pour les sphingolipides dans le développement osseux dans la période fœtale et néonatale.

L'objectif de cette thèse a été d'étudier les mécanismes par lesquels la voie des sphingolipides (nSMase2 et céramide) intervient dans l'ostéochondrogenèse. Dans un premier temps, nous avons étudié les mécanismes impliqués dans l'apoptose des chondrocytes hypertrophiques (CH) nécessaire à la maturation de l'os endochondral et déficiente chez la souris *fro/fro*. Dans un second temps, nous avons caractérisé le fait que la mutation de la nSMase2 induit une chondrodysplasie de type campomélique chez les souris *fro/fro*.

Dans la première partie de ce travail, nous montrons que la mutation de la nSMase2 ne protège pas les fibroblastes contre l'apoptose induite par les agents de stress, mais les protège de l'apoptose induite par la privation en nutriments. Cette résistance fait intervenir une surexpression de la hyaluronan synthase 2 (HAS2) et l'acide hyaluronique qui a un effet antiapoptotique. L'absence d'activation de la phosphatase PP2A (qui est activée par le céramide) et l'activation consécutive d'Akt seraient impliquées dans la surexpression de HAS2 et la résistance à l'apoptose dans un milieu pauvre en nutriments.

Dans la deuxième partie, nous avons étudié le rôle de la nSMase2 dans la maturation des CH au cours de l'ossification endochondrale, qui est retardée chez la souris *fro/fro*. Nos résultats montrent que le déficit de maturation des CH s'accompagne d'un déficit d'expression du VEGF et de MMP13, de même qu'un défaut d'apoptose, de vascularisation et de minéralisation. De plus, on note un déficit d'autophagie qui permet aux CH d'atteindre normalement leur stade de différenciation terminale. L'addition de C2-céramide à des cellules souches issues de souris *fro/fro* restaure partiellement l'expression du VEGF et des marqueurs d'autophagie, alors que l'utilisation d'un inhibiteur de sphingomyélinase neutre, le GW4869, induit une diminution d'expression du VEGF et de MMP13. Le mécanisme impliquerait l'activation d'Akt et la surexpression d'HAS2.

Dans la troisième partie de ce travail, nous montrons que le déficit en nSMase2 induit une déformation de type campomélique dans les tibias des souris *fro/fro*, avec une diminution de l'expression de Col2A1 et d'Acan ainsi qu'un défaut d'expression de la protéine sox9 dans les pattes des souris *fro/fro* nouveaux-nés, chez l'embryon âgé de 12 à 17 jours, et dans les chondrocytes en culture issus de souris *fro/fro*. L'addition de GW4869 à des cellules souches normales ou à des préchondrocytes de la lignée ATDC5, reproduit le déficit en Col2A1 et Acan lors de leur différenciation. L'ensemble de ces résultats confirme que la mutation de la nSMase2 génère une chondrodystrophie de type campomélique chez la souris *fro/fro*.

Ces résultats mettent l'accent sur le rôle essentiel des sphingolipides dans le développement de l'os enchondral. Sur un plan médical, ce travail a permis de caractériser une nouvelle forme de chondrodysplasie par mutation de nSMase2, qui pourra être recherchée dans une perspective de diagnostic chez l'humain avec à moyen terme, le développement de nouveaux axes thérapeutiques pour le traitement de pathologies osseuses néonatales.

ABSTRACT

The “fragilitas ossium” (“fro”) phenotype in mice presents the characteristics of “osteogenesis and dentinogenesis imperfecta”, with a dwarfism, neonatal bone deformation, growth retardation and hypomineralisation of long bones. This phenotype is associated with a mutation of the *smpd3* gene encoding the neutral type 2 sphingomyelinase (nSMase2). The nSMase2 hydrolyzes sphingomyelin on the inner leaflet of the plasma membrane and generates ceramide, a bioactive sphingolipid mediator involved in growth arrest, differentiation, inflammation, autophagy and apoptosis. The role of sphingolipids in bone development is not clarified so far, but the *fro/fro* mouse phenotype suggests a role for sphingolipids in fetal and neonatal bone development.

The objectives of the thesis were to investigate the role of the sphingolipid pathway in osteochondrogenesis, particularly in the apoptosis of hypertrophic chondrocytes (HC) which is a necessary step allowing to reach the terminal HC differentiation state and the maturation of enchondral bone. Lastly, we show that nSMase2 mutation leads to a campomelic-like phenotype in *fro/fro* mice.

The first part of the thesis is focused on the role of nSMase2 in apoptosis. We report that nSMase2 mutation does not protect fibroblasts against apoptosis evoked by stress-inducing agents, but is protective against apoptosis induced by nutrient deprivation. The resistance of nSMase2-mutant cells involves an overexpression of the hyaluronan synthase 2 (HAS2) and the presence of hyaluronic acid which is antiapoptotic in this system. The lack of activation of the PP2A phosphatase (which is activated by ceramide) and the subsequent activation of Akt are involved in the overexpression of HAS2 and the resistance of *fro/fro* mice fibroblasts to apoptosis evoked by nutrient deprivation.

In a second part, we have investigated the role of nSMase2 in the terminal HC differentiation which is delayed in *fro/fro* mice. Our data indicate that the delay is associated with a decreased expression of VEGF and bone vascularisation, decreased Runx2 and MMP13 expression, and decreased apoptosis and mineralization patterns in *fro/fro* mice limbs. Moreover, autophagy, a necessary step for the terminal differentiation state, is missing in *fro/fro* HC. The addition of C2 ceramide to stem cells isolated from *fro/fro* mice bone marrow restores in part the expression of VEGF, MMP13 and autophagy patterns. Conversely, the use of an inhibitor of nSMase, GW4869, in pre-chondrocytes C3H10T1/2 cells, results in a decreased expression of VEGF and MMP13, which confirms the role of nSMase2 in the delayed HC maturation in *fro/fro* mice. This mechanism could involve Akt activation and HAS2 overexpression.

In the last part of this work, we report that limb deformation evoked by nSMase2 mutation is « campomelic-like », as assessed by the tibia bowing associated with a decreased expression of Col2A1, Acan and Sox9 in limbs from newborn *fro/fro* mice and embryos from 12 to 17 days old. These data are confirmed in stem cells isolated from *fro/fro* mice bone marrow and differentiated into chondrocytes or on cultured chondrocytes issued from *fro/fro* mice legs. The addition of GW4869 to stem cells from control mice or to the ATDC5 prechondrocytic cell line, results in decreased Col2A1 and Acan expression during chondrocyte differentiation. Taken together, these data indicate that nSMase2 mutation in mouse results in a campomelic-like chondrodystrophy with delayed HC maturation resulting in a defect in vascularisation and mineralization.

These results emphasize the essential role of sphingolipids in the development of enchondral bone. From a medical aspect, this work allows to characterize a new kind of «campomelic-like» chondrodysplasia due to nSMase2 mutation, which could be explored in a perspective of medical diagnosis in humans, as well as the development of new therapeutic approaches using sphingolipids, for the treatment of bone pathologies in newborns and beyond.

LISTE des ABRÉVIATIONS

ACER : céramidase alcaline	KO : knock-out
Akt = PKB : Protéine kinase B	LDL : Low Density Lipoprotein
aSMase : acid sphingomyelinase	LDLox : Low Density Lipoprotein oxydées
BA : bleu alcyan	MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase
BMP : Bone Morphogenic Protein	MEC : Matrice Extra Cellulaire
BSP : Bone Sialo Protein	MC : mesenchymal cell
CDase : ceramidase	MMPs : matrix metalloproteinases
Cer : céramide	MMP13 : matrix metalloproteinase 13
CerS : céramide synthase	MP : membrane plasmique
CFTR : cystic fibrosis transmembrane regulator	MSC : mesenchymal stem cell
CH : chondrocytes hypertrophiques	MU : méthylumbelliférone
CM : céramidase	N-CAM : N cadherin
COMP : cartilage oligomeric matrix protein	NN : nouveaux-nés
Col1a1 : collagène type 1a1	nSMase : sphingomyélinase neutre
Col2a1 : collagène type 2a1	nSMase2 : sphingomyélinase neutre de type 2
DAG : diacylglycérol	OA : acide okadaïque
Depriv : starvation	OI : osteogenesis imperfecta
DGP : dentin glycoprotein	opn : osteopontin
DI : dentinogenèse imparfaite	osx : osterix
DPP : dentin phosphoprotein	PAL : phosphatase alcaline
DPSCs : cellules souches de la pulpe dentaire	PC : phosphatidyl choline
DS : dysplasie squelettique	PCAM : Platelet Cellular Adhesion Molecule
DSPP : dentin sialophosphoprotein	PCR : polymerase chain reaction
DSP : dentin sialoprotein	PKA : protéine kinase A
ER stress : stress du réticulum endoplasmique	PKC : protéine kinase C
GAG : glycoaminoglycanes	PP2A : Protéine Phosphatase 2A
GH : growth hormon	PTHrp : parathyroïde Hormone-related protein
FAN : factor associated with nSMase activation	RANK : receptor activator of nuclear factor κ B
FGF : fibroblast growth factor	RANKL : receptor activator of nuclear factor κ B ligand
FGFR : fibroblast growth factor receptor	RE : réticulum endoplasmique
HA : acide hyaluronique	RT-qPCR : Reverse transcription polymerase chain reaction
HAS2 : hyaluronan synthase 2	S1P : sphingosine-1-phosphate
HE : hématoxyline éosine	S1PR : sphingosine-1-phosphate récepteur
HDL : High Density Lipoprotein	L-SMase : sphingomyélinase lysosomale
HIF1 α : hypoxia inductible factor 1 α	S-SMase : sphingomyélinase sécrétée
HMG : high mobility group	scx : scleraxis
fro : fragilitas ossium	SHH : sonic hedgehog
IGF: insulin-like growth factor	siRNA : small interferent RNA
IHH : Indian Hedgehog	SK : sphingosine kinase
IP : intra péritonéal	SL : sphingolipides
ITS : insulin transferin selenium	

SM : sphingomyéline
smpd : sphingomyéline phosphodiesterase
Smpd3^{fro}/Smpd3^{fro} : fro/fro
SMS : sphingomyéline synthase
sox9 : Sex Determining region Y-box 9
Sph : sphingosine
SPPase : sphingosine phosphate phosphatase
SPT : sérine palmitoyl transférase
SRY : sex-determining region Y
SVF : serum de veau foetal
TGFβ : Transforming Growth Factor- β
TNFα : tumor necrosis factor alpha
TGN : Trans Golgi Network
TIMP : tissue inhibitor metalloproteinase
UPR : unfolded protein response
UV : ultraviolet
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
VK : von kossa
VM : vésicules de minéralisation
wt : wild type

LISTE des FIGURES et des TABLEAUX

Liste des figures

- Figure 1 : Territoires et domaines du mésoderme intraembryonnaire
- Figure 2 : Devenir du mésoderme para axial
- Figure 3 : Schématisation des quatre étapes de développement des éléments squelettiques
- Figure 4 : Etapes de l'ossification endochondrale
- Figure 5 : Schématisation de la composition de la matrice extracellulaire du cartilage
- Figure 6 : Processus de vascularisation au cours de l'ossification endochondrale
- Figure 7 : Stades de développement de l'organe dentaire
- Figure 8 : Représentation schématique des différents tissus constitutifs de l'organe dentaire
- Figure 9 : Généralités sur les sphingolipides
- Figure 10 : Structure commune des sphingolipides
- Figure 11 : Métabolisme des sphingolipides
- Figure 12 : Compartimentation du métabolisme des sphingolipides
- Figure 13 : Structure chimique de la sphingomyéline
- Figure 14 : Structure chimique du céramide
- Figure 15 : Structure chimique de la sphingosine
- Figure 16 : Structure chimique de la sphingosine-1-phosphate
- Figure 17 : Le rhéostat sphingolipidique
- Figure 18 : Proportions relatives des différents sphingolipides dans la cellule
- Figure 19 : Structure de la nSMase2 humaine
- Figure 20 : Schéma illustrant la topologie de la nSMase2
- Figure 21 : Activateurs de l'activité nSMase et effets biologiques associés
- Figure 22 : Principaux effets du céramide et de la sphingosine-1-phosphate sur les chondrocytes, les ostéoblastes et les ostéoclastes.
- Figure 23 : Analyse de la structure, expression et fonction de *smpd3*
- Figure 24 : Données radiologiques des phénotypes *fro/fro* et *smpd3*^{-/-}
- Figure 25 : Focus sur la morphologie des tibias des souris *fro/fro* et *smpd3*^{-/-}
- Figure 26 : Implication de la nSMase2 dans la minéralisation
- Figure 27 : Schéma résumant la sensibilité à l'apoptose des fibroblastes issus de souris wt et *fro/fro*, en fonction des agents utilisés : LDL oxydés; H₂O₂; privation en nutriments
- Figure 28 : Les chondrocytes résistent à l'apoptose induite par la starvation en nutriments, mais pas à celle induite par les LDL oxydés
- Figure 29 : Phénotype des squelettes de souris wt et *fro/fro* nouveaux-nés âgés de 12h
- Figure 30 : Etude histologique de tibias de souriceaux nouveaux-nés wt et *fro/fro* par coloration hématoxyline/ éosine
- Figure 31 : Coloration au bleu Alcyan des tibias de souriceaux nouveaux-nés wt et *fro/fro*
- Figure 32 : Etude de la minéralisation dans les tibias de souriceaux nouveaux-nés wt et *fro/fro* par coloration Von Kossa
- Figure 33 : Etude de l'apoptose dans les tibias de souriceaux nouveaux-nés wt et *fro/fro* par marquage TUNEL
- Figure 34 : Expression de nSMase2 dans la plaque de croissance des tibias de souriceaux nouveaux-nés wt et *fro/fro*
- Figure 35 : Expression de Runx2 dans les plaques de croissance des tibias de souriceaux nouveaux-nés wt et *fro/fro*

Figure 36 : Expression du collagène X dans les plaques de croissance de tibias de souriceaux nouveaux-nés wt et *fro/fro*

Figure 37 : Expression de MMP13 dans les chondrocytes hypertrophiques de tibias de souriceaux nouveaux-nés wt et *fro/fro*

Figure 38 : Expression de Hif1 α dans les chondrocytes hypertrophiques de tibias de souriceaux nouveaux-nés wt et *fro/fro*

Figure 39 : Expression du VEGF dans les tibias de souriceaux nouveaux-nés wt et *fro/fro*

Figure 40 : Expression du CD31 dans les tibias de souriceaux nouveaux-nés wt et *fro/fro*

Figure 41 : Expression des ARN messagers de MMP13, Runx2, VEGF et Col10A1 évalués par qRT-PCR et normalisés à HPRT

Figure 42 : Expression des marqueurs d'autophagie Becline-1 et LC3b dans les tibias de souriceaux nouveaux-nés wt et *fro/fro*

Figure 43 : Expression de phospho Akt et ULK1 phosphorylé sur sérine-147 dans des homogénats de tibias prélevés sur des embryons wt et *fro/fro* au stade 18 (E18), et expression de Becline-1 sur des chondrocytes différenciés en culture, provenant de souris sauvages (+/+) et *fro/fro*

Figure 44 : Expression des ARNm de MMP13 dans les cellules souches mésenchymateuses C3H10T1/2

Figure 45 : Etude de l'ER stress dans les tibias de souriceaux nouveaux-nés wt et *fro/fro*

Figure 46 : Expression de HAS2 et HA dans les tibias de souriceaux nouveaux-nés wt et *fro/fro*

Figure 47 : L'association acide okadaïque et acide hyaluronique altère l'expression de Runx2 et du VEGF

Figure 48 : Expression de Runx2, Vegf et β -actine dans les C3H10T1/2 différenciés en milieu chondrogénique, traités avec le GW4869 seul ou en présence d'acide hyaluronique

Figure 49 : Courbure du tibia chez la souris *fro/fro* mutante pour la nSMase2

Figure 50 : Images en radiologie des tibias de souriceaux wt et *fro/fro* âgés de 3 semaines

Figure 51 : Images radiologiques d'un enfant atteint de dysplasie campomélique

Figure 52 : Expression de Sox9 dans les tibias de souriceaux nouveaux-nés wt et *fro/fro*

Figure 53 : Expression du collagène II dans les tibias de souriceaux nouveaux-nés wt et *fro/fro*

Figure 54 : Expression de Sox9 dans embryons E14 (+/+ et *fro/fro*) et E16 (+/+ et *fro/fro*)

Figure 55 : Histologie des tibias provenant d'embryons de souris sauvages et *fro/fro* (E14, E15, E16, E17 et nouveaux-nés de 12h)

Figure 56 : Coloration Von Kossa des tibias de souris contrôles et *fro/fro* au cours du développement (E17 et nouveaux-nés de 12h)

Figure 57 : Etude de l'expression des ARN messagers Col2a1, Sox9 et Acan dans les cellules préchondrocytaires ATDC5 et les C3H10T1/2 différenciés en milieu chondrogénique et traités ou non par le GW4869

Figure 58 : Expression de Sox9 dans les chondrocytes wt et *fro/fro*

Figure 59 : Effet du C2-céramide sur l'expression de Col2a1 lors de la différenciation chondrocytaire des MSC de souris *fro/fro* ou wt

Figure 60 : Le C2-céramide restaure l'expression de Col2a1 et Acan dans les organocultures de pattes de souris *fro/fro*

Figure 61 : Images représentant des larves de *X.Laavis* contrôle ou traitée par OA pendant 5 jours

Figure 62 : Phosphorylation de PP2A sur tyrosine 307 et activation d'Akt dans les chondrocytes de souris *fro/fro* et comparaison avec les chondrocytes de souris wt

Figure 63 : Expression de Col2A1 et de Sox9 dans les pellets formés à partir de C3H10T1/2, et dans les cellules pré-chondrocytaires ATDC5, cultivés dans un milieu chondrogénique et en présence d'acide okadaïque

Figure 64 : Dosage du céramide dans des homogénats de tibias de souris wt et *fro/fro*

Figure 65 : Expression de β -caténine dans les embryons E14 (+/+ et *fro/fro*)

Figure 66 : Expression de β -caténine dans les plaques de croissance de souriceaux nouveaux-nés wt et *fro/fro*

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales classes de gènes et de protéines associées à la condensation des bourgeons

Tableau 2 : Synthèse des données générales des dysplasies avec une incurvation osseuse

Tableau 3 : Synthèse des manifestations cliniques des dysplasies avec une incurvation osseuse

Tableau 4 : Synthèse des connaissances sur les principaux sphingolipides bioactifs

Tableau 5 : Tableau récapitulatif des différentes enzymes du métabolisme des sphingolipides

Tableau 6 : Tableau de comparaison des modèles murins *Fragilitas ossium* et *smpd3*^{-/-} knock-out

1. REVUE GENERALE

1.1. DEVELOPPEMENT DU SQUELETTE

Le développement du squelette se fait via deux mécanismes : formation de l'os membranaire et formation de l'os endochondral (Erlebacher 1995).

Le squelette est constitué d'environ 206 os différents selon leur origine embryologique. On distingue classiquement le squelette appendiculaire (les ceintures scapulaire et pelvienne, les membres supérieurs et inférieurs) et le squelette axial (le crâne, la colonne vertébrale et la cage thoracique), qui sont formés par ossification endochondrale et dépendent de l'existence d'une ébauche cartilagineuse. Cette ébauche repose sur le cartilage de croissance, une structure importante qui permet une croissance en longueur (Wuelling 2010). L'ossification membranaire intéresse les os plats et se fait selon un processus dit d'ossification membranaire c'est-à-dire directement à partir de l'ébauche de cellules mésenchymateuses.

1.1.1. Origine embryologique

Au cours du développement embryonnaire, l'embryon dit bi-dermique ou blastocoele est constitué de deux feuillets l'ectoderme et l'endoderme. Lors de la gastrulation, les cellules de l'endoderme s'invaginent et migrent pour constituer un feuillet intermédiaire, le mésoderme. On parle alors de disque embryonnaire constitué de trois feuillets. Le mésoderme intra-embryonnaire va se différencier en trois structures de part et d'autre de la ligne primitive en voie de régression : le mésoderme para axial, le mésoblaste intermédiaire et le mésoblaste latéral.

Au cours de la 3ème semaine, le mésoderme para axial se métamérise pour former les 42-44 paires de somites. Ces somites sont à l'origine de l'appareil locomoteur : squelette, muscles, derme-hypoderme et vaisseaux (Figs 1 et 2).

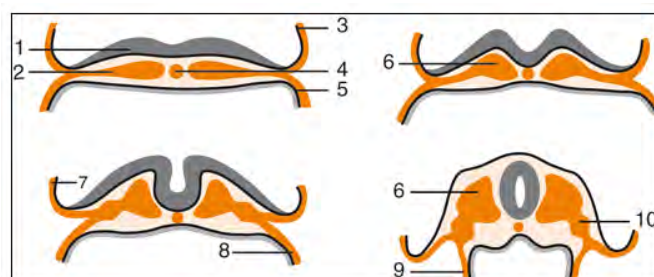


Figure 1: Territoires et domaines du mésoderme intraembryonnaire (3ème-4ème semaine) (d'après Encha-Razavi 2008) : 1. ectoderme; 2. mésoderme latéroventral; 3. amnios; 4. mésoderme dorsal; 5. endoderme; 6. mésoderme para-axial; 7. somatopleure; 8. splanchnopleure; 9. mésoderme latéral; 10. mésoderme intermédiaire.

□

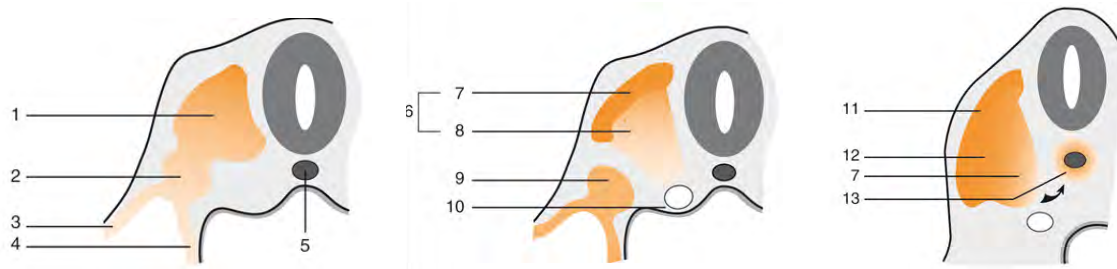


Figure 2 : Devenir du mésoderme para-axial (d'après Encha-Razavi 2008). Coupes transversales du disque embryonnaire : 1. mésoderme para-axial ; 2. mésoderme intermédiaire ; 3. somatopleure intermédiaire ; 4. splanchnopleure intraembryonnaire ; 5. chorde ; 6. somite ; 7. dermyotome ; 8. sclérotome ; 9. corde néphrogène ; 10. aorte dorsale ; 11. dermatome ; 12. myotome ; 13. vertèbres.

1.1.2. Morphogenèse des membres

La morphogenèse des membres se déroule entre la 5ème et la 8ème semaine de gestation. Les bourgeons des membres supérieurs apparaissent vers le 25-26ème jour alors que les membres inférieurs apparaissent vers le 28-30ème jour. Leur évolution est stéréotypée et suit une séquence très précise.

Le développement d'un élément squelettique se fait en 4 phases. La première est la migration des cellules pré-squelettiques (cellules mésenchymateuses) au niveau du futur site de la squelettogénèse ; la seconde est l'interaction tissulaire épithélium-mésenchyme qui aboutit à la condensation cellulaire ; et la quatrième est la différenciation des chondrocytes (Fig 3) (Hall 2000).

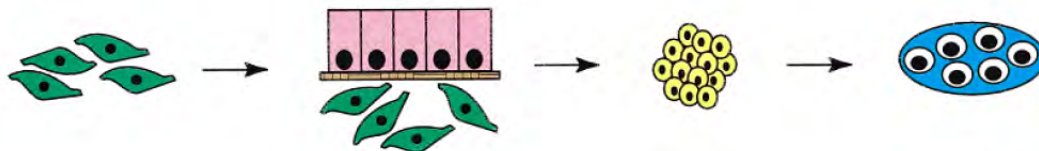


Figure 3 : Schématisation des quatre phases de développement des éléments squelettiques (de gauche à droite) : migration des cellules présquelettiques (en vert) vers le site de la future squelettogénèse, qui est toujours associé à un épithélium (en violet) et à la membrane basale (en marron) ; initiation de la condensation ; différenciation chondrocytaire (d'après Hall 2000).

La condensation cellulaire qui définit le futur élément osseux résulte soit d'un seul, soit de la combinaison de trois processus : une activité mitotique accrue, l'agrégation des cellules au centre et une défaillance des cellules à se disperser du centre (Hall 2000).

Sur les sites où les os longs sont formés, les progéniteurs mésenchymateux se regroupent et forment des condensations à forte densité cellulaire. Dans les condensations mésenchymateuses, les cellules vont se différencier en chondrocytes sous le contrôle du facteur de transcription SOX9 et commencer à synthétiser une matrice extracellulaire riche en collagène de type II et des protéoglycanes spécifiques (Karsenty 2002). SOX9 appartient à la famille des SRY (sex-determining region on the Y chromosome) contenant HMG (high mobility group) box DNA binding protein.

Du point de vue de la composition, les zones de condensation présentent des taux élevés de molécules de surface ou de matrice extracellulaire telles que la hyaladhérine, la ténascine, le syndécan, la N-CAM, et les protéoglycanes héparane-sulfate et chondroïtine-sulfate (Hall 2000).

L'équipe de Hall décrit les différents gènes et protéines impliqués dans la condensation des bourgeons ainsi que leurs fonctions et les stades auxquels ils interviennent au cours de la formation du bourgeon (Tableau 1). Il distingue les facteurs de croissance tels que BMPs, FGF-2, TGF β ayant des effets dans la prolifération et la croissance cellulaire, des molécules d'adhésion et de la matrice extracellulaire telles que fibronectine, N-cadhérine, N-CAM, Noggin, syndécan et ténascine impliquées dans l'initiation et l'adhésion, les gènes Hox comme *Hoxa-2*, *Hoxa-13*, *Hoxd-11*, *Hoxd-11-13* et les facteurs de transcription tels que *cbfa-1*, *CFKH-1*, *MFH-1*, *osf-2*, *Pax-1* et *9*, *scleraxis*, *Prx-1* et *2*, *sox9* ayant un rôle dans la prolifération (Hall 2000).

Gene/gene product	Function	Stage
Growth factors		
BMPs	regulate <i>Hox</i> genes (<i>Hoxa-2</i> , <i>Hoxd-11</i> , <i>Pax-2</i>) in response to <i>Shh</i>	growth
FGF-2	regulate <i>Msx-1</i> , <i>Msx-2</i>	transition to differentiation
TGF- β	regulates N-CAM regulates fibronectin	initiation, proliferation, growth initiation
Cell surface, cell adhesion and Extracellular matrix molecules		
Fibronectin	an extracellular glycoprotein regulated by TGF- β ; regulates N-CAM	initiation, proliferation
N-cadherin	a cell adhesion molecule	adhesion
N-CAM	a cell adhesion molecule regulated by FN, <i>Prx-1</i> , <i>Prx-2</i> and FGF	initiation, adhesion
Noggin	a secreted protein that binds to and inactivates <i>BMP-2</i> , <i>BMP-4</i> , <i>BMP-7</i>	slows or stops growth
Syndecan	a receptor that binds to tenascin; binds to fibronectin to inactivate N-CAM	sets boundary
Tenascin	an extracellular glycoprotein that binds to syndecan	stops condensation growth sets boundary
Hox genes		
<i>Hoxa-2</i>	regulated by BMPs, downregulated <i>cbfa-1</i>	sets boundary, growth, prevents differentiation
<i>Hoxa-13</i>	alters adhesive properties	adhesion
<i>Hoxd-11</i>	regulated by BMP	proliferation, growth
<i>Hoxd-11-13</i>	transcriptional activation	transition to differentiation
Transcription factors		
<i>cbfa-1</i>	transcriptional activating protein inhibited by <i>Hoxa-2</i>	differentiation of chondroblasts
CFKH-1	a chicken forkhead-Helix transcription factor that regulated TGF- β and interacts with <i>Smad</i> transcription factors	initiation, proliferation
MFH-1	mesenchymal transcription factor	proliferation
<i>osf-2</i>	transcriptional activation protein regulated by BMP-7 and Vitamin D_3	switches cells into the osteoblastic pathway
<i>Pax-1</i> , <i>Pax-9</i>	encode nuclear transcription factors, regulated by BMP-7	growth
<i>Prx-1</i> , <i>Prx-2</i>	upstream regulation of N-CAM	initiation
Scleraxis	a basic helix-loop-helix protein	proliferation
<i>Sox-9</i>	regulates the collagen 2 α 1 gene	proliferation

Tableau 1 : Principales classes de gènes et de protéines associées à la condensation des bourgeons (d'après Hall 2000).

1.1.3. Mécanisme moléculaire de la formation des membres

Le développement des membres se caractérise par l'existence de gradient de croissance proximodistal et d'une polarité antéropostérieure et dorsoventrale mettant en jeu de multiples voies de signalisation comme celles de SHH et des acides rétinoïdes, ainsi que des gènes du développement de type HOX (Zhu 2008).

Dans un premier temps, les bourgeons s'allongent en deux segments proximal et distal séparé par un segment circulaire. Le segment distal s'aplatit en palette où s'identifient les rayons des doigts, après régression apoptotique du tissu intercalaire. Le segment proximal se divise à son tour en deux segments : à l'origine de l'avant et du bras ou de la cuisse et de la jambe. Une rotation de 90° des racines place les membres supérieurs en position latérale et les membres inférieurs en position antérieure.

La croissance des membres est initiée par le mésoderme latéral (somatopleure) qui modifie l'ectoderme de surface en crête apicale, grâce à un facteur de croissance de la famille de FGF (FGF-3). L'activation de la crête apicale est suivie par la production d'un autre facteur de croissance de la famille des FGF qui maintient le tissu mésenchymateux sous-jacent indifférencié avec une capacité de mitoses intenses (zone de progression distale). L'extrémité

proximale du bourgeon échappe à cet effet et entame la différenciation cartilagino-osseuse. Le développement de la polarité antéropostérieure des membres se fait aussi par des signaux inductifs (SHH ou des gènes HOX du groupe D) produits par le territoire mésoblastique postérieur du bourgeon des membres (zone polarisante) (Encha-Razani 2010, Zeller 2010, Zeller 2009).

Au cours des étapes initiales de mise en forme du squelette dans l'embryogenèse, l'agencement précis des différents éléments anatomiques est défini (Maes 2013).

1.1.4. De l'ébauche cartilagineuse à l'ossification endochondrale

Durant l'élongation des éléments squelettiques (Fig 4), les chondrocytes prolifèrent et forment deux subpopulations cellulaires qui se distinguent par leurs caractéristiques morphologiques et biochimiques. On distingue aux extrémités de l'os des chondrocytes arrondis à faible potentiel de prolifération et des chondrocytes à fort potentiel de prolifération organisés en colonnes au centre de l'os (Wuelling 2010; Long 2001; Kobayashi 2002; MacLean 2005). Les chondrocytes arrêtent de proliférer et se différencient en chondrocytes préhypertrophiques et hypertrophiques pour synthétiser la matrice extracellulaire et ensuite meurent par apoptose.

L'augmentation de volume des chondrocytes hypertrophiques contribue significativement à l'élongation des éléments osseux (Mackie 2008, Mackie 2011).

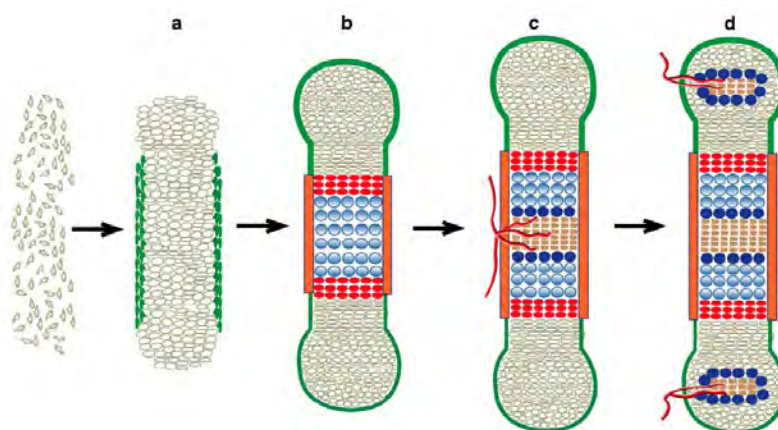


Figure 4 : Etapes de l'ossification endochondrale. L'ossification endochondrale nécessite une différenciation séquentielle et une dégradation des chondrocytes. a. Condensation des cellules mésenchymateuses d'un élément squelettique. b. Différenciation de sous populations de chondrocytes : les chondrocytes prolifératifs (en vert), chondrocytes préhypertrophiques (en rouge) et les chondrocytes hypertrophiques (en bleu) entouré par le périchondrium (en vert) et le périoste (en orange). c. Invasion des vaisseaux sanguins au centre de l'élément squelettique qui initie la formation osseuse, centre d'ossification primaire. d. Formation de centres d'ossification dits secondaires dans les parties distales de l'élément squelettique (d'après Wuelling 2010).

Le tissu cartilagineux ou cartilage est formé d'un seul type cellulaire, les chondrocytes, répartis dans une MEC abondante et complexe.

Les chondrocytes sont des cellules volumineuses, arrondies, situées dans de petites logettes que l'on appelle les chondroplast. A l'état vivant, les chondrocytes emplissent complètement les chondroplast. Les chondrocytes possèdent de nombreux récepteurs en particulier pour la GH (growth hormone), les vitamines A et D, la PTHrp (parathormone), les glucocorticoïdes et le oestrogènes. Les chondrocytes assurent la synthèse et la dégradation de tous les composants de la matrice extracellulaire cartilagineuse.

La matrice extracellulaire (MEC) assure les propriétés mécaniques du tissu cartilagineux : déformabilité, compressibilité, élasticité. La MEC est composée d'eau (70 à 80% de son poids), de collagène en particulier de collagène II, de protéoglycanes qui sont principalement représentés par l'aggrécane, des glycoaminoglycanes (chondroïtine-sulfate et kératane-sulfate), des protéoglycanes sulfatés. Ces protéoglycanes sont associés à l'acide hyaluronique et à la COMP (Cartilage Oligomeric Matrix Protein). La MEC contient également des enzymes protéolytiques telles que les métalloprotéases matricielles et les aggrécanasés qui permettent la dégradation de la matrice au cours de son renouvellement. Elle contient également des facteurs de croissance et des cytokines produites par les chondrocytes et/ou les synovites.

Selon la richesse de la MEC en fibres de collagènes ou élastiques, on distingue trois types histologiques de cartilage : le cartilage hyalin, le cartilage fibreux ou fibro-cartilagineux et le cartilage élastique. Le tissu cartilagineux a la particularité d'être un tissu non vascularisé et non innervé.

Gao et coll. résument par un schéma la composition de la MEC cartilagineuse (Fig 5). Il distingue les composants moléculaires tels que les protéoglycanes (héparane sulfate, chondroïtine sulfate et kératane sulfate), les polysaccharides non protéoglycanes (acide hyaluronique), les fibres (collagène, élastine), et les autres (fibronectine et lamine) et les cellules d'adhésion à la matrice extracellulaire les intégrines (Gao 2014).

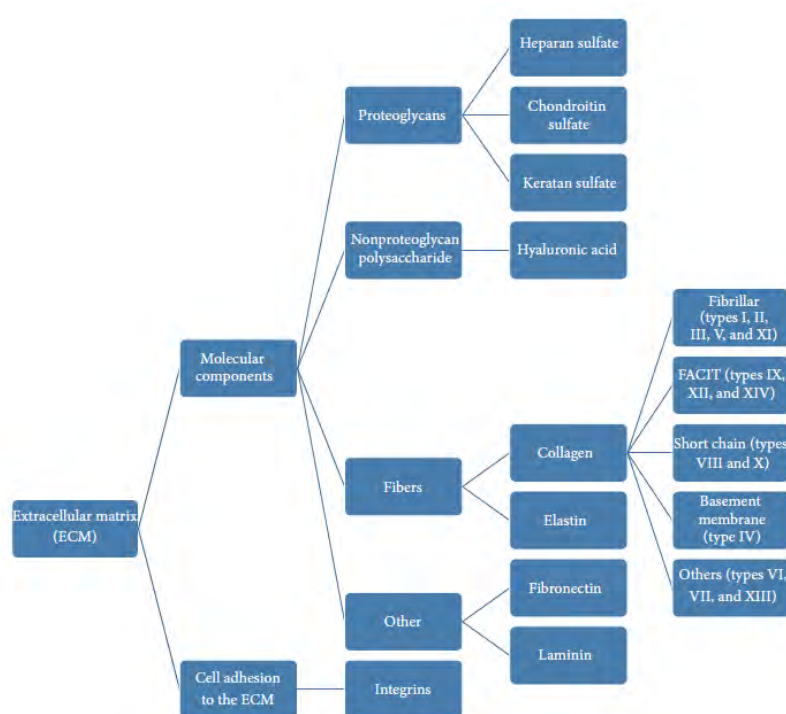


Figure 5: Schématisation de la composition de la matrice extracellulaire du cartilage (d'après Gao 2014).

L'acide hyaluronique (HA) est un polysaccharide linéaire composé de l'alternance de résidus d'acide glucuronique (GlcA) et de N-acétyl glucosamine (GlcNAc), appartenant à la famille des glycoaminoglycanes. L'HA présente un fort poids moléculaire 5000 kDa (Fraser 1997). L'HA est présent au niveau de tout l'organisme et particulièrement au niveau de la peau et du squelette. Il est synthétisé au niveau de la membrane plasmique des cellules par une enzyme la hyaluronan synthase (HAS) qui utilise les UDP-monosaccharides cytosoliques (Yoshida 2000). Il existe chez les mammifères, trois types d'HAS, HAS1, HAS2 et HAS3 qui sont codés par les gènes *Has1*, *Has2* et *Has3* (Spicer 1998). Au niveau des cartilages, HAS2 est l'isoforme la plus largement exprimée (Recklies 2001). Des études montrent que la souris knock-out pour HA présente un sévère défaut au niveau des cartilages. De plus les souris knock-out pour HAS2 meurent in utero au cours de la gestation au stade E10, qui correspond chez la souris au stade de développement du squelette (Camenish 2000).

1.1.5. Processus de l'ossification endochondrale

Il existe différents types de cartilages classés en fonction de critères topographiques, moléculaires et fonctionnels. Lors de l'ossification endochondrale, c'est le cartilage de croissance ou de conjugaison qui intervient jusqu'à l'âge adulte dans la croissance des os.

Le cartilage de croissance est formé de l'épiphyse vers la métaphyse de quatre couches successives de chondrocytes (Kronenberg 2003):

- La couche germinale ou couche de réserve est une couche de stockage. Elle est composée de cellules de petite taille, disposées de façon éparse au sein d'une substance abondante. La division cellulaire est faible, et la vascularisation est d'origine épiphysaire.
- La couche de cellules sériées ou en colonnes est une zone d'allongement de l'os. Elle se compose de cinq à trente cellules empilées en colonnes. Les divisions cellulaires sont intenses au niveau des sommets. La vascularisation est riche et d'origine épiphysaire.
- La couche de cellules hypertrophiques correspond à la zone de maturation dans laquelle les chondrocytes se vacuolisent, les noyaux se fragmentent et la substance se raréfie.
- La couche de cellules dégénératives correspond à la zone d'ossification.

Les chondrocytes hypertrophiques matures près du front de minéralisation dégénèrent et meurent par apoptose (rupture des chaînes d'ADN et activation de caspases) laissant place à l'os (Gibson 1998, Adams 2002).

De nombreux facteurs extracellulaires solubles sont produits localement :

- *Insulin-like growth factor* (IGF1)

Le rôle de IGF1 en tant que médiateur local des effets de GH (growth hormone) dans le cartilage de croissance est bien documenté. En effet, des études récentes rapportent qu'un seul allèle de *IGF1* est un déterminant majeur de petite taille chez le chien (Sutter 2007). IGF2 est exprimé dans le cartilage de croissance et est essentiel à la croissance du squelette lors de l'embryogenèse (DeChiara 1991). IGF1 et IGF2 ont un rôle majeur dans la prolifération des chondrocytes prolifératifs et/ou hypertrophiques, mais cette notion reste à l'heure actuelle en débat (Van der Eerden 2003). Des souris déficientes en récepteurs IGF1 présentent un déficit sévère de croissance (Baker 1993).

- Indian hedgehog (Ihh) est un facteur sécrété par les chondrocytes préhypertrophiques, qui stimule la prolifération des chondrocytes et inhibe les chondrocytes hypertrophiques (Bitgood 1995 ; St Jacques 1999 ; Vortkamp 1996). Ihh stimule l'expression de PTHrP par les chondrocytes périarticulaires (Yang 2015). L'absence de signal de Ihh entraîne une diminution de l'expression de PTHrP, entraînant une accélération de chondrocytes hypertrophiques (St Jacques 1999). Jemtland et coll. montrent que Ihh est aussi exprimé dans les ostéoblastes en période périnatale chez la souris (Jemtland 2003). Ihh et PTHrP forment une boucle

d'autorégulation régulant le cartilage de croissance et le développement de l'os (St Jacques 1999; Van den Heuvel 1996).

- Parathyroid hormone-related peptide (PTHrp) est exprimé par les cellules périarticulaires (Bitgood 1995). PTHrp induit la prolifération des chondrocytes. Le récepteur PTH/PTHrp est une protéine Gs couplé à un récepteur. L'activation de Gs entraîne l'inhibition de PTHrp dans les chondrocytes hypertrophiques (Bastepe 2004). L'activation de Gs induit la production d'AMPc qui active la protéine kinase A (PKA). PTHrp stimule la phosphorylation de Sox9 dépendant de PKA (Schipani 2003). PTHrp inhibe l'expression de Runx2 qui stimule la formation de chondrocytes hypertrophiques.

- Le TGF β (transforming growth factor beta) est un facteur de croissance de la famille du TGF. TGF β est impliqué dans de nombreux processus biologiques tels que la prolifération cellulaire, la différenciation, le développement embryonnaire, la cancérogenèse, la fonction immunitaire, l'inflammation et la cicatrisation. Chez les mammifères, il y a trois isotypes de TGF β : TGF β 1, TGF β 2 et TGF β 3.

TGF β 1 est exprimé par les chondrocytes préhypertrophiques et hypertrophiques au cours de la période embryonnaire. TGF β 1 est également exprimé au niveau du périoste et de l'os mature (Minina 2005).

TGF β 2 est exprimé par les chondrocytes préhypertrophiques et participe avec IHH à leur différenciation en chondrocytes hypertrophiques. On retrouve également du TGF β 2 à la jonction cartilage-os (Minina 2005).

TGF β 3 est exprimé au niveau du périoste et du périchondrium dans la couche cellulaire externe mais également au niveau des chondrocytes préhypertrophiques (Minina 2005).

- Les Bone morphogenic proteins (BMP) sont des membres de la superfamille de TGF β (Transforming growth factor β).

BMP7 est exprimé par les chondrocytes prolifératifs et BMP6 par les chondrocytes préhypertrophiques et hypertrophiques (Van den Heuvel 1996).

Les BMPs assurent la prolifération des chondrocytes dans la plaque de croissance (Minina 2001; Yoon 2006). Certains auteurs décrivent également un rôle pour les BMPs dans la formation et la prolifération des chondrocytes hypertrophiques (Minina 2001; Yoon 2006; Grimsrud 1999; 2001).

BMP induit l'expression de IHH.

- La famille Wnt des protéines sécrétées liées à leur récepteur Frizzled (Frz), et ses co-récepteurs Lrp5 ou Lrp6 activent la voie canonique Wnt. Certains membres de la famille Wnt, capables d'activer les voies canonique et non canonique, sont exprimés dans le cartilage de croissance notamment par les chondrocytes prolifératifs et hypertrophiques (Akiyama 2004; Mak 2006; Yang 2003). L'activation constitutive de β -caténine empêche les chondrocytes immatures de devenir hypertrophiques mais permet la différenciation terminale des chondrocytes matures (Tamamura 2005). La voie de signalisation Wnt médiée par la β -caténine semble intervenir en aval de IHH dans les zones prolifératives précoces, mais indépendamment de IHH dans les zones prolifératives tardives (Mak 2006). L'antagoniste de la voie Wnt canonique Frzb-1 est exprimé par les chondrocytes préhypertrophiques et est susceptible d'agir comme un modulateur endogène de Wnt dans la maturation des chondrocytes (Enomoto-Iwamoto 2002).

- Les "Fibroblast growth factor receptors" (FGFRs) représentent une famille de 4 récepteurs à tyrosine kinase (FGFR1-4), présents à la membrane plasmique, et capables de médier les signaux de plus de 22 FGFs (FGF1-22) (Chen 2005).

Le FGF3 (Fibroblast growth factor (FGF) est exprimé par les chondrocytes prolifératifs et hypertrophiques permettant leur prolifération et leur différenciation (Minina 2002). Au cours du développement normal, le récepteur du FGF3 (FGFR3) a un effet régulateur négatif sur la croissance de l'os. Dans l'achondrodysplasie, la forme mutée du récepteur est constitutivement active ce qui génère chez l'homme des os sévèrement raccourcis et une taille très réduite (Ornitz 2005). De façon générale, le système FGF/FGFR joue un rôle majeur dans de nombreux processus biologiques, y compris l'induction du mésoderme, la croissance et la migration cellulaire, la formation et la croissance osseuse (Chen 2005, Ornitz 2002).

1.1.6. Processus de vascularisation

Le processus de vascularisation est une étape majeure de l'ossification endochondrale : les intermédiaires de cartilage qui préfigurent les os longs sont intrinsèquement non vascularisés, et leur conversion en os est indistinctement couplée à l'invasion par des vaisseaux sanguins (Maes 2013).

Le VEGF est exprimé par les chondrocytes, les ostéoblastes et les ostéoclastes. Les récepteurs VEGF sont exprimés par les cellules endothéliales et les cellules osseuses au cours de

l'ossification endochondrale. Le VEGF contrôle l'invasion des cellules endothéliales et des chondroclastes et ostéoclastes.

Il régule la prolifération, la différenciation et/ou la survie des chondrocytes, des ostéoblastes et ostéoclastes. Les isoformes de VEGF se liant à la matrice induisent l'angiogenèse des métaphyses (centre ossification primaire) et la morphogenèse des plaques de croissance. Les isoformes solubles de VEGF sont impliqués dans la vascularisation épiphysaire et les centres d'ossification secondaire.

Dans les plaques de croissance, les chondrocytes hypertrophiques expriment la protéine angiogénique, VEGF (vascular endothelial growth factor) (Gerber 1999). Des études montrent que le VEGF est plus fortement exprimé dans les chondrocytes hypertrophiques terminaux que dans les chondrocytes de la zone de réserve ou proliférative (Gerber 1999).

Le VEGF est essentiel à la résorption osseuse. Gerber et coll. montrent que le blocage de l'effet de VEGF entraîne une diminution de la croissance en longueur de l'os et l'expansion de la zone hypertrophique (Gerber 1999).

HIF1 α induit l'expression de VEGF.

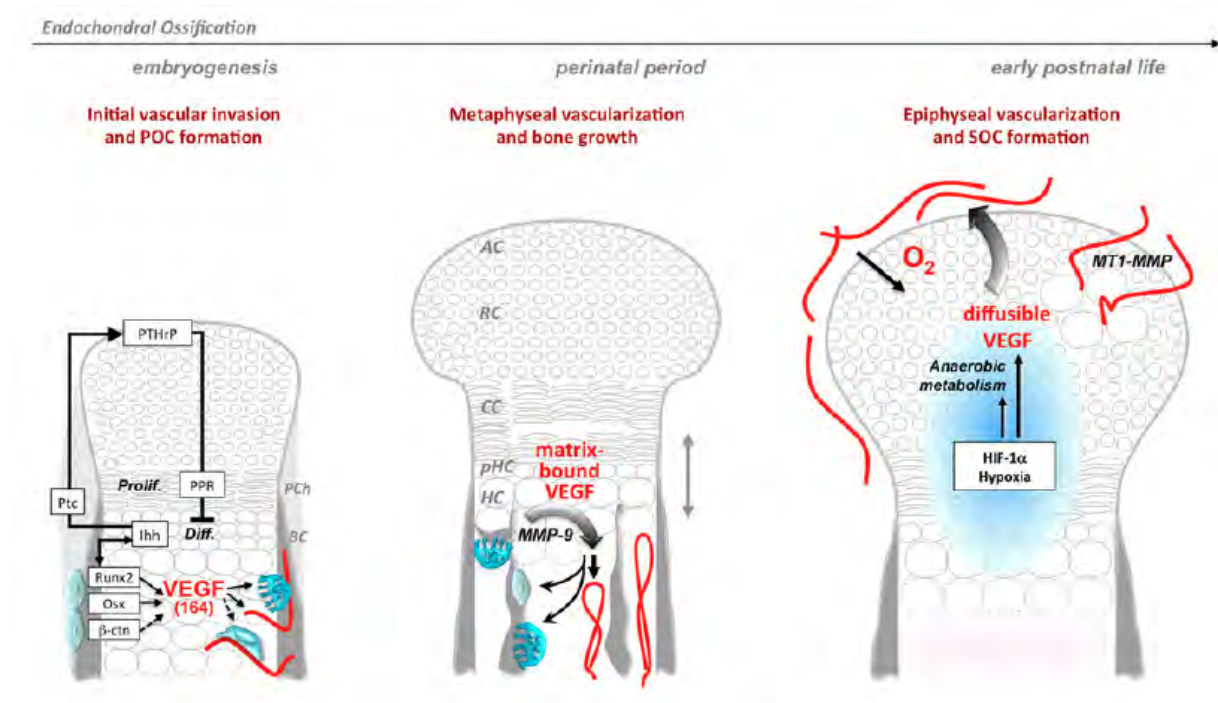


Figure 6 : Processus de vascularisation au cours de l'ossification endochondrale (d'après Maes 2013).

1.1.7. Le périoste et le périchondre

Le périoste est une membrane qui engaine sur toute sa longueur la diaphyse et la métaphyse des os longs. Elle s'interrompt au niveau du cartilage de conjugaison en se fixant au niveau de la virole périchondrale.

Le périoste est une deuxième structure de croissance des os. Sa face profonde possède des propriétés ostéoformatrices et permet une croissance en épaisseur des os.

Chez l'enfant, le périoste est une membrane très épaisse qui assure la croissance. Il a également un rôle lors des fractures en assurant l'apparition de cal osseux et dans le remodelage osseux lors de la croissance (Jouve 2009).

Les éléments cartilagineux sont entourés par une couche de cellules de type « fibroblaste-like », le périchondre. Les cellules adjacentes à la zone hypertrophique du périchondre se différencient en ostéoblastes formant ainsi le périoste (Wuelling 2010). Les vaisseaux sanguins du périoste envahissent la matrice calcifiée par les chondrocytes hypertrophiques, fournissant les ostéoclastes qui dégradent la matrice du cartilage minéralisée, et des ostéoblastes qui vont former la matrice osseuse de l'os spongieux primaire (Wuelling 2010, Hall 2000, Hall 1995).

1.1.8. Processus de minéralisation

A la fin de la croissance, le cartilage de croissance s'atrophie et subit une désorganisation cellulaire, les vaisseaux métaphysaires et épiphysaires s'anastomosent : c'est l'épiphysiodèse physiologique (Jouve 2009).

Des vésicules matricielles (VM) se forment à partir de membrane des cellules intervenant dans la minéralisation, soit au niveau des chondrocytes hypertrophiques, des ostéoblastes et des odontoblastes. Ces vésicules sont des éléments sphériques de petite taille (20-200nm) dont la composition de membrane diffère de celle dont elles sont issues. Elles sont enrichies en phosphatase alcaline tissu-non spécifique, en annexines (principalement II, V et VI) et en phosphatidylsérine (Golub 2009). Les VM sont riches en métalloprotéases matricielles (Dean 1992).

La formation des cristaux d'hydroxyapatite à l'intérieur des VM se fait grâce à des phospholipides et des protéines liant le calcium telles que la phosphatidylsérine, la calbindine et la bone sialo protéine. Associées aux annexines, une structure hexamérique va se former et constituer un tunnel permettant la concentration du calcium dans les vésicules (Kirsh 1997).

L'annexine V va également permettre aux VM de se lier aux collagènes de type II et X (Kirsh 2000).

Le phosphate inorganique est véhiculé par transporteurs Na/Pi de type III et par PHOSPHO1 qui hydrolyse la phosphocholine et la phosphoéthanolamine (Orimo 2010). Lorsque le taux d'hydroxyapatite dépasse le seuil de solubilité, les membranes des vésicules de minéralisation se rompent et les cristaux d'hydroxyapatite s'allongent. La phosphatase alcaline hydrolyse le pyrophosphate inorganique et favorise la minéralisation par production de phosphate inorganique. Le phosphate inorganique est formé à partir de nucléosides triphosphates extracellulaires par NPP1 et il est exporté des cellules par ANK (Harmey 2004). Le degré de minéralisation dépend du taux de phosphate inorganique et de calcium contenu dans le milieu extracellulaire. Le dépôt d'hydroxyapatite se fait entre les fibres de collagène servant de matrice à la minéralisation.

A côté du collagène, la matrice pré-minéralisée contient des protéoglycanes et des protéines non collagéniques qui modulent la minéralisation du collagène.

Le tissu osseux est constitué de lamelles osseuses empilées. Dans une lamelle, les fibres de collagène sont orientées dans la même direction. Mais la direction des fibres varie de lamelle en lamelle. Ce dispositif concerne l'os trabéculaire.

Le tissu osseux est traversé par les systèmes de Havers :

- La matrice osseuse comprend une phase organique et une phase minérale. La phase organique est constituée de 90% de collagène de type I, et en faible proportion des collagènes de type III, V, XI, XIII ; des protéines glycosylées et de glycosaminoglycanes (GAG) telles que ostéopontine, ostéonectine, matrix gla-protein, ostéocalcine, α 2-HS-glycoprotein et des facteurs de croissance (IGF-1, IGF-2, TGF β ...).
- La phase minérale contient des cristaux d'hydroxyapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ présents dans les fibres de collagène et au sein de la substance fondamentale avec de faibles quantités de sodium, de citrate, de magnésium, de carbonates et de différents oligoéléments.

Les cellules osseuses appartiennent à deux lignées différentes ; une lignée d'origine mésenchymateuse qui fabrique la matrice osseuse et en contrôle la pérennité, et une lignée issue de la moelle hématopoïétique, qui l'élimine.

A côté ces deux lignées cellulaires, d'autres types cellulaires participent à la synthèse, à la maintenance et à la dégradation du tissu osseux : les cellules endothéliales, nerveuses et immunitaires.

La lignée ostéoblastique appartient à une lignée de cellules mésenchymateuses indifférenciées résidentes à potentialités multiples qui se différencient sous l'action de facteurs produits localement, et qui les orientent vers le phénotype ostéoblastique.

L'ostéoblaste va sécréter les constituants de la matrice qu'il minéralise secondairement. Il reçoit des messagers permissifs ou inhibiteurs qui vont mettre en route ou stopper les différentes étapes du processus afin que le programme soit accompli sans déficit ni excès (sources de pathologies).

Au long de sa différenciation, les cellules ostéoprogénitrices expriment les marqueurs caractérisant le phénotype. L'analyse des gènes impliqués dans la différenciation a mis en évidence l'expression de 252 gènes.

Les précurseurs hématopoiétiques quittent la moelle osseuse *via* la circulation et sont délivrés dans le site à résorber où ils vont acquérir le phénotype ostéoclastique.

Au contact de cellules ostéoblastiques, ils vont se différencier sous l'action de facteurs produits localement et exprimer une série de marqueurs propres au phénotype ostéoclastique.

Les préostéoclastes vont fusionner et former un ostéoclaste multinucléé immature, qui va subir une activation et devenir un ostéoclaste résorbant.

Les principaux facteurs de transcriptions contrôlant la différenciation ostéoblastique sont Runx2 et osterix.

Runx2 appartient à la famille des facteurs de transcription RUNT, il est aussi connu sous le nom Cbfa1. Il est exprimé par les cellules souches mésenchymateuses lors des stades précoces de la squelettogenèse et par les ostéoblastes au cours de leur différenciation (Kern 2001). Runx2 peut être phosphorylé et activé par les MAPKinases par la liaison entre le collagène de type 1 et des $\alpha 2\beta 1$ intégrines à la surface des ostéoblastes (Ge 2007). Certains auteurs rapportent un rôle de Runx2 dans la prolifération cellulaire (Pratap 2003). Chae et coll. démontrent également que Runx2 induit l'activation de *smpd3* *via* BMP2 (Chae 2009).

Osterix est un facteur de transcription appartenant à la famille des protéines en doigts de zinc. Osterix joue un rôle dans la maturation des préostéoblastes en ostéoblastes immatures. En effet, des souris déficientes en osterix présentent des anomalies osseuses avec un défaut ostéoblastique (Nakashima 2002) L'expression de osterix est sous la dépendance de Runx2 (Celil 2005).

1.2. DEVELOPPEMENT DENTAIRE

1.2.1. Généralités

Chez l'homme, il y a deux temps d'éruption dentaire en fonction de l'âge. La première dentition composée de 20 dents (4 incisives, 1 prémolaire et 2 molaires par arcade) apparaît pendant l'enfance et est appelée dentition temporaire ou déciduale. La seconde dentition composée de 32 dents (4 incisives, 4 prémolaires et 6 molaires par arcade) apparaît dès l'âge de 6 ans c'est ce qu'on appelle la dentition définitive.

Chez la souris, il y a un seul type de dentition composée de 16 dents (2 incisives et 3 molaires par arcade).

1.2.2. Embryologie

Le développement des dents ou odontogenèse débute chez l'homme durant la période embryonnaire au cours de la 7ème semaine (Thesleff 2006; Tucker 2004) et se poursuit après la naissance.

Chez la souris, l'odontogenèse débute également pendant la période embryonnaire à la 11ème semaine (E11) et continue jusqu'au 21ème jour post-natal (Goldberg 2013; Tucker 2004). La formation des dents est un processus complexe qui est régulé par des interactions épithélium-mésenchyme. Le mésenchyme dérive des crêtes neurales alors que l'épithélium dérive de l'ectoderme ou de l'endoderme (Fraser 2009, Soukup 2008).

1.2.3. Processus physiologique de l'odontogenèse

L'odontogenèse est un processus complexe qui correspond au développement de l'organe dentaire. Elle comprend trois phases successives : initiation, morphogenèse et cytodifférenciation. Ces étapes résultent de l'activation de différents gènes, facteurs de transcription et de croissance.

Le développement d'une dent débute par un épaississement de l'épithélium odontogène formant la lame dentaire (Bei 2009). Dans cette épaisseur, les cellules prolifèrent et s'invaginent pour former les placodes (Bei 2009). Ces placodes subissent des mouvements de convolution formant ainsi des bourgeons dentaires, puis des cupules et cloches. Durant ces différents stades d'évolution, l'interaction constante de signaux inductifs entre l'épithélium et mésenchyme donne lieu à des parties distinctes anatomiques et fonctionnelles de la dent et

sert de médiateur de la différenciation de l'épithélium en améloblastes d'émail sécrétant et celle du mésenchyme en odontoblastes de dentine sécrétant.

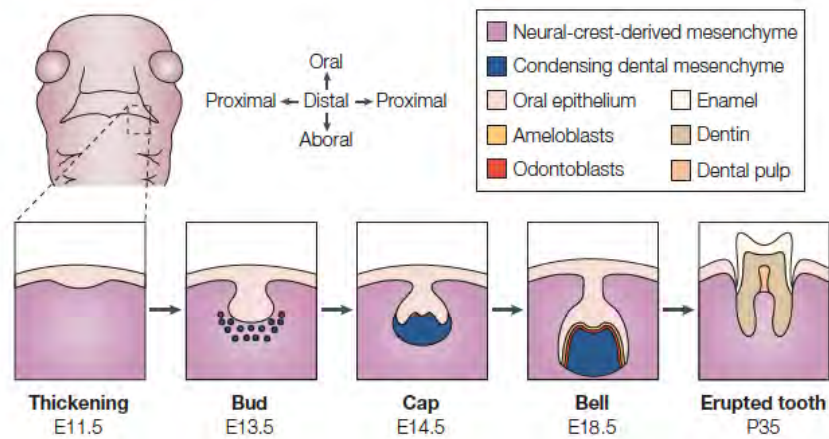


Figure 7: Stades de développement de l'organe dentaire (d'après Tucker 2004).

La dent est un organe complexe dont le développement est finement régulé par de nombreux facteurs ayant une séquence spatio-temporelle bien définie.

Dans la littérature, quatre voies principales de signalisation sont décrites comme impliquées dans la formation des dents : les voies ligands-récepteurs de Bone Morphogenetic Protein (BMP), Fibroblast Growth Factor (FGF), Sonic Hedgehog (SHH) and Wnt (Bei 2009).

Toutes ces voies interviennent lors du développement de l'organe dentaire et les interactions épithélium-mésenchyme (Thesleff 2006).

De nombreuses études montrent que des perturbations au niveau de ces gènes et par conséquent de ces voies de signalisation entraînent de sévères anomalies au niveau de l'odontogenèse comme l'agénésie complète ou l'arrêt de développement à des stades précoces induisant des anodonties (Bei 2009; Tummers 2009; Fleischmannova 2008).

Par exemple, une inactivation conditionnelle de FGF8 dans l'épithélium dentaire entraîne un arrêt du développement dentaire au stade de lamina. La surexpression de BMPR1 chez des souris transgéniques ou l'inactivation de FGFR2 β ou SHH entraîne un arrêt du développement dentaire au stade de bourgeon (Jernvall 2012; Fleischmannova 2008; Bei 2009).

1.2.4. Les différents tissus constitutifs de l'organe dentaire

Une dent est constituée de quatre types de tissus qui sont l'émail, la dentine, le cément et la pulpe dentaire (Fig 8).

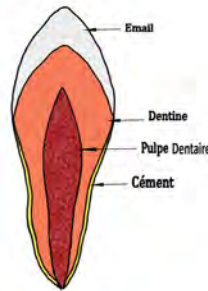


Figure 8: Représentation schématique des différents tissus constitutifs de l'organe dentaire.

La pulpe est l'organe central de l'organe dentaire. C'est un tissu vascularisé et innervé. Plusieurs types cellulaires ont été identifiés dans le tissu pulpaire, les odontoblastes et les fibroblastes. Cependant, des études récentes montrent que la pulpe dentaire est riche en cellules mésenchymateuses (MCs), ce sont les cellules souches de la pulpe dentaire (DPSCs). Ces cellules sont pluripotentes et ont la capacité de se différencier en odontoblastes, ostéoblastes, adipocytes et cellules neuronales (Kawashima 2012).

La dentine est un tissu localisé à l'interface pulpe dentaire-émail au niveau de la couronne et cément-pulpe dentaire au niveau des racines. Elle est constituée par des canaux appelés tubulis dentinaires, dans lesquels passent des fibres nerveuses appelées fibrilles de Tomes. Ces fibrilles sont les prolongements des odontoblastes localisés dans la pulpe dentaire. Ce tissu présente des similitudes avec le tissu osseux tant dans son processus de formation que dans ses caractéristiques (Barlett 2013). La matrice organique de la dentine est constituée de collagène de type I (Goldberg 2011; Arana-Chavez 2004). La dentinogenèse est assurée par les odontoblastes qui proviennent des cellules mésenchymateuses présentes dans le mésenchyme.

Histologiquement, on décrit quatre types de dentines : le manteau dentine, la dentine primaire, la dentine secondaire et la dentine tertiaire.

L'émail recouvre la couronne dentaire qui surmonte la dentine. Cette structure est non vascularisée et non innervée. L'amélogénèse (ou formation de l'émail) est la synthèse, la

sécrétion, la minéralisation et la maturation de l'émail par les améloblastes. L'émail est une structure minéralisée. Il est organisé en prisme et substance interprismatique composés de cristaux d'hydroxyapatite polysubstituée.

Le ciment est un tissu minéralisé qui recouvre les racines des dents. Il correspond à la zone d'insertion des fibres de collagène ou fibres de Sharpey du ligament périodontal. Le ciment est composé d'une partie minérale 61%, d'une matrice organique 27% et d'eau 12% qui forme une matrice comparable à celle de l'os. Les cellules constitutives du ciment sont les cémentoblastes, cellules mésenchymateuses qui possèdent la particularité de se différencier des cellules folliculaires autour de la zone des racines. Le processus de minéralisation de la matrice extracellulaire (MEC) du ciment est comparable à de l'os, en effet, les cémentoblastes expriment une séquence de gènes également requit dans la minéralisation de la MEC par les ostéoblastes (Bao 2013).

La cémentogenèse (ou formation du ciment) est un processus continu qui se déroule durant toute la durée de vie d'une dent, il assure les réparations de résorption des racines, notamment au cours des mouvements orthodontiques ou parodontopathies.

1.2.5. Mécanisme de la dentinogenèse

La dentine est un tissu mésenchymateux qui va se minéraliser. Les odontoblastes se différencient et sont localisés dans les tubules de dentine et communiquent de la fonction amélodentinaire à la chambre pulpaire.

La formation de la dentine implique la sécrétion d'une matrice extracellulaire par les odontoblastes différenciés, ou pré-dentine, qui va ensuite se minéraliser.

Cette matrice de pré-dentine est composée de collagène de type I à 90% et à 10% de protéines non-collagéniques et de lipides.

La DSPP (dentin sialophosphoprotein) est le composant majeur de la composante non collagénique de la dentine. Il est considéré comme la protéine spécifique de la dentine. Ce peptide a un rôle important dans l'évolution de la pré-dentine en dentine minéralisée. La *DSPP* code pour un ARN messager clivé au niveau de sites spécifiques par des protéases de la famille de l'astacine et des MMPs (Linde 1993, Yamakoshi 2006) pour donner trois protéines : DSP (dentin sialoprotein), DGP (dentin glycoprotein) et DPP (dentin phosphoprotein) (MacDougall 2006, Bulter 2002).

Parmi les protéines non collagéniques on retrouve : protéines, phosphoprotéines, protéoglycanes, facteurs de croissance, protéines de l'émail, phosphatase alcaline, des protéases telles que les métallo-protéases et leurs inhibiteurs (MMPs, TIMPs) (Bulter 2002). Cette composante non collagénique de par sa composition sert de support à l'initiation de la minéralisation *via* des interactions moléculaires.

Certains auteurs rapportent chez la souris la présence de faible taux de DSPP au niveau du ligament périodontal, des os et de l'oreille interne (Butler 2003, Qin 2003).

1.2.6. Dentinogenèse imparfaite

- Chez l'homme

La dentinogenèse imparfaite (DI) est un défaut héréditaire de la dentine (Biria 2012). Sa transmission se fait selon un mode autosomique dominant (Majorana 2010).

Selon les auteurs, la prévalence de DI chez les patients d'OI est comprise entre 21% et 73% (Majorana 2010). La DI est une manifestation clinique rencontrée de façon variable chez les patients atteints d'OI. En effet, la DI peut se retrouver dans le tableau des manifestations cliniques chez les patients atteints d'OI mais elle peut aussi en être totalement absente. Enfin il existe des cas rapportés de DI chez des patients ne présentant pas d'atteinte osseuse (Majorana 2010).

D'après Shields, on distingue trois types de DI, la DI de type I, II et III. La DI de type I est associée à une mutation du gène du *COL1A1* et/ou *COL1A2* codant pour le collagène de type I, composant le plus abondant de la matrice organique de la dentine (86% à 90%). La DI de type I est fréquemment associée aux OI de type I, III et IV.

Les DI de type II et III sont associées à une mutation du gène *DSPP* (sialophosphoprotéine dentinaire) codant pour la DSP (sialoprotéine dentinaire) pour la DI de type II et pour la DPP (phosphoprotéine dentinaire) pour la DI de type III. Les DI de type II et III sont des formes isolées.

Une autre pathologie dentaire est due à la mutation du gène *DSPP*, c'est la dysplasie dentinaire de type II qui touche uniquement la dentition temporaire (Rapjar 2002).

Cliniquement, la DI se caractérise par une modification de teinte de la couronne dentaire allant du bleu-gris au jaune-brun associée à une opalescence et une translucidité anormales. Radiologiquement les dents présentent des racines grêles et courtes, des couronnes bulbeuses et une oblitération de la chambre pulpaire.

- Chez la souris *fro/fro*

La souris *fro/fro* est un modèle de dentinogenèse imparfaite caractérisée par une hypominéralisation dentaire (Opsahl 2005). Elle présente un retard de minéralisation du manteau dentinaire et de l'émail.

Les incisives mandibulaires des souris *fro/fro* ont une taille réduite de moitié par rapport aux souris sauvages avec une altération de la partie linguale corrélée à un défaut de prolifération cellulaire chez la souris *fro/fro*. De plus, les incisives mandibulaires présentent une fissure qui persiste dans le temps. Les molaires ont des couronnes réduites et la chambre pulpaire des molaires de souris *fro/fro* est oblitérée. Les racines ont une longueur normale avec des renflements bulbeux dus à une surproduction de ciment.

Des études d'immunohistochimie montrent une absence de marquage d'amélogénine au niveau des améloblastes sécréteurs des incisives des souris *fro/fro*. Cependant, au niveau des molaires des souris *fro/fro*, il y a une augmentation d'expression d'amélogénine des odontoblastes et des préostéoblastes. Aucune expression de DSP n'est observée chez la souris *fro/fro*. L'expression de l'ostéonectine et de l'ostéopontine dans les tissus dentaires n'est pas différente entre les souris *fro/fro* et sauvages.

A côté de cette hypominéralisation dentinaire, la souris *fro/fro* présente une hypominéralisation de l'os alvéolaire caractérisée par une diminution du nombre et de l'épaisseur des trabécules osseux (Khavandgar 2015).

Il n'y a pas de différence d'apoptose des ostéoblastes dans l'os alvéolaire et les odontoblastes dans la dent (Goldberg 2012).

- *Processus physiopathologique de la dentinogenèse imparfaite*

Selon les auteurs, plusieurs hypothèses physiopathologiques pour la DI ont été émises (Hall 2002, Lindau 1999, Majorana 2010).

Au cours de la DI, les odontoblastes dysfonctionnels sécrètent une matrice procollagénique anormale qui se minéralise. Cette minéralisation anormale piège alors les odontoblastes et leur prolongement les empêchant de sécréter le collagène. Cette progression anormale de minéralisation entraîne un recourbement des prolongements ostéoblastiques caractéristiques en S (visible en microscope électronique).

L'obstruction de la pulpe dentaire serait due au dépôt continu de matrice par des « pseudo-odontoblastes » et sa minéralisation désordonnée.

1.3. LES DYSPLASIES SQUELETTIQUES LES PLUS FREQUENTES

1.3.1. Définition

Les dysplasies squelettiques (DS) appelées aussi ostéochondrodysplasies sont définies comme un groupe hétérogène de pathologies caractérisées par une anomalie de développement et de croissance osseuse et cartilagineuse (Panda 2014; Krakow 2010). Ces désordres ont pour conséquences principalement des défauts de croissance staturale caractérisée par un nanisme (Krakow 2010).

1.3.2. Données épidémiologiques

Les DS sont des pathologies rares, selon les auteurs, la prévalence des DS se situe entre 2,3 et 7,6 pour 10 000 naissances (Barbosa-Buck 2012; Orioli 1986; Andersen 1989; Rasmussen 1996; Stevenson 2012).

1.3.3. Etiopathogénie

Les DS sont un groupe de pathologies héréditaires caractérisées par des anomalies cartilagineuses et osseuses. Même si aujourd'hui certaines entités cliniques n'ont pas été élucidées sur le plan étiologique, les progrès récents dans les technologies génétiques ont permis d'identifier la base moléculaire dans plus de 350 de ces troubles (environ 240 gènes), nous offrant la possibilité de traduire les résultats de la recherche en services cliniques (Karkow 2015). Les DS résultent de mutations de gènes codant pour les protéines de la MEC, des facteurs de transcriptions, de suppresseurs de tumeur, de transducteur de signaux (ligands, récepteurs, et protéines de canaux), d'enzymes, de transporteurs cellulaires, des chaperones, des protéines de liaison intracellulaire, des ARN, des protéines ciliaires et cytoplasmiques et un certain nombre de produits de gènes de fonction actuellement inconnue (Karkow 2015).

1.3.4. Classification

Les DS, loin de représenter une entité unique, regroupent en réalité un ensemble complexe et hétérogène de pathologies se caractérisant par des malformations squelettiques et

un nanisme. Le spectre clinique de ces pathologies est très étendu, allant de formes extrêmement sévères avec mort néo-natale à des formes moins sévères non létales. A cette grande hétérogénéité phénotypique s'ajoute une grande hétérogénéité génétique de par la nature des gènes mutés, la nature des mutations elle-même et le mode de transmission des pathologies.

Face à cette grande variabilité, plusieurs classifications se sont succédées pour prendre en compte les connaissances étiologiques et cliniques. Cette démarche, réalisée dans un but de simplification, ne permet cependant pas toujours de classer aisément toutes les situations cliniques.

A l'heure actuelle, les DS regroupent plus de 450 entités définies sur des critères cliniques, radiologiques et moléculaires (Warman 2011; Panda 2014; Krakow 2010).

La classification la plus récente est la classification internationale de 2010 qui distingue parmi les DS : 8 groupes classés en fonction de la base moléculaire (FGFR3, collagène de type 2, de type 11 collagène, les troubles de sulfatation, perlecan, aggrecan, filamine et TRPV4) et 32 autres groupes organisés en fonction de leur présentation clinique et radiographique.

On distingue :

Les différents groupes de DS en fonction des critères moléculaires sont :

1. Groupe de *FGFR3*
2. Groupe de Collagène 2
3. Groupe de Collagène 10
4. Groupe des désordres de sulfatation
5. Groupe de perlecan
6. Groupe d'aggrecan
7. Groupe de filamine
8. Groupe de TRPV4

Les différents groupes de DS en fonction du tableau clinique sont :

9. Dysplasies avec côtes courtes (avec ou sans polydactylie)
10. Dysplasie épiphysaire multiples et pseudoachondrodysplasie
11. Dysplasie métaphysaire

12. Dysplasies spondylométaphysaires (SMD)
13. Dysplasies spondylo-épi-(meta)-physaire (SE(M)D)
14. Dysplasies spondylodysplasiques sévères
15. Dysplasies acroméliques
16. Dysplasies acromésoméliques
17. Dysplasies mésoméliques et rhizo-mésoméliques
18. Dysplasies avec incurvations osseuses
19. Dysplasies avec os mince
20. Dysplasies avec de multiples luxations articulaires
21. Chondroysplasies ponctuées (CDP)
22. Dysplasies néonatales ostéosclérotiques
23. Densité osseuse augmentée (avec ou sans modification de forme des os)
24. Densité osseuse augmentée avec implication métaphysaire et/ou diaphysaire
25. Osteogenesis imperfecta et densité osseuse diminuée
26. Minéralisation osseuse anormale
27. Surcharge lysosomale avec atteinte squelettique (dysostose multiplex)
28. Ostéolyse
29. Développement désordonné des composants squelettiques
30. Syndrome d'hypertrophie avec atteinte squelettique
31. Ostéoarthropathies génétique inflammatoire et rhumatologique
32. Dysplasie cleidocraniale et défaut d'ossification cranial isolée
33. Syndrome de carnosynostose
34. Dysostose avec atteinte craniofaciale prédominante
35. Dysostose avec atteinte vertébrale prédominante avec ou sans atteinte des côtes
36. Dystoses patellaires
37. Brachydactylies (avec ou sans manifestations extrasquelettiques)
38. Hypoplasie des membres
39. Polydactylie-Syndactylie-Triphalangisme
40. Défaut de formation articulaire et synostoses

Leur classement évolue en fonction de leurs bases moléculaires (Campeau 2013).

1.3.5. Manifestations cliniques

Cliniquement, les DS sont caractérisées par des anomalies de formation, de développement, d'équilibre et de taille du squelette appendiculaire et axial qui entraînent différents degrés de nanisme ou de petite stature avec une forte mortalité périnatale (Krakow 2010).

Ces pathologies peuvent être associées à de nombreuses complications : orthopédique, neurologique, cardiaque, pulmonaire, rénale, auditive, ophtalmologique et psychologique (Krakow 2010).

Ici nous nous sommes particulièrement intéressés aux dysplasies squelettiques associant une incurvation au niveau des os longs qui correspond au groupe 9 de la classification internationale.

Nous proposons un tableau de synthèse des données générales des dysplasies squelettiques avec incurvation des os longs dans le tableau 2 et un tableau de synthèse des manifestations cliniques dans le tableau 3 (Campeau 2013; Begam 2011; Cormier-Daire 1998; Foster 1994; Nesbitt 1999; Whyte 1994; Offiah 2002; Toledo 1999).

Pathologies	Gènes	Protéines	Locus	MT	P	OMIM	Pronostic	TTT	Diagnostic	Autres noms
Dysplasie campomélrique	SOX9	SRY-box9	17p24.3-25.1	AD	<1 / 1 000 000	114290 211990 602196	90-95% mort périnatale	Σ	2ème trimestre	Nanisme campomélrique
Dysplasie de Stüve-Wiedemann	LIFR	Leukemia inhibitor factor receptor	5p13.1	AR	inconnu (rares cas)	601559	forte mortalité périnatale (DR, HT)	Σ		
Dysplasie kyphomélrique	inconnu	inconnu	inconnu	AR						
Osteogenesis imperfecta	COL1A1 COL1A2	α1COL1A α2COL1A	17q21.33 7q21.3	AD	1-9 / 100 000		létales non létales			
Syndrome Antley-Bixler	type 1 : FGFR2 type 1 : POR	cytochrome P450 cytochrome P450	10q26 7q11.2	AR	< 1 / 1 000 000	207410	forte mortalité périnatale (DR)	Σ : neuroC+ pneumo		
Hypoplasie cartilage-cheveux	RMFRP	Composant d'ARN de ARNase H	9p13	AR	inconnu	250250	dpt déficit immunitaire et assoc mdie Hirschsprung	greffe MO	/séquençage gène	Chondrodysplasie métaphysaire autosomique récessive (CMAR) Chondrodysplasie type McKusick
Syndrome Cumming	?	?	?	AR	< 1 / 1 000 000	211890	mort-nés péri natal			Campomélle type Cumming

Pathologies	Gènes	Protéines	Locus	MT	P	OMIM	Pronostic	TTT	Diagnostic	Autres noms
Hypophosphatasie	ALPL (foie/os/rein)	TNAP	1p36.1- p34	AR AD	inconnu 1/100 000	146300 241500 241510		Σ : AINS tériparatid Φ par enzyme de remplace ment	dosage PAL sérique + séq ADN gène ALPL recherche mutation biopsie trophoblaste (HPP sévère)	HPP Mdlie de Rathburn prénatale bénine Phosphoéthanolami nurie prénatale bénine
Dysplasie thoracique asphyxiante-Jeune	IFT80 DYNC2H1 aucun des 2	Intraflagellai re transport 80 Dyneïne, cytoplasmique2, chaîne lourde 1	3q25.33 11q22.3	AR	inconnu incidence 1 à 5/ 500 000	208500 611263 613091 613091 613819 614376 615630 615633				Syndr du Jeune Dystrophie thoracique asphyxiante du nvx- né

Tableau 2 : Synthèse des données générales des dysplasies avec une incurvation osseuse. (MP : mode de transmission ; P :prévalence; TTT : traitement, AD : autosomique dominant, AR : autosomique récessif, Σ : symptomatique, ALPL :phosphatase alcaline des foie/os/rein, TNAP : phosphatase alcaline non tissu spécifique,HSPG2 : heparan sulfate proteoglycan 2, RMRP RNA :component of Mitochondrial RNA-Processing endonuclease, DR : détresse respi, HT : hyperthermie, MO : moelle osseuse, HPP : hypophosphatasie, AINS : anti-inflammatoire non-stéroïdien, neuroC : neurochirurgie, pneumo :pneumologie, Φ : traitement)

Pathologies	Généralités	Taille	Crâne	Os longs	Caractères sexuels	Autres
Dysplasie campomélique		nanisme	dysmorphie crânio-faciale fentes palatines malformations cérébrales	incurvation, grêle	ambiguïté sexuelle ou réversion sex chez 2/3 garçons	anomalies bassin, thorax : pb respiratoires 11 paires de côtes malformations cardiaques malformations rénales
Dysplasie de Stüve- Wiedemann		nanisme	langue dépaillée abcès de réflexes cornéens	incurvation os longs tibia, fémur +++ , humérus et avt-bras + os longs : trapus, métaphyses larges, e corticales internes camptodactylie		anomalie thorax : pb respi épisodes hyperthermie scoliose progressive fractures spontanées abcès réflexe rotulien
Dysplasie kyphomélique			micrognathie	incurvation tibia +++ faible incurvation autres os asymétrie tibia micromélie		
Osteogenesis imperfecta		nanisme	macrocéphalie dentinogenèse imparfaite	incurvation due aux fractures ostéopénie		sclérotiques bleues scoliose coxa vera surdité atteinte rénale
Syndrome Antley-Bixler	type 1 type 2		craniosténose hypoplasie étage moyen de la face front large et bombé, nez aplati, proptosis forme oreille anormale pb développement intellectuel	incurvation fémorale synostose radio-humérale contracture articulaire camptodactylie et/ou arachnodactylie	anomalie urogénitale ambiguïté sex (défaut stéroïdoG)	malformations cardiaques, anales, vertébrales
Hypoplasie cartilage- cheveux	1er cas décrit Amish	nanisme		mains courtes membres varus RX : lésions métaphysaires genoux+, épiphyses rondes et vol pdt enfance		cheveux fins, pousse lente déficit immunitaire (incl)
Dysplasie thanatophorique	type 1 : Nanisme thanatophorique type 1 type 2 : Nanisme thanatophorique type2		dysplasie osseuse crâne en tréfle	fémurs incurvés épiphyses effilées et irrégulières		thorax étroit et long côtes courtes corps vertébraux aplatis doigts aplatis bassin carré

Tableau 3a: Synthèse des manifestations cliniques des dysplasies avec une incurvation osseuse

Pathologies	Généralités	Taille	Crâne	Os longs	Caractères sexuels	Autres
Syndrome Cumming		nanisme	crâne en tréfle face très déformée excès tissu ss-cut microphthalmie	anomalies 4 mbres courts angulation des os longs		anomalies viscéres : dysplasie multikystique reins, pancréas, foie, grêle court, plysplénie pb λ : lymphoedème généralisé ou lymphocèle cervicale (= hygroma kystique du cou) lobulation pulmonaire anormal (hérotaxie, dextrotaxie) cardio : retour veineux pulmonaire anormal total, persistance veine cave sup gche et arche aortique droite
Hypophosphatasie	Hypophosphatasie HP de adulte HP de enfant HP infantile HP périnatale bénigne HP périnatale létale Odontohypophosphatasie	petite taille (J)	déficit minéralisation dentaire craniosténose prématurée (I) exfoliation précoce dents primaires avec racines et/ou carres dentaires graves mais pas malformations sq	déficit minéralisation oss démarche dandinante (J) malformat sq (J) déminéralisation étendue (PI) rachitisme métaphyses (PI) régresse avec âge (PN) pb minéralisation in utero +++ (PL)		déficit phosphatase alcaline sérum opérations respi (PI) fractures de stress (A) dlr cuisses (A) chondrocalcinose (A) ostéoartropathie sévère (A)
Dysplasie dys-segmentaire	Dysplasie dys segmir- glaucome DDS type Roland- Desbuquois DDS type Silverman- Handmaker Dysplasie odonto- maxillaire segmentaire	nanisme	céphalocèle anomalies crano-faciales fente palatine taille orbite réduite			anomalies cardiaques hydrocéphrose
Dysplasie thoracique asphyxiante - Jeune (ATD)		croissance variable		dysplasie osseuse mbres courts aspect « trident » cotyle anomalies métaphysaires polydactylie postaxiale		dysplasie côtes courtes thorax étroit (pb respi) insuffisance hépatique et rénale (fibrose foie, néphropathie tubulo- interstitielle chronique) rétinopathie pigmentaire dévelop intelec normal

Tableau 3b : Synthèse des manifestations cliniques des dysplasies avec une incurvation osseuse. J : juvénile, PI : préinfantile, PL : périnatale létale, PN : périnatale.

1.3.6. Diagnostic

A l'heure actuelle, la meilleure approche diagnostique des DS est la recherche d'antécédents familiaux de DS, le génotype de certains gènes impliqués dans les DS et les échographies par ultra-sons au premier, deuxième et troisième trimestre de grossesse (Krakow 2015).

1.3.7. Traitement

La prise en charge de ces diverses pathologies requiert la connaissance des complications médicales et psychologiques.

Actuellement, l'approche thérapeutique est ciblée sur les complications de ces pathologies. La prise en charge est multidisciplinaire incluant pédiatres, orthopédistes, rhumatologues, otorhynolaryngologues, neurologues, ophtalmologistes et gynécologues-obstétriciens.

Le traitement de ces pathologies reste cependant particulièrement difficile.

1.4.2. Métabolisme des sphingolipides

Le métabolisme des sphingolipides est un processus complexe. Il fait intervenir des enzymes dont l'activité dépend de leur localisation subcellulaire et de leur mécanisme d'activation. Le métabolisme des sphingolipides présente de nombreuses interconnexions qui régulent le niveau des lipides bioactifs et des interconversions qui induisent des réponses cellulaires variées (Hannun 2008).

La première étape de la biosynthèse *de novo* des sphingolipides est représentée par la sérine palmitoyl transferase (SPT) qui génère la 3-cétosphinganine à partir de la condensation d'une palmitoyl-coenzyme A et d'un acide aminé alcool, la sérine. La 3-cétosphinganine est ensuite réduite en sphinganine par la 3-cétosphinganine réductase, puis une chaîne d'acide gras sous forme de d'acyl-coenzyme A est ensuite liée par une liaison amide sur la fonction amine du C₂ de la sphinganine pour former la dihydrocéramide (ou plus particulièrement, les dihydrocéramides, selon la longueur de chaîne de l'acide gras). Ces dihydrocéramides sont ensuite transformés en céramides par une dihydrocéramide réductase. Toutes ces étapes de biosynthèse, aboutissant à la formation du céramide, se déroulent à la face cytoplasmique du réticulum endoplasmique où se situent toutes ces enzymes (Spiegel 2003).

Le céramide joue un rôle central dans le métabolisme des sphingolipides puisque c'est à partir de lui que les différents sphingolipides vont être synthétisés.

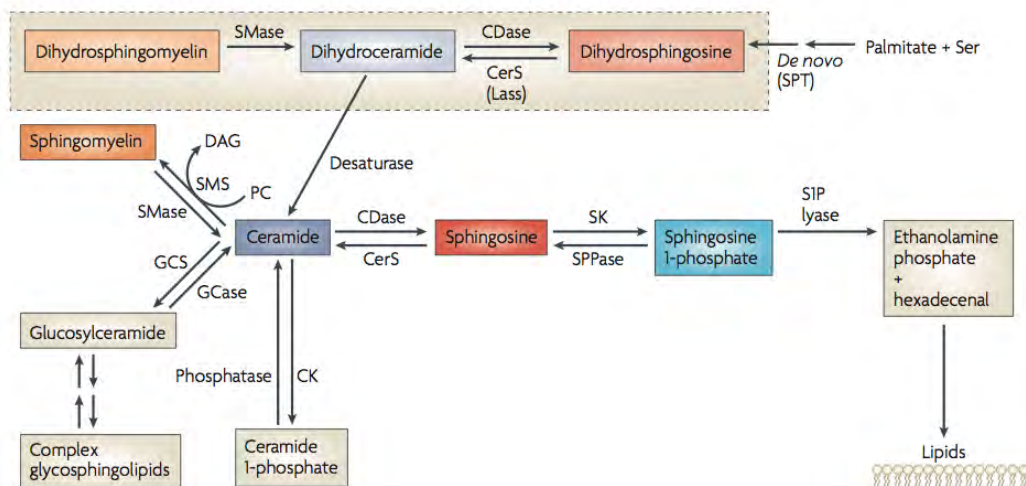


Figure 11: Métabolisme des sphingolipides (d'après Hannun et Obeid 2008).

Pour les glycosphingolipides, le galactosyl céramide est synthétisé au niveau de la membrane interne du réticulum endoplasmique (feuillet luminal) par une galactosyl synthase.

Les autres glycosphingolipides sont formés dans l'appareil de Golgi. En effet, le céramide néosynthétisé au niveau du réticulum endoplasmique est transféré au niveau de la membrane externe du Golgi où il peut être glycosylé par une glucosyl céramide synthase, par transport vésiculaire.

Ainsi à partir du céramide, on distingue trois voies différentes avec d'une part la phosphorylation du céramide par la céramide kinase pour induire la production de céramide-1-phosphate (Arana 2010), l'addition de phosphocholine par la sphingomyéline synthase produit la sphingomyéline (Milhas 2010) et l'addition d'un sucre par la glucosyl- et la galactosyl-céramide synthase induit du glucosyl céramide (Merrill 2011).

Le céramide peut être hydrolysé par les céramidases au niveau de la chaîne acyl et induire la production de sphingosine (Mao 2008). La sphingosine peut être reconvertie en céramide par la céramide synthase ou être phosphorylée par la sphingosine kinase et induire la production de sphingosine 1 phosphate (Pitson 2011). La sphingosine 1 phosphate (S1P) peut être déphosphorylée et régénérer la sphingosine ou être hydrolysée par la sphingosine lyase en phosphate ethanolamine et hexadecanal (Serra 2010).

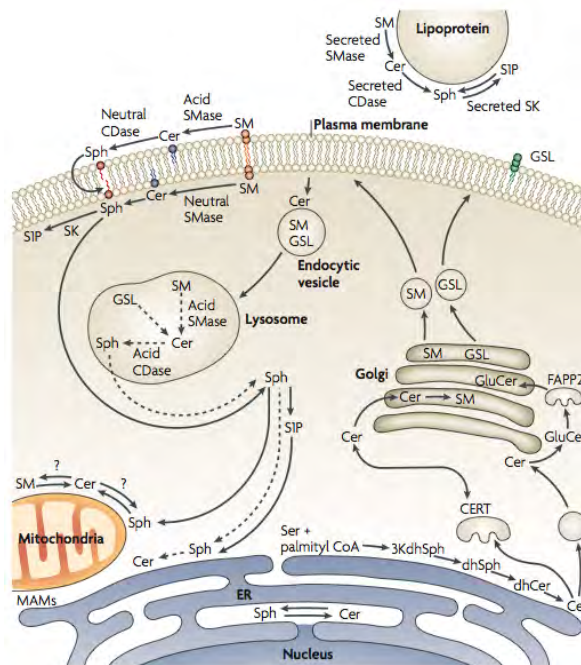


Figure 12: Compartimentation du métabolisme des sphingolipides (d'après Hannun 2008).

1.4.3. Sphingolipides : structure et fonction

1.4.3.1. La sphingomyéline

La sphingomyéline ou céramide-phosphocholine est un terme générique qui inclut des molécules pouvant varier dans la structure de la base sphingoïde et de l'acide gras.

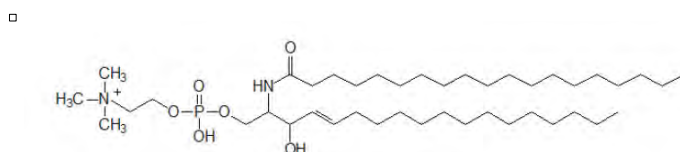


Figure 13: Structure chimique de la sphingomyéline.

C'est une molécule amphiphile et polaire, qui est ionisée à pH de l'organisme, ce qui limite son flip-flop spontané d'un feuillet à l'autre de la bicouche phospholipidique.

La sphingomyéline (SM) est le sphingolipide le plus abondant des membranes cellulaires chez les mammifères (2 à 15% des phospholipides totaux) (Gault 2010). Elle est synthétisée dans le feuillet interne de l'appareil de Golgi par une sphingomyéline synthase et amenée à la membrane plasmique par transport vésiculaire.

La sphingomyéline se situe majoritairement au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique où elle va être dégradée en céramide par une sphingomyélinase acide (Calderon 1997). On la retrouve en plus petite quantité au niveau du feuillet interne où elle peut être hydrolysée en céramide par une sphingomélinase neutre (Bartke 2009). La sphingomyéline est un constituant important des rafts et des cavéoles qui sont des structures membranaires riches en cholestérol et en sphingolipides, et représentent des plateformes majeures de signalisation (Brown 2000; Milhas 2010).

La SM est retrouvée de manière abondante au niveau des gaines de myéline, qui sont des manchons cellulaires (300 couches) s'enroulant autour des axones des neurones du système nerveux périphériques. Elle peut subir une dégradation lysosomale par une sphingomyélinase acide, après endocytose par voie endosomale.

Le déficit en sphingomyélinase acide entraîne une sphingolipidose appelée maladie de Niemann-Pick (Kolter 2005).

1.4.3.2. Le céramide

Le céramide est généré par différentes sources cellulaires. En effet, il existe plusieurs types de céramide selon les mécanismes de production et les compartiments cellulaires dans lesquels ils sont synthétisés (Hannun 2008). La synthèse *de novo* de dihydrocéramide est réalisée par les céramide-synthases 6, qui ont des spécificités de substrat partiellement différentes (acides gras de longueur différente). Les céramide-synthases 5 et 6 (CerS5 et CerS6) incorporent préférentiellement des acides gras C16, la céramide-synthase 1 est spécifique de C18, la céramide-synthase 4 est spécifique de C18-C20, les céramide-synthases 2 et 3 sont spécifiques de C22 à C25 (Levy 2010).

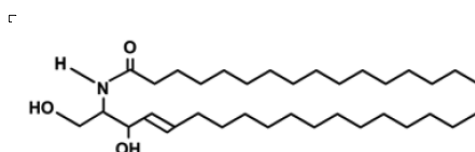


Figure 14: Structure chimique du céramide.

Le céramide est une molécule hautement hydrophobe qui contient une petite partie polaire non ionisée au pH de l'organisme. Cette particularité implique qu'en l'absence de transporteur protéique ou de transfert vésiculaire, le céramide tend à rester dans les membranes où il a pris naissance (Hanada 2010).

A côté de sa synthèse *de novo* dans le réticulum endoplasmique, le céramide peut être généré dans la membrane plasmique par une sphingomyélinase acide (feuillet externe) ou neutre (feuillet interne), dans le lysosome sous l'effet d'une sphingomyélinase acide ou d'une glucosylcéramide- β -glucosidase et dans la membrane mitochondriale externe sous l'effet d'une sphingomyélinase neutre (Gault 2010; Hannun 2011). Il existe également une voie de sauvegarde des sphingolipides à partir du système endolysosomal où le céramide est généré à partir de l'hydrolyse d'une sphingomyéline puis transformé par une céramidase. La sphingosine

libérée, relativement soluble dans le cytosol puisqu'elle ne contient plus qu'une seule chaîne lipidique, est recyclée en céramide au niveau du RE par une céramide synthase. Enfin, le taux de céramide généré est contrebalancé par des enzymes qui le métabolisent pour générer des sphingolipides complexes. Il est actuellement estimé que plus de 28 enzymes agissent sur le céramide soit en tant que substrat, soit en tant que produit (Hannun 2011).

Le céramide et ses dérivés jouent un rôle majeur en tant que second messagers, en particulier dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. Il a été démontré que le céramide interagit avec de nombreuses protéines cellulaires, notamment des sérine-thréonine-phosphatases (PP1 et PP2A) (Chalfant 1999) induisant entre autre la déphosphorylation d'Akt qui est anti-apoptotique (Zhou 1998). L'activation de la sphingomyélinase acide lysosomale comme la cathepsine D est couplée à la voie pro-apoptotique mitochondriale (Heinrich 2004). Le céramide peut lier et activer directement des kinases de la famille de PKC, en particulier PKC ζ impliquée dans la régulation des potentiels de membrane, l'inhibition d'Akt et l'arrêt du cycle cellulaire (Bourdon 2002; Wang 2005). Cependant, les réponses cellulaires induites par le céramide dépendent de sa localisation subcellulaire. Les enzymes catalysant la dégradation du céramide, ou ceramidases, se trouvent dans différents compartiments subcellulaires, en fonction de leur activité à pH acide, neutre ou alcalin. Cette compartimentation joue un rôle dans la biorégulation des effets du céramide (Arana 2010). Le déficit en céramidase acide lysosomale est à l'origine de la maladie de Farber (Fasano 2006).

1.4.3.3. La sphingosine

Du point de vue structural, la sphingosine est constituée d'une seule chaîne lipidique. Elle est issue de la dégradation du céramide par une céramidase, ou de la déphosphorylation de la sphingosine-1-phosphate par une phosphatase.

Les enzymes responsables de son métabolisme ont une activité catalytique notamment à la face cytosolique des membranes cellulaires suggérant que la sphingosine cytosolique est plus souvent modifiée et que sa disponibilité va dépendre de la localisation des sphingosines kinases (Siow and Wattenberg 2011; Siow and Anderson 2011).

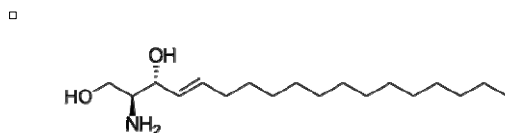


Figure 15: Structure chimique de la sphingosine.

Sa structure fait que cette molécule est particulièrement soluble en milieu aqueux, ce qui lui permet de passer d'un feuillet membranaire à l'autre par flip-flop et également de diffuser dans le cytosol et de passer d'un compartiment cellulaire à l'autre.

Du point de vue fonctionnel, la sphingosine module l'activité des protéines kinases et de protéases, les caspases. Elle participe également à l'arrêt du cycle cellulaire et à l'apoptose. La sphingosine régule les processus d'endocytose et du cytosquelette d'actine. Elle régule négativement les protéines de la famille PKC (Smith 2000).

1.4.3.4. La sphingosine-1-phosphate

La sphingosine-1-phosphate est générée par la phosphorylation de la sphingosine par une sphingosine kinase 1 ou 2 selon le compartiment cellulaire.

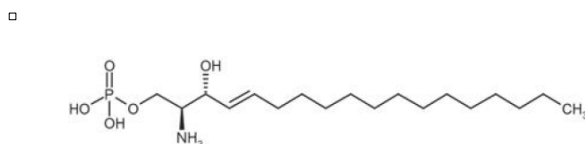


Figure 16: Structure chimique de la sphingosine-1-phosphate.

La sphingosine-1-phosphate est une molécule amphiphile avec une seule chaîne aliphatique, elle présente une tête polaire zwitterionique dont le phosphate est chargé au pH physiologique. Cette structure suppose que la S1P ne peut passer spontanément d'un feuillet membranaire à l'autre par flip-flop.

Elle est produite au niveau du feuillet interne de la membrane plasmique sous l'effet de la sphingosine kinase 1 (SK1) (Chan 2013). Pour passer dans le compartiment extracellulaire (où se situent ses récepteurs), la S1P utilise un transporteur d'efflux, soit de la famille ABC (Mitra 2006), soit le transporteur Spns2 (S1P transporter spinster homolog 2) (Fukuhara 2012). Les récepteurs de la S1P appartiennent à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Il existe cinq types de récepteurs (S1PR1, S1PR2, S1PR3, S1PR4, S1PR5) répartis différemment en fonction des types cellulaires et couplés à différentes protéines G. La S1P active différentes voies de signalisation et génère diverses réponses cellulaires telles que la prolifération, la migration et la survie cellulaire ainsi que l'angiogenèse (Leclercq 2006).

La S1P peut aussi être générée au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique par la sphingosine kinase 2 (SK2) (Chan 2013). Elle agit par l'intermédiaire de ses récepteurs membranaires de manière autocrine ou paracrine (Rosen 2005) ou bien elle peut entrer dans le cytosol par un transporteur CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator) et générer des effets intracellulaires. Enfin, la S1P qui est relativement soluble peut se déplacer dans le cytosol et agir à distance de son site de génération (Hannun 2008).

La S1P peut agir en intracellulaire, mais les mécanismes restent peu connus. A ce niveau, la S1P pourrait activer les canaux calciques entraînant la mobilisation du calcium (Meyer zu Heringdorf 2003). A l'inverse, elle pourrait inhiber NF- κ B et activer Akt (Suomalainen 2005).

La S1P joue un rôle dans le cycle cellulaire et dans la régulation des différentes réponses physiologiques telles que l'angiogenèse et la maturation vasculaire, le développement cardiaque et l'immunité (Spiegel 2003).

1.4.3.5. Tableau de synthèse des différents sphingolipides bioactifs

Ce tableau résume quelques unes des connaissances sur les différents sphingolipides décrits dans la littérature.

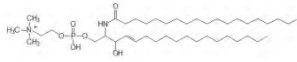
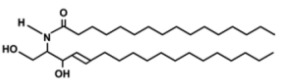
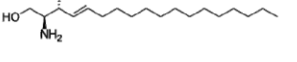
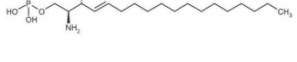
Nom	Abbré	Structure	Localisation	Fonction	Références
Sphingomyéline	SM		Golgi MP (int) gaine myéline cornée	transduction cellulaire activité neuronale	Cremesti 2002 Clarke 2006 Brown 2000 Milhas 2010
Céramide	Cer		MP peau	apoptose différenciation cellulaire prolifération cellulaire interactions cellulaires	Hannun 2008 Zhou 1998
Sphingosine	Sp		MP (int)	apoptose arrêt cycle cellulaire endocytose cytosquelette actine	Siow 2011 Smith 2000
Sphingosine-1-phosphate	S1P		MP (int)	survie cellulaire angiogenèse immunité	Chan 2013 Leclercq 2006 Spiegel 2003

Tableau 4 : Tableau de synthèse des différents sphingolipides bioactifs. (Abbré : abréviation, MP : membrane plasmique, int : feuillet interne).

1.4.4. Le rhéostat sphingolipidique

Le céramide et la S1P ont des effets biologiques opposés puisque le céramide et la sphingosine sont pro-apoptotiques et antiprolifératifs, alors que la S1P est impliquée dans la survie, la prolifération et l'angiogenèse, et inhiberait l'apoptose (Pavoine 2009). Tous ces métabolites sont interconvertibles et plus que leur quantité, c'est le niveau relatif entre céramide et la S1P qui déterminerait le devenir de la cellule (Siegel 2003).



Figure 17: Le rhéostat sphingolipidique. Le Cer et la Sph sont associés à l'arrêt du cycle cellulaire et à l'apoptose alors que la S1P est associée à la survie et à la prolifération cellulaire (d'après Spiegel 2003).

L'augmentation du taux cellulaire de céramide puis de sphingosine secondairement à l'activation de la sphingomyélinase qui hydrolyse la sphingomyéline en céramide, puis de l'activation de céramidase (CDase) qui hydrolyse le céramide en sphingosine ont des effets pro-apoptotiques entraînant l'arrêt du cycle cellulaire (Olivera1999). Les quantités cellulaires de céramide et de sphingosine sont plus importantes que celles de la sphingosine-1-phosphate. Ainsi, la dégradation de faibles quantités de sphingomyéline par la SMase, produit de fortes variations du pool de céramide. De la même manière, une faible diminution des quantités de céramide sous l'effet de la CDase s'accompagne de fortes variations de sphingosine et de très fortes variations de sphingosine-1-phosphate (Hannun 2008). Une signalisation venant interférer avec cette cascade réactionnelle peut faire pencher la balance de ce rhéostat vers l'apoptose. En effet, la S1P peut sous l'effet d'une S1P phosphatase (SPP1 ou SPP2), être convertie en sphingosine puis en céramide, dans la voie de sauvegarde des sphingolipides (Le Stunff 2002).

□

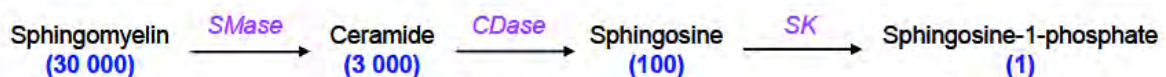


Figure 18 : Proportions relatives des différents sphingolipides dans la cellule. Les quantités de S1P dans la cellule sont très faibles, de l'ordre de quelques nanomolaires, en contre partie l'affinité pour ses récepteurs est très élevée de façon à pouvoir induire une signalisation pour de faibles variations de concentration. Les lipides retrouvés à des concentrations intermédiaires comme le céramide et le diacylglycérol (qui représentent environ 0,1 à 1% des lipides membranaires totaux) agissent sur leur cible avec une affinité moyenne. La sphingomyéline qui est présente en quantité abondante dans la cellule ne semble pas avoir de cibles protéines spécifiques. Par contre des variations abondantes des sphingomyéline peuvent induire des modifications des propriétés physiques et structurales des membranes biologiques (d'après Hannun and Obeid 2008).

Ce rhéostat lipidique est finement régulé, par diverses signalisations qui régulent les enzymes du métabolisme des sphingolipides.

1.4.5. Les enzymes de la voie des sphingolipides

1.4.5.1. Les sphingomyélinases

A ce jour trois catégories de sphingomyélinases ont été identifiées. Ces enzymes sont classées selon leur pH optimal et leur localisation tissulaire et /ou subcellulaires. Les sphingomyélinases (SMases) catalysent l'hydrolyse de la sphingomyéline en céramide et phosphocholine (Levade 1999).

a. La sphingomyélinase acide

La sphingomyélinase acide (aSMase) est une enzyme ubiquitaire qui est localisée au niveau des lysosomes et du feuillet externe des membranes plasmiques.

Du point de vue génique, le gène *smpd1* (SphingoMyéline PhosphoDiestérase) code pour cette enzyme.

Il existe deux formes de aSMases, une forme lysosomale (L-SMase) et une forme sécrétée (S-SMase). Ces deux formes dépendent de la localisation et de la maturation du précurseur commun.

En effet, un pro-précurseur commun à la forme lysosomale et sécrétée est synthétisé puis clivé dans le réticulum endoplasmique pour former un précurseur qui va ensuite subir un début de maturation différentielle qui va se poursuivre au niveau de l'appareil de Golgi.

La forme lysosomale est N-glycosylée, ce qui la protège de la dégradation *via* le lysosome et lui permet un adressage subcellulaire vers cette organelle grâce à la présence d'un mannose-6-phosphate à l'extrémité du motif glycanique (Schissel 1998). Le précurseur est ensuite clivé dans le compartiment lysosomal pour former la aSMase active et mature. Du point de vue fonctionnel, cette enzyme va hydrolyser la sphingomyéline apportée par les vésicules endosomales depuis la membrane plasmique. Son pH optimum se situe entre 4,5 et 5,5 (Marchesini 2004).

La forme sécrétée dans le milieu extracellulaire hydrolyse la sphingomyéline du feuillet externe de la membrane plasmique mais aussi la sphingomyéline présente au niveau des lipoprotéines circulantes, lorsqu'elle est sécrétée dans le secteur vasculaire. Son activité enzymatique est dépendante du zinc (Schissel 1996).

La translocation à la membrane de la aSMase génère du céramide au niveau des rafts lipidiques et participe à la transmission d'une signalisation en réponse à des modifications du milieu extracellulaire. Elle est notamment activée sous l'effet du $TNF\alpha$, des rayons ultraviolets (UV), et des agents chimiothérapeutiques aboutissant à l'apoptose (Rotolo 2005). Un rôle des espèces réactives à l'oxygène (ERO) est également décrit (Castillo 2007).

Une mutation du gène *SMPD1* entraîne un déficit en sphingomyélinase acide à l'origine de la maladie de Niemann-Pick caractérisée par une surcharge lysosomale en sphingomyéline. On distingue deux formes de maladie de Niemann-Pick en fonction des signes cliniques. La forme A qui est une forme neurologique et viscérale à début précoce et la forme B qui est une forme strictement viscérale pour laquelle l'âge de début est variable (Sedel 2007; Vanier 2013).

b. La sphingomyélinase alcaline

Une sphingomyélinase alcaline est exprimée au niveau des entérocytes et de la bile. Cette enzyme hydrolyse la sphingomyéline d'origine alimentaire (Nyberg 1996) et serait impliquée dans les cancers du colon, les pathologies inflammatoires et l'athérosclérose (Duan 2006).

c. Les sphingomyélinases neutres

Les sphingomyélinases neutres (nSMases) sont une famille d'enzymes qui hydrolysent la sphingomyéline en céramide à pH 7,4. Les nSMases Mg^{2+} dépendante sont ubiquitaires chez les mammifères et sont liées à la membrane alors que les nSMases Mg^{2+} indépendantes sont plutôt retrouvées au niveau de la gaine de myéline et dans le cytosol des leucocytes et des cellules musculaires lisses (Levade 1999). Elles peuvent être activées par différents signaux et être à l'origine de signalisation cellulaire variée.

Les nSMases sont activées par de nombreux agents de stress et elles jouent un rôle en physiopathologie. Les nSMases sont impliquées dans l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire mais aussi dans la croissance et le développement (Fig21). Leur rôle dans le cancer, l'inflammation et les maladies neurodégénératives a été mis en évidence (Wu 2010).

Trois types de nSMases ont été identifiées :

La nSMase de type 1 est codée par le gène *smpd2*. Cette enzyme ne semble pas avoir de rôle majeur dans le métabolisme des sphingolipides puisque sa surexpression n'influe pas sur le taux de sphingomyéline, ou de céramide, ni sur la signalisation pro-apoptotique (Tepper 2001).

Les souris *smpd2*^{-/-} ne présentent pas de phénotype particulier, et pas d'accumulation ou d'altération du métabolisme de la sphingomyéline ou des lipides (Zumbansen 2002).

La nSMase de type 2 est codée par le gène *smpd3*. Cette enzyme est ubiquitaire et semble jouer un rôle dans le métabolisme osseux et cartilagineux (Aubin 2005, Stöffel 2007).

La nSMase de type 3 est codée par le gène *smpd4* présentant une faible homologie avec les gènes *smpd2* et *smpd3*. Cette enzyme est dépendante du magnésium et son activité est optimale à pH 7, comme la nSMase1 et nSMase2. La nSMase3 appartient à la famille des « C-tail-anchored integral membrane proteins » (Krut 2006). Localisée au niveau du RE, elle serait impliquée dans la tumorigenèse (Corcoran 2008). Activée par le $\text{TNF}\alpha$, elle s'associe au récepteur du TNF de type 1 (TNFR1) et à la protéine FAN (factor associated with nSMase activation) en réponse au stress cellulaire (Krut 2006).

Sphingomyélinase neutre de type 2

■ Structure

La sphingomyélinase neutre de type 2 a été identifiée en 2000 par homologie avec la nSMase2 bactérienne (Hofmann 2000).

Du point de vue structural, la nSMase2 est une protéine constituée de 655 acides aminés, de 71 kD. Elle présente trois parties : une extrémité C-terminale avec un domaine catalytique, un fragment en triple hélice et une extrémité N-terminale avec deux fragments hydrophobes.

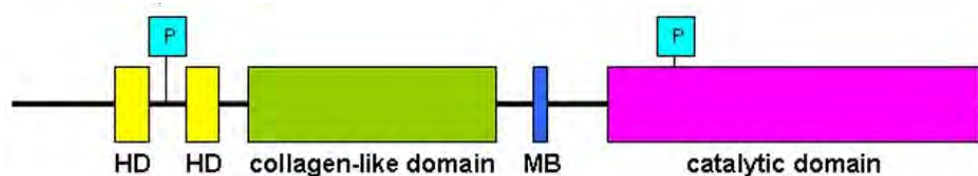


Figure 19: Structure de la nSMase2 humaine (d'après Wu 2010).

Cette protéine présente des résidus cystéine qui sont palmitoylés *via* des liaisons thioesters (Tani 2007). Cette palmitoylation contribue à la stabilité et la localisation de la nSMase2 au niveau de la membrane.

- Localisation et mécanisme d'activation

La nSMase2 se retrouve au niveau de l'appareil de Golgi et plus particulièrement au niveau du feuillet cytosolique (Clarke 2008). Lors de sa stimulation, elle transloque au niveau du feuillet interne de la membrane plasmique au niveau des zones de contact intercellulaire (Clarke 2006).

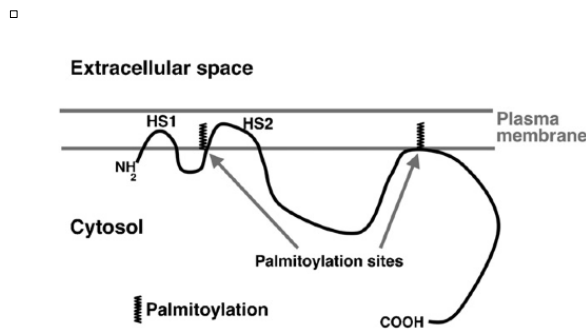


Figure 20: Schéma illustrant la topologie de la nSMase 2 (d'après Tani and Hannun 2007).

Elle hydrolyse préférentiellement des sphingomyélines à chaîne longue à l'origine de la génération de C24 ou C24 :1-céramide (Marchesini 2004).

La nSMase2 peut être activée de manière indirecte par différents agents. La stimulation par le $\text{TNF}\alpha$ ou par des agents de stress induit une translocation de nSMase2 de l'appareil de Golgi à la membrane plasmique (Clarke 2007, Levy 2006). On sait également que la calcineurine régule la phosphorylation de la nSMase2 *via* p38MAPK/PKC qui présente alors une activité catalytique importante (Filosto 2010). Des travaux réalisés par l'équipe ont permis de démontrer que la nSMase2 peut être activée par les métalloprotéases (MMPs) (Augé 2004).

En fin d'activation, un élément important dans la phase de translocation et donc dans la régulation de l'activité de la nSMase2 est son recyclage par les endosomes et son retour dans l'appareil de Golgi (Milhas 2010).

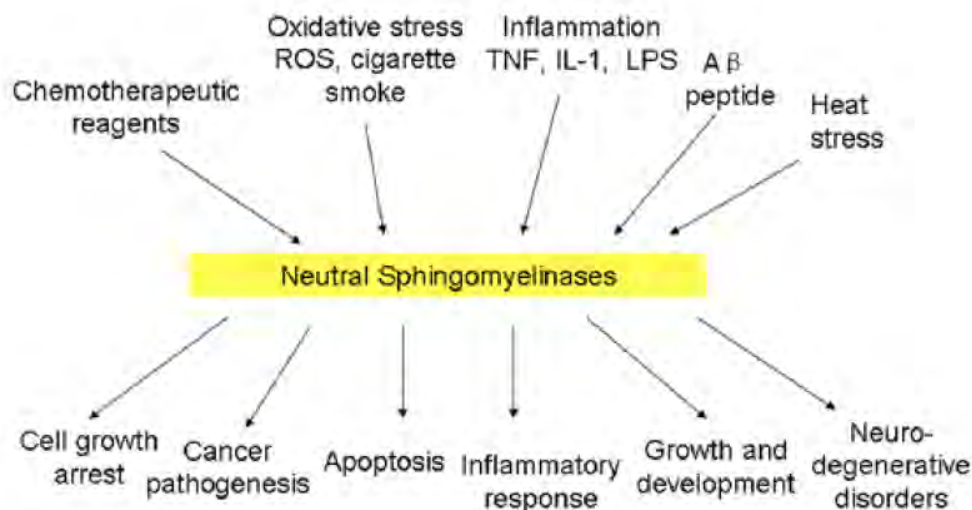


Figure 21: Activateurs de l'activité nSMase et effets biologiques associés (d'après Wu 2010).

1.4.5.2. Les céramidases

Les céramidases entraînent la désacylation du céramide en sphingosine. Ces enzymes présentent des spécificités en terme de localisation, expression et substrats. Il existe trois types de céramidases en fonction de leur pH optimal d'activation : acide, neutre ou alcaline (Mao 2008).

a. La céramidase acide

La céramidase est codée par le gène *ASAH1*. Elle se localise dans les lysosomes. Cette enzyme s'active par autoprotéolyse à pH 4,5.

Du point de vue métabolique, la céramidase acide désacyle les céramides issus de la dégradation des sphingolipides d'origine membranaire, et plus particulièrement les céramides à chaînes moyenne et longue (Gault 2010).

Plusieurs mutations sur le gène *ASAH1* sont à l'origine de la maladie de Farber ou lipogranulomatose (Bashyam 2014) caractérisée par une accumulation de céramide au niveau des lysosomes.

b. La céramidase neutre

La céramidase (CM) est codée par le gène *ASAH2*. Cette enzyme ubiquitaire est retrouvée le plus souvent au niveau de la face externe de la membrane plasmique sous la forme O-glycosyl protéine soluble. Son motif glycanique joue un rôle dans l'interaction de la céramidase neutre avec la membrane plasmique (Gault 2010) où elle intervient dans la régulation de la production de sphingosine et de sphingosine-1-phosphate (Kono 2006).

La CM dégrade préférentiellement des C16, des C18 ou des C18 :1-céramides (Mao 2008). La céramidase neutre est fortement exprimée par les entérocytes de l'intestin grêle et sécrétée au niveau de leur bordure en brosse, et participerait à la digestion des sphingolipides d'origine alimentaires (Kono 2006).

Les souris *ASAH2*^{-/-} semblent présenter un phénotype normal et l'absence d'anomalie ou d'altération tissulaire en céramide, mais une absence de digestion du céramide dans l'intestin (Kono 2006).

c. Les céramidases alcalines

Trois types de céramidases alcalines sont décrites : ACER1, ACER2 et ACER3. Ces trois enzymes présentent de forte homologie de structure (Mao 2008). Comme leur nom l'indique, ces enzymes ont un pH optimal alcalin et sont activées par le calcium (Gault 2010).

ACER1 est codée par le gène *ASAH3*. Elle est exprimée au niveau de l'épiderme. Elle a un pH optimum de 8,5. On la retrouve au niveau du réticulum où elle hydrolyse préférentiellement les céramides à très longue chaîne surtout insaturée, le C24 :1-céramide plus que le C24-céramide. Cette enzyme n'a pas d'action sur les céramides dont le nombre de carbone est inférieur à C18, ni sur le dihydrocéramide ou le phytocéramide qui une forme particulière de céramide que l'on retrouve préférentiellement au niveau de la peau (Mao 2008). Cette enzyme joue un rôle dans l'arrêt du cycle cellulaire et la différenciation des kératinocytes (Sun 2008).

ACER2 est codée par le gène *ASAH3L*. Elle est exprimée principalement au niveau du placenta, mais on en retrouve également dans d'autres tissus. Elle est associée à l'appareil de Golgi. Sur le plan métabolique, elle hydrolyse le C16, C18 ou C20-céramide ainsi que des dihydrocéramides ou des phytocéramides à longue chaîne saturée ou insaturée, et également du C24 et du C24 :1-céramide (Gault 2010). ACER2 serait impliquée dans la prolifération et l'apoptose (Hu 2010).

ACER3 est codée par le gène *PHCA*. Comme ACER2, elle est surtout exprimée dans le placenta. Elle est associée à l'appareil de Golgi et au réticulum endoplasmique. Cette enzyme a une forte affinité pour le phytocéramide mais désacyle également le dihydrocéramide et les céramides ayant des chaînes plus courtes que C20 et insaturées. ACER3 aurait un rôle dans la prolifération et l'apoptose (Hu 2010).

1.4.5.4. Les sphingosines kinases

Il existe deux types de sphingosines kinases. Elles appartiennent à la famille des diacylglycérol kinases (Wattenberg 2006). Ces enzymes diffèrent de part leur séquence, leur activité catalytique, leur localisation et leur fonction. En effet, SK1 serait impliquée dans la prolifération et la survie cellulaire alors que SK2 serait plutôt impliquée dans l'apoptose (Maceyka 2012, Sankala 2005). Ces enzymes sont cytosoliques associées aux membranes, et leur localisation subcellulaire va moduler le métabolisme des sphingolipides (Wattenberg 2006).

La sphingosine kinase 1 est une enzyme cytosolique de 48kD. Elle est exprimée principalement au niveau des poumons et de la rate. Après stimulation, la SK1 migre du cytoplasme vers la membrane plasmique où elle va être phosphorylée par la MAP kinase, ERK2 (Pitson 2003). L'activation de SK1 est générée par différents agonistes tels que hormones, facteurs de croissance (EGF, PDGF, cytokines $TNF\alpha$ et IL-1) (Hannun 2008).

La SK1 est impliquée dans de nombreuses voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire. La sphingosine-1-phosphate générée lors de la phosphorylation de la sphingosine par SK1 a des propriétés anti-apoptotiques (Spiegel 2003).

Les souris *Sph1*^{-/-} n'ont pas de phénotype particulier, elles présentent une diminution importante du taux de S1P dans le sérum (Allende 2004).

La sphingosine kinase 2 présente deux formes : la SK2-S et la SK2-L. Elle est exprimée au niveau du cœur et du foie. Cette enzyme est localisée au niveau nucléaire et péri-nucléaire des cellules (Gault 2010).

SK2 est impliquée dans l'arrêt de la croissance cellulaire et l'apoptose (Strub 2010). Elle participe également à la voie de sauvegarde des sphingolipides en augmentant le taux de céramide (Maceyka 2005).

Les souris *Sph2*^{-/-} ont un phénotype viable mais n'ont pas ou peu de modifications de la concentration sérique de S1P (Kharel 2005). Par contre, les souris doublement invalidées ont un phénotype léthal lié à des altérations des processus de neurogenèse et d'angiogenèse (Mizugishi 2005).

5.4. Tableau de synthèse des différentes enzymes du métabolisme des sphingolipides

	Noms	pH	Distr tiss	Gène	Loc	Glycosyl	VS	Activité	Mutation	Réf
Sphingomyélinases (SMase)	SMase Acide (aSMase)	5 Zn ²⁺ dpt indpt	ubiq	<i>smpd1</i>	lysosomes endosomes MP (ext) serum sécrétée	N-glycanes	ER Golgi	hydrolyse SM en Cer+PC	Niemann Pick (A et B)	Schissel 1998 Sedel 2007 Vanier 2013
	Neutres nSMase 1 nSMase 2 nSMase 3	7,4 Mg ²⁺ dpt	ubiq	<i>smpd2</i> <i>smpd3</i> <i>smpd4</i>	gaine myéline cytosol leucocytes cytosol CML				<i>fro/fro</i> ;CD K	Levade 1999 Wu 2010 Krut 2006 Corcoran 2008
	Alcaline	8,5-9 indpt	IG foie		entérocytes bile	N-glycan	ER Golgi	hydrolyse SM	K colon patho inflr athérosclr	Nyberg 1996 Duan 2006
Céramidases	Acide	4,5		<i>ASAH1</i>	lysosomes				Farber	Hu 2010
	Neutre	7,5 indpt	ubiq	<i>ASAH2</i>	MP (ext) entérocytes	N-glycan O-glycan	ER Golgi			Gault 2010 Kono 2006
	ACER1	8,5		<i>ASAH3</i>	épiderme RE			arrêt cycle cellulaire diff kcytes		Mao 2008 Sun 2008
	ACER2	9		<i>ASAH3L</i>	placenta			prolif cell survie cell		Gault 2010 Hu 2010
	ACER3	9,5		<i>PHCA</i>	placenta RE Golgi			proli cell apoptose		Hu 2010
Sphingosines kinases	Sphingosine kinase 1 (SK1)	6,6-7,5 Mg ²⁺ dpt	ubiq		cytosolique intermbraire sécrétée	non	non classi q	prolif cell survie cell		Hannun 2008 Spiegel 2003
	Sphingosine kinase 2 (SK2)	6,6-7,5 Mg ²⁺ dpt			nucléaire cytoplasmique périnuclaire			apoptose		Gault 2010 Strub 2010

Tableau 5 : Tableau récapitulatif des différentes enzymes du métabolisme des sphingolipides

(Abréviations : Cer : céramide, PC : phosphocholine, CML : cellules musculaires lisses, pH : pH optimum, Distr tiss : distribution tissulaire, Loc : localisation, Glycosyl : site de glycosylation, VS : voie de sécrétion, Réf : références, dpt : dépendant, indpt : indépendant, ubiq : ubiquitaire, IG : intestin grêle, MP : membrane plasmique, ext : feuillet externe, RE : réticulum endoplasmique, cytoplasmique : cytoplasmique, CD : chondrodysplasie, K : cancer, diff kcytes : différenciation kératinocytes, prolif cell : prolifération cellulaire, cell : cellule, patho inflr : pathologie inflammatoire, athérosclr : athérosclérose).

1.4.5. Les sphingolipides dans l'ostéochondrogenèse

Le rôle des sphingolipides dans l'ostéochondrogenèse n'est pas totalement élucidé. Depuis quelques années des travaux cherchent à étudier le rôle des sphingolipides dans ce mécanisme physiologique (Khavandgar 2015).

L'équipe d'Obeid a été la première à démontrer le rôle des sphingolipides dans l'apoptose par l'utilisation de C2-céramide (Herr 2001). De nombreux travaux décrivent le rôle pro-apoptique du céramide dans différents types cellulaires. Récemment, il a été démontré que le céramide avait un rôle de précurseur pour l'hexadecanal qui est également impliqué dans l'apoptose (Chipuk 2012). Ces molécules activent Bak and Bax, régulateurs de l'apoptose qui induisent la libération du cytochrome C des mitochondries et les enzymes impliquées dans l'apoptose, les caspases (Chipuk 2012).

L'équipe de Hill rapporte que le céramide a des effets antagonistes sur les ostéoblastes issus de culture primaire de souris. Le traitement d'ostéoblastes de culture primaire issus de souris par de fortes doses de C2-céramide (2×10^{-6}) induit l'apoptose de ces ostéoblastes alors que le traitement de faibles doses (10^{-7}) augmente la survie cellulaire *via* l'activité de la protéine kinase C (Hill 2010).

Des chondrocytes traités par des doses élevées de C2-céramide (3×10^{-5} à 10^{-4}) meurent par apoptose (chondrocytes d'explants de cartilage articulaire de lapin). Le traitement des cellules préchondrocytaires ATDC5, par le C2-céramide induit l'apoptose de ces cellules mais ne modifie pas l'expression de marqueurs tels que Sox9, Col2a1 et Col10a1 (MacRae 2006). Le traitement par le C2-céramide augmente l'activité des métalloprotéases dans la matrice.

Un rôle du céramide et ses dérivés a été décrit dans l'ostéoclastogenèse (Ersek 2012).

S1P a une activité mitotique dans la formation des cellules osseuses, les ostéoblastes (Grey 2004). La sphingomyélinase, le céramide et la S1P sont des inhibiteurs de la résorption osseuse (Takeda 1998).

L'altération de la fonction de *smpd3*, et de la voie du céramide a des conséquences sur le développement et le remodelage osseux, entraînant une résorption importante osseuse.

Wu observe une disparition ou une perte progressive de la sphingomyéline au cours de la minéralisation induite par les vésicules de minéralisation de la matrice cartilagineuse est probablement due à l'hydrolyse par les sphingomyélinases (Wu 2002).

La sphingomyéline contribuerait à initier le processus de minéralisation par la formation d'espaces hydrophobes dans lesquels le calcium s'associerait au phosphate (Goldberg 1996).

La S1P est impliquée dans la fonction des ostéoblastes. La S1P induit la synthèse de HSP27 (heat-shock protein 27); une chaperone impliquée dans la réponse au stress dans les

préostéoblastes MC3T3-E1. HSP27 régule négativement la synthèse d'ostéocalcine, qui est un marqueur des ostéoblastes fonctionnels (Kato 2011; Kozawa 1999). Des travaux montrent que des cellules préostéoblastiques MC3T3-E1 traitées par de la S1P, la sphingosine ou la sphingosylphosphorylcholine induisent la libération du calcium intracellulaire provoquant une augmentation du taux de calcium cytosolique (Liu 1995; Lyons 2001).

La signalisation de S1P est impliquée dans la migration des ostéoblastes et agit comme chimiorépulsant des préostéoblastes indifférenciés (Roelofsen 2008).

La S1P induit la prolifération des chondrocytes primaires chez le rat (Kim 2006). La stimulation de chondrocytes par la S1P entraîne l'activation de la phospholipase C responsable d'une augmentation importante du calcium cytosolique. La S1P peut également induire l'activation de deux types de kinases : ERK (extracellular signal-regulated kinase) et de p38 kinase dans les chondrocytes.

Au niveau des chondrocytes articulaires, la S1P est impliquée dans la dégradation de la matrice extracellulaire (downregule l'expression d'aggrecan) et la upregulation de VEGF responsable de l'arthrite (Masuko 2012; Masuko 2007).

La S1P contrôle le trafic des précurseurs ostéoclastiques de la circulation sanguine vers les cavités de la moelle osseuse (Ishii 2013). Deux récepteurs de S1P jouent un rôle important dans ce processus, S1PR1 et S1PR2. S1PR1 participe au chimiotactisme de S1P dans la moelle osseuse, où la concentration de S1P est faible et S1PR2 participe au chimiotactisme négatif de S1P vers la circulation sanguine, où la concentration de S1P est élevée (Ishii 2013; Khavandgar 2015).

Lotinum et coll. montrent que S1P sécrétée induit la différenciation des précurseurs ostéoblastiques en ostéoblastes fonctionnels et donc augmente la formation osseuse (Lotinum 2013). Quint et coll. montrent au cours du remodelage osseux que la S1P synthétisée par les ostéoclastes stimule la migration des ostéoblastes. Cette migration cellulaire se fait *via* S1PR1 et S1PR2 qui activent les voies de signalisation JAK/STAT3 et FAK/PI3K/AKT (Quint 2013). Une étude plus récente montre que la calcitonine participe à la résorption osseuse en régulant la libération de la S1P par les ostéoclastes (Keller 2014).

Les effets majeurs du céramide et de la S1P sur les chondrocytes, les ostéoblastes et les ostéoclastes sont résumés dans la figure 22 (Fig22) (Khavandgar 2015).

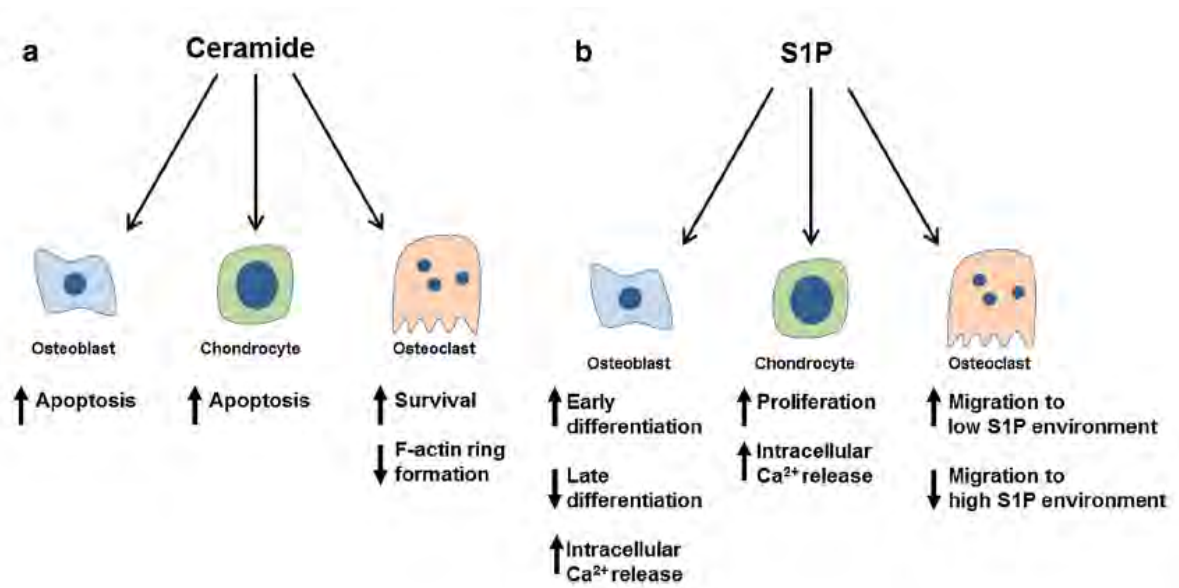


Figure 22: Effets principaux du céramide (A) et la S1P (B) sur les chondrocytes, les ostéoblastes et les ostéoclastes. Les flèches vers le haut indiquent une activation et les flèches vers le bas indiquent une inhibition (d'après Khavandgar 2015).

1.5. SPHINGOLIPIDES ET OS : Phénotype des souris *fro/fro* et *smpd3* KO

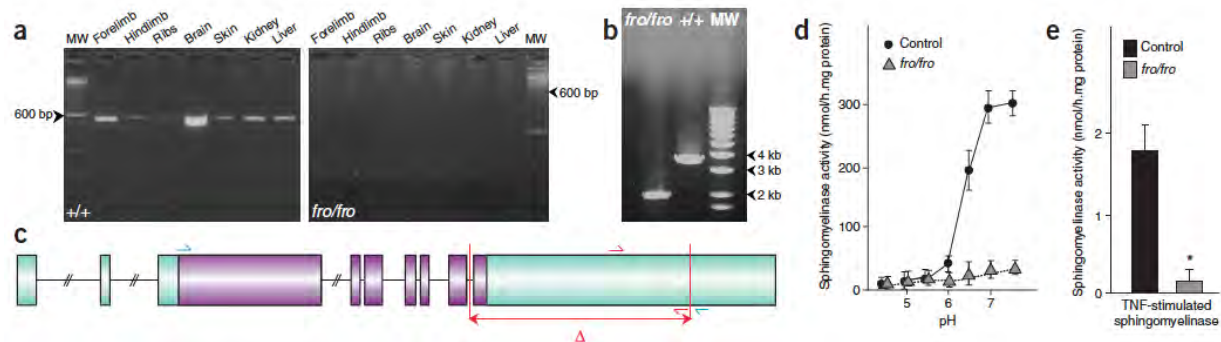
1.5.1. Souris Fragilitas ossium (*fro/fro*)

1.5.1.1. Historique

La souris *fro/fro* a été produite il y a une trentaine d'année par l'équipe de Jean-Louis Guénet à l'Institut Pasteur à Paris, sur des souris de souche génétique 126SV traitées par le tri(1-aziridinyl phosphine-sulfide), une molécule pharmacologique utilisée dans les thérapies anti cancéreuses sous le nom commercial Thiotepa®. La mutation *fro/fro* correspond à une mutation autosomale récessive (Guénet 1981). Initialement, la mutation avait été dénommée *fld/fld* pour fore-limb defect (Guénet 1975).

1.5.1.2. Mutation du gène *smpd3*

En 2005, le groupe de J.L Guénet a mis en évidence que le phénotype de la souris fragilitas ossium était lié à la mutation du gène *smpd3* (Aubin 2005). Cette mutation correspond à une délétion de 1758 pb sur l'intron 8 et l'exon 9 qui a pour conséquence un remaniement de la partie 3' du gène *smpd3* codant pour la sphingomyélinase neutre de type 2. L'apparition du codon stop induit la substitution des 33 derniers acides aminés incluant un résidu histidine responsable de l'activité catalytique de l'enzyme. Ceci entraîne la synthèse de l'enzyme non fonctionnelle (Aubin 2005).



1.5.1.3. Phénotype de la souris *fro/fro*

La souris *Fragilitas ossium* ou *fro/fro* est caractérisée par une fragilité osseuse, un taux de mortalité néonatale élevé (proche de 90%) et un nanisme. Cette souris présente des déformations au niveau des os longs des quatre membres (Muriel 1991). Le tibia est l'os le plus déformé (Sillence 1993). La souris présente également des déformations au niveau des os du bassin (os iliaques). Cependant aucune déformation n'est observée au niveau des os courts (queue, côtes, phalanges).

Sur un plan radiologique, les os longs sont courts, déformés et courbes. Les diaphyses sont élargies et translucides par rapport aux souris *wt*, avec la présence de petites zones irrégulières de densité osseuse qui correspondent à des cals osseux. Les corticales sont amincies et irrégulières (Muriel 1991). Les diaphyses des tibias déformés présentent une angulation caractéristique (Sillence 1993).

Histologiquement, les métaphyses des nouveaux-nés sont principalement constituées de cartilage. D'après Muriel, cette particularité est probablement due au retard du développement osseux (Muriel 1991).

La souris *fro/fro* présente au niveau du cartilage de croissance une zone de chondrocytes plus importante que chez les souris sauvages. Chez des souriceaux âgés de un jour, la zone hypertrophique chez les souris *wt* comprend 12 à 17 chondrocytes d'épaisseur contre 42 à 52 chondrocytes d'épaisseur chez la souris *fro/fro* (Sillence 1993).

Au niveau cranio-facial, la souris *fro/fro* présente également une « *dentinogenesis imperfecta* » avec une malformation au niveau des os maxillaires (Opsahl 2005). Ce groupe a pu montrer d'une part une diminution de la prolifération cellulaire au niveau de la couche épithéliale de la muqueuse buccale, et d'autre part, une diminution de la croissance des incisives mandibulaires associée à un défaut de minéralisation de sa partie linguale près de l'apex. Chez des souriceaux de un jour, la taille des incisives mandibulaires des *fro/fro* est deux fois moins grande que celles des souris sauvages (Goldberg 2008). L'édification des apex de ces dents est diminuée voir arrêté. Les cuspides des molaires présentent un défaut de prolifération cellulaire et des racines bulbeuses (due à une surproduction de ciment) avec la présence d'oblitérations au niveau de la chambre pulpaire (Opsahl 2005).

Des études immunohistochimiques mettent en évidence une diminution significative de l'expression de la dentine sialoprotéine au niveau des incisives et des molaires, et de l'amélogénine au niveau des incisives des souris *fro/fro* par rapport aux souris sauvages.

Cependant aucune différence n'est décrite dans l'expression d'ostéonectine et d'ostéopontine. Les travaux du groupe de JL Guenet (Aubin 2005) montrent que la souris *fro/fro* présente une hypominéralisation au niveau des dents et de l'os l'alvéolaire.

Les mandibules des souris *fro/fro* présentent une diminution du nombre et de l'épaisseur des trabécules par rapport aux souris *+/fro* (Goldberg 2008).

La souris *fro/fro* est un modèle de fragilité osseuse sans anomalies de collagène. En effet, la souris *fro/fro* ne présente aucun défaut en collagène de type I et II (Muriel 1991; Sillence 1993). Quand un animal affecté survie, il demeure petit et déformé tout au long de sa vie (Muriel 1991).

1.5.1.4. Corrélation en physiopathologie humaine

La souris mutante *fro/fro* est décrite comme présentant un phénotype proche de l'ostéogénèse imparfaite humaine (Kamoun-Goldrat 2007). La souris *fro/fro* est le seul modèle murin d'ostéogénèse imparfaite non collagène-dépendante. D'après Sillence, le phénotype de la souris *fro/fro* est comparable à l'ostéogénèse imparfaite de type II sous-groupe A humaine ou de type III (Sillence 1993).

L'équipe de Michel Goldberg décrit, chez les mutants, un phénotype de dentinogénèse imparfaite, manifestation clinique que l'on retrouve fréquemment mais de manière inconstante chez les patients atteints d'ostéogénèse imparfaite (Goldberg 2008; Aubin 2005).

1.5.2. Souris *smpd3* knock-out

1.5.2.1. Historique

La souris knock-out pour *smpd3* a été développée par le groupe de Stöffel à Cologne (Stöffel 2005), qui avait également cloné *smpd3* et caractérisé la nSMase2 au début des années 2000 (Hofmann 2000), ainsi que *smpd1* qui code pour la sphingomyélinase acide (Newrzella 1992).

1.5.2.2. Mutation *smpd3*^{-/-}

Ce modèle a été généré par un knock-out dans des cellules embryonnaires murines CJ7 obtenu par l'insertion *via* électroporation d'une cassette néo au niveau de l'exon 1 du gène

smpd3. L'exon 1 code pour les domaines transmembranaires et une partie catalytique de la nSMase2. Un croisement est ensuite réalisé entre des souris de souche génétique C57BL/6 et des souris de souche génétique 129SV.

La souris *smpd3* KO possède une activité nSMase résiduelle liée à *smpd2* mais il n'y a pas d'accumulation de sphingomyéline ou de cholestérol contrairement à la souris *smpd1*^{-/-} (Otterbach 1995).

1.5.2.3. Phénotype de la souris *smpd3* knock-out

Le phénotype de la souris *smpd3*^{-/-} se caractérise par un retard de croissance qui débute au 14ème jour du développement embryonnaire et persiste jusqu'à l'âge de 2 ans. Les os longs présentent une hypominéralisation osseuse associée à des déformations et un nanisme. L'ossification des corticales est retardée (Stöffel 2007).

Le retard de croissance affecte tous les organes à l'exception du cerveau et touche particulièrement l'axe hypothalamo-hypophysaire. Ce défaut de l'axe pituitaire entraîne une baisse de la sécrétion des facteurs hormonaux tels que l'insuline growth factor 1 (IGF-1) et l'hormone de croissance (GH). On observe également un déficit de la maturation des organes sexuels et un nanisme (Stöffel 2005). La nSMase2 participerait au mécanisme de vésiculation au niveau de l'appareil de Golgi et son absence bloquerait la voie de sécrétion des hormones sexuelles au niveau neuronal.

L'équipe de Stöffel a étudié la densité osseuse chez des souris âgées de 2, 7 et 20 mois. Ils rapportent que la densité osseuse est plus importante chez la souris *smpd3*^{-/-}. La malformation osseuse semble être, dans ce phénotype, liée à un défaut au niveau du cartilage de croissance. Les études histologiques montrent que les chondrocytes sont organisés en paquets irréguliers. De plus le collagène et les trois protéines matricielles non collagéniques telles que COMP, matriline et l'osténectine sont disposées de manière anarchique (Stöffel 2007).

Au niveau des os longs, la souris *smpd3* KO présente un retard d'ossification de croissance avec des déformations des articulations et des diaphyses. Aucune fracture osseuse n'est décrite. Ce défaut au niveau osseux serait dû à un défaut de maturation des chondrocytes. L'expression d'ADNc codant pour la nSMase2 dans le promoteur du collagène2A1, spécifique des chondrocytes, permet de restaurer un phénotype normal.

Au niveau des cartilages de croissance, le groupe de Stöffel montre une désorganisation cellulaire caractérisée par des chondrocytes de petite taille et des colonnes de chondrocytes hypertrophiques réduites (Stöffel 2007).

Aucune différence des tissus périostal et endostal n'est décrit (Stöffel 2007).

Au niveau cranio-facial, la souris *smpd3*^{-/-} présente une tête large disproportionnée. Cependant au niveau dentaire, contrairement à la souris *fro/fro*, la souris *smpd3*^{-/-} ne présenterait pas de dentinogenèse imparfaite. Les incisives ne présentent pas d'anomalie de formation, aucune fracture ou formation de cal n'est observé (Stöffel 2007).

1.5.2.4. Corrélation en physiopathologie humaine

D'après l'équipe de Stöffel, la souris KO pour *smpd3* est à rapprocher des chondrodysplasies associées à un nanisme et notamment des formes plus communes d'achondrodysplasie humaine (Stöffel 2007).

1.5.3. Comparaison des modèles murins *fro/fro* et *smpd3*^{-/-}

Ces données résument les connaissances actuelles sur les phénotypes des souris *fro/fro* et *smpd3*^{-/-} (Tableau 6).

Caractéristiques	<i>fro/fro</i> (Aubin 2005, Muriel 1991, Guénet 1981, Sillence 1993, Opsahl 2005)	<i>smpd3</i> -KO (Stoffel 2005, Stöffel 2007)
Gène	<i>smpd3</i>	<i>smpd3</i>
Protéine	nSMase2	nSMase2
Souche Génétique	129/SV	C57BL/6×129/SV
Mode de transmission	autosomale récessive	autosomale dominante
Taille	nanisme	nanisme
Os Longs	courts courbure tibia constant fragilité osseuse	courts et courbes fragilité osseuse
Os courts	inchangés	inchangés
Cartilage de croissance	élargissement de zone hypertrophique	diminution de zone hypertrophique
Ossification	retardée	retardée
Os Cortical	amincie irrégulière	
Os Trabéculaire	diminution nombre des trabécules diminution de épaisseur des trabécules	épaissi aspect irrégulier peu calcifié
Epiphyse	normale	élargie
Diaphyse	courte incurvation/angulation plus large translucide RX présence de cal osseux	déformée
Métatarse	inchangé	inchangé
Phalange	inchangée	inchangée
Colonne vertébrale	scoliose, cyphose	cyphose
Cage thoracique	11 paires de côtes	tronc long et étroit
Cranio-facial	dentinogenèse imparfaite malformation os maxillaires	tête disproportionnée large
Pathologie	OI et DI	chondrodysplasie
Démarche	démarche dandinante	NS
Viabilité périnatale	faible (10%)	NS
Durée de vie	normale	NS
Fertilité	normale ambiguïté sexuelle	défaut de maturation sexuelle
Comportement	hyperactive	NS

Tableau 6 : Tableau de comparaison des modèles murins *Fragilitas ossium* (*fro/fro*) et *smpd3*-knock-out (*smpd3*^{-/-}). (NS : non significatif).

Ces observations montrent que les phénotypes de la souris *fro/fro* et *smpd3*^{-/-} présentent des similitudes dans leur phénotype. Ces souris présentent un nanisme avec une forte mortalité périnatale, une fragilité osseuse et de multiples fractures. Ces deux modèles sont caractérisés par des malformations au niveau des os longs (humérus, tibias notamment). Tous deux ont une

incurvation caractéristique au niveau des tibias (Fig 25). Cette angulation pourrait être la cause de fractures multiples dues à la fragilité osseuse. Sur le plan histologique, il y a une discordance sur la description de la plaque de croissance. En effet, Guénet décrit chez la souris *fro/fro* un élargissement de la zone hypertrophique alors que Stöffel décrit une réduction de la zone hypertrophique chez la souris *smpd3*^{-/-}. En ce qui concerne la dentinogenèse, nous ne pouvons comparer l'aspect des dents chez les souris ^{-/-} en période néonatale.

Ces deux modèles présentent cependant des phénotypes très proches caractérisés par l'existence d'une chondrodysplasie, suggérant un rôle des sphingolipides dans l'ostéochondrogenèse.

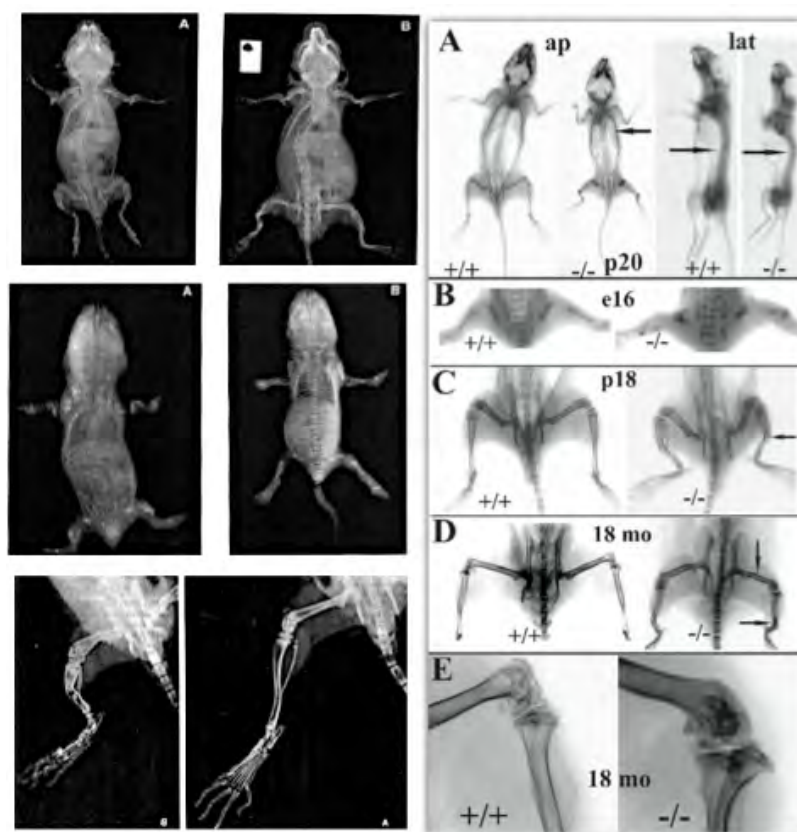


Figure 24 : Données radiologiques des phénotypes *fro/fro* (A) et *smpd3*^{-/-} (B). (A) Clichés radiologiques de souris *fro/fro* âgés de 15 jours (à gauche) et de 45 jours (à droite). (B) Comparaison radiologiques de souris *+/+* et *-/-* âgées de 18 mois (Guénet 1981 ; Sillence 1993 ; Stöffel 2007).

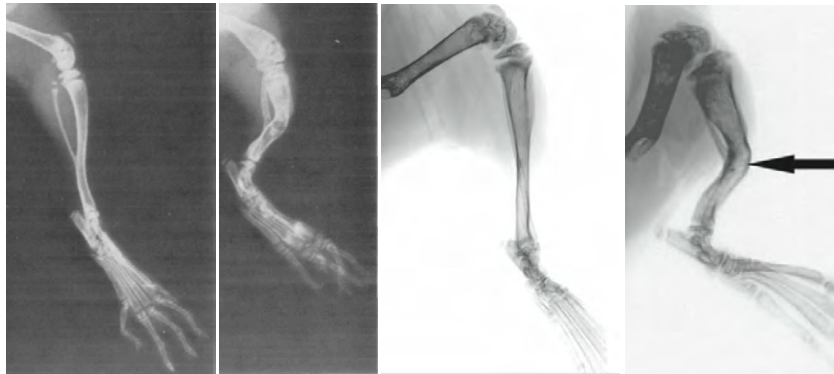


Figure 25: Focus sur la morphologie des tibias des souris fro/fro (A) et smpd3^{-/-} (B).

2. OBJECTIFS DE LA THESE

Les sphingolipides sont des constituants majeurs des structures cellulaires, et ce sont également des seconds messagers impliqués dans l'apoptose, la prolifération cellulaire et la différenciation cellulaire en particulier au cours de l'embryogénèse, et de l'homéostasie tissulaire. La nSMase2 est une enzyme-clé du métabolisme des sphingolipides, car elle représente la première étape de dégradation de la sphingomyéline, et la génération de céramide. Cette enzyme présente au niveau du feuillet interne des membranes plasmiques et de l'appareil de Golgi est impliquée dans différentes réponses cellulaires telles que l'inflammation, la migration et la prolifération cellulaire, ainsi que l'apoptose bien que son rôle dans ce domaine reste actuellement débattu.

Les SL sont impliqués dans un certain nombre de pathologies comme les maladies cardiovasculaires, le cancer, les maladies métaboliques et infectieuses. Leur implication dans le métabolisme osseux est de description récente, et est basée sur le phénotype de souris soit mutante pour *smpd3* (souris *fro/fro*), soit sur le phénotype de la souris knock-out pour *smpd3*.

En effet, la mutation *fro/fro* (souris "fragilitas ossium") (Aubin 2005), ou le knock-out du gène *smpd3* qui code pour la nSMase-2 (Stöffel 2005), présentent un phénotype caractéristique avec un sévère retard de croissance à la naissance et une ostéogénèse anormale. Les souris *fro/fro* sont naines et présentent une ostéochondrodystrophie et une hypominéralisation osseuse associées à une mortalité néonatale élevée (Aubin 2005). Les souris *smpd3*-KO sont naines et présenteraient une chondrodysplasie néonatale (Stöffel 2005). Ces modèles animaux suggèrent un rôle pour les sphingolipides dans le développement osseux pendant la période fœtale et néonatale. Les travaux actuels réalisés par le groupe de Murshed (Khavandgar 2011), montrent que la mutation de nSMase2 résulte en une diminution de la minéralisation des ostéoblastes qui pourrait être (en partie) à l'origine de la pathologie osseuse de type "osteogenesis imperfecta". A côté de ce défaut de minéralisation, ce groupe montre une accumulation de chondrocytes hypertrophiques et un déficit d'apoptose (qui est le stade terminal de la différenciation des chondrocytes hypertrophiques). Ce retard d'apoptose pourrait contribuer à la malformation de la plaque de croissance et à la chondrodysplasie observée chez ces souris, car l'apoptose des chondrocytes hypertrophiques, est nécessaire à l'invasion des ostéoblastes, et à la formation de l'os endochondral.

Le groupe de Murshed montre par ailleurs que la correction de la mutation chez la souris *fro/fro* par introduction d'un plasmide codant pour SMase2 restaure en grande partie le défaut d'OI. Ces corrections appuient le rôle de nSMase dans l'ostéochondrogenèse mais le mécanisme fonctionnel et spatio-temporel n'est pas connu.

L'objectif général de ce travail de thèse a été d'étudier l'implication de la nSMase2 et la voie des SL dans l'ostéochondrogenèse.

Nos travaux sont subdivisés en trois parties :

1. Etude de l'implication de la nSMase2 dans l'apoptose induite par la privation en nutriments dans les fibroblastes et les chondrocytes en culture
2. Etude du rôle de la sphingomyélinase neutre de type 2 dans la différenciation et la maturation des chondrocytes chez la souris *fro/fro*
3. La mutation *smpd3* s'accompagne d'un phénotype campomélique chez la souris *fro/fro*

3. MATERIELS et METHODES

3.1. PRODUITS ET REACTIFS

Le DMEM 1X contenant le GlutaMAX™-1, 4,5 g/l D-glucose, sans pyruvate (61965-026), le DMEM 1X (+) L-Glutamine, (-) D-glucose, (-) Sodium Pyruvate (11966-025), et le Mix-F-12 GlutaMAX-1 proviennent de Gibco Life Technology. Le DMEM High glucose 4,5 g/l avec sodium pyruvate et glutamine (E15-892), le F-12 Nut Mix (1X) + GlutaMAX™-1 (31765-027), le RPMI 1640 avec glutamine (E15-885) viennent de GE Healthcare. Le Phosphate Buffered Saline (PBS) et l'albumine bovine (A4503) sont fournis par Euromedex. Enfin la Trypsine EDTA 1X (L11-004) vient de chez PAA et la collagénase D (1108886601) est de chez Roche.

La perphenazine, le FTY720, l'acide okadaïque (04511), la rapamycine (37094), le GW4869 (D1692) et la solution d'H₂O₂ (216763) proviennent de Sigma Alrich. Le BMP2 (recombinant human bone morphogenetic protein 2) vient de Gibco by Life technologies. Le C2 Ceramide est de chez Biomol. Le Dimethyl sulfoxide (DMSO) (34943) est de Riedel-deHaën. Le Hyaluronan High Molecular Weight provient de chez R&D Systems.

Les anticorps primaires tels que anti-ATF6 rabbit (ab37149), anti-col2a1 rabbit (ab21291), anti-col X rabbit (ab58632), anti-CD31 rabbit (ab28364), anti-HIF1 α rabbit (ab51608), anti-LC3 rabbit (ab63817), anti-runx2 mouse (ab76956), anti-sox9 rabbit (ab71763), anti-VEGF rabbit (ab46154) proviennent de chez ABCAM. Les anticorps anti-pAkt mouse (Ser473) (#4051), anti-PP2A B subunit rabbit (#4953) et anti-ULK1 phospho (Ser757) rabbit (#6888) sont fournis par Cell Signalling. Les anticorps anti-CHOP mouse (#2895), anti-Grp78 rabbit (sc-13968), anti-GADD rabbit (sc-575), anti-HAS2 mouse (sc-365263), anti-N-SMase2 mouse (sc-166637), anti-phospho-PP2A (Tyr 307) goat (sc-12615), et anti-ULK1 rabbit (sc33182) sont de Santa Cruz Biotechnology. Les anticorps anti-active caspase3 rabbit (559565) et anti-CD31 mouse (553370) sont de BD Pharmingen. L'anti-sox9 rabbit (#AB5535) est de Millipore. Les anti-Hsp72/73 mouse mAb (Ab-1) et Hyaluronan Binding Protein (HABP) sont de Calbiochem. L'anticorps anti-MMP13 rabbit (NBP 1-45723) vient de Novus Biologicals). Les anticorps secondaires utilisés sont le goat anti-mouse IgG (ref 003-F2633NH) (Diagomics), goat anti-rabbit G HRP (sc-2030), goat anti-mouse IgG (sc-2031) (Santa Cruz) et la Streptavidin, Alexa Fluor 488 conjugate (Molecular Probes).

Le paraformaldéhyde 32% (15714) est fournis par Euromedex et le Triton® X-100 (T8787) par Sigma Aldrich. L'Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit (A11008), Alexa Fluor® 546 goat anti-mouse (A11003), Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit (A11008) (Life Technologie), Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse (A11001), Alexa Fluor® 546 goat anti-rabbit (A11010) sont fournis par Life Technologie. L'Alexa Fluor® 488 rabbit anti-goat (A11078) vient de chez Molecular Probes et l'Alexa Fluor® 546 rabbit anti-mouse (A11060) de chez Invitrogen.

L'Orange G Certistain® (C.I. 16230) vient de chez Merck. L'Eosine G 1% (C0363), le Nuclear Fast Red selon Ganther o Kernechtrot (C0481) et le Papanicolaou Harris Hematoxyline (nuclear stain) (C0572), le carbonate de lithium (M00187) proviennent de chez DiaPath. Hematoxyline de Le Mayer Dako (Lillie's modification) (S3309), le milieu de montage fluorescent Dako (S3023) et le milieu de montage glycergel Dako (C0563) sont de chez Dako. Le rouge Alizine (A5533) vient de Sigma Alrich. Enfin le milieu de montage Eukitt® provient de O. Kindler GmbH.

3.2. ANIMAUX

Les souris *fro/fro* et les souris sauvages sont issues d'une souche commune de souris 129/SV. Les souris *fro/fro* présentant une délétion du gène *smpd3* sont génotypées par PCR en utilisant les primers suivants : d 5'-GCCCGCAGCCATGTATAGTA-3', 5'-CTCAATGGAGGGCACACAG-3' et 5'-CAGGTTTAGGGACCCTGACG-3'. Les souris sont livrées et hébergées à l'animalerie UMS US006/INSERM (site Sanofi) thermo régulée à 22±2°C, dans des conditions stériles en portoirs ventilés, et sont soumis à un cycle jour/nuit de 12h/12h. Toute la procédure expérimentale a été approuvée par le comité de santé et des soins des animaux de l'INSERM et par le ministère français de l'agriculture et de la forêt (autorisation expérimentation animale N°3309004). Le protocole expérimental « Rôle de la sphingomyélinase neutre dans l'ostéochondrogenèse » est le suivant : 12/1048/10/14 avec une demande d'autorisation de projet n° DAP 2014 72.

3.3. PRELEVEMENT d'EMBRYONS

Les souris gestantes à différents stades de développement embryonnaire (E12 à E17) sont anesthésiées avec un mélange kétamine/xylazine (4/1) et sacrifiées par élongation cervicale. Après désinfection du bas ventre avec de l'alcool à 70%, une laparotomie médiane permet de mettre en évidence et extraire les cornes utérines contenant le « chapelet » de fœtus. Une section au niveau des trompes utérines (chaque extrémité du « chapelet ») pour mettre les cornes utérines dans une boîte de Pétri contenant du PBS 1X. Chaque fœtus est séparé des autres en sectionnant entre chaque sac la membrane. Après l'extraction du fœtus, le cordon ombilical est sectionné et rincé au PBS 1X.

3.4. CULTURES CELLULAIRES

3.4.1. Fibroblastes murins

Les cultures primaires de fibroblastes sont obtenues à partir de biopsies cutanées de nouveaux-nés sauvages et *fro/fro*. Les échantillons cutanés sont désépaissis et placés face dermique vers le bas dans des boîtes de Pétri. Après 15 minutes de contact avec les boîtes, du milieu DMEM (Gibco) contenant 20% de sérum de veau fœtal (SVF), pénicilline, streptomycine et amphotéricine B est ajouté. Après 1 à 3 semaines de culture à 37°C à 5% CO₂, les cellules sont spontanément immortalisées. L'activité nSMase2 basale reste stable dans les fibroblastes immortalisés issus de souris sauvages et *fro/fro*. Les cellules sont cultivées en routine dans du milieu DMEM supplémenté à 10% de sérum de veau fœtal (SVF).

3.4.2. Cellules souches mésenchymateuses murines

Les cellules souches mésenchymateuses sont issues de la moelle osseuse extraite à partir des os longs (fémur, tibia), de souris sauvages et *fro/fro*, dans les conditions décrites par Van Vlasselaer et coll. (1994). Les cellules sont cultivées à 37°C dans un milieu α -MEM supplémenté avec 10 % de serum de veau fœtal et 100 U/ml pénicilline, 100 μ g/ml de streptomycine, 0,3 μ g/ml d'amphotericine B, 5 μ g/ml de gentamycine et 2 mM de L-glutamine.

La différenciation chondrocytaire est induite par un milieu de différenciation chondrogénique (mesenchymal stem cells medium kit, ref GUXMX-03041-194) (Clinisciences), ITS (insulin transferine selenium), acide ascorbique, dexaméthasone, sodium pyruvate, proline (Cyagen Oricell™).

3.4.3. Cellules chondrocytaires costales

Après sacrifice des animaux et dissection, la cage thoracique est placée dans un tube contenant du PBS stérile puis lavée 3 fois avec du PBS. Les cages thoraciques sont digérées dans une solution contenant 20mL de collagénase D à 3mg/mL pendant 1h30 à 37°C. Après agitation avec une pipette de 25mL, les explants sont passés dans une nouvelle boîte puis incubés dans une solution contenant 20mL de collagénase D à 5mg/mL et DMEM pénicilline-streptomycine et glutamine sans sérum de veau fœtal toute une nuit à 37°C. La suspension est transvasée dans un tube de 50 mL et complétée par du milieu complet. Les cellules osseuses sont séparées et dissociées par passage successif avec une pipette de 25, 10, 5 et 2 mL puis

avec une pipette Pasteur. Les cellules sont ensuite suspendues dans 10 mL de DMEM contenant sérum de veau fœtal et filtrées dans un tamis de 70µm. Les cellules sont comptées puisensemencées dans des boîtes de Pétri de 100 mm à une concentration de 1 million de cellules par boîte contenant 10 mL de DMEM contenant pénicilline-streptomycine, glutamine et 10% de sérum de veau fœtal puis placées dans une étuve à 37°C. Après 24h, les cellules ont adhéré et le milieu est changé tous les 2 jours jusqu'à confluence.

3.4.4. Cellules chondrocytaires de têtes fémorales

Après sacrifice des animaux et dissection des pattes arrières, les têtes fémorales sont prélevées et placées dans un tube contenant du PBS 1X stérile, lavées 3 fois. Les prélèvements sont placés dans une boîte de Pétri de 35mm et digérés dans 7 mL de collagénase D à 3mg/mL pendant 1h30 à 37°C.

La suspension est transvasée dans un tube de 50 mL contenant du milieu DMEM avec 10% de sérum de veau fœtal. Les cellules sont séparées par passage successif dans des pipettes de 25, 10, 5 et 2 mL et une pipette Pasteur et sont mises en suspension dans 10 mL de milieu. La solution est ensuite filtrée avec un tamis de 70µm. Les cellules récupérées sont comptées puisensemencées dans des boîtes de Pétri de 100mm à une concentration de 1 million de cellules par boîte dans 10 mL de DMEM et laissées 24h dans l'incubateur. Le milieu est ensuite changé tous les 2 jours jusqu'à confluence.

3.4.5. Cellules souches mésenchymateuses de lignée : C3H/10T1/2

Les cellules souches mésenchymateuses murines C3H/10T1/2 clone 8 ou CCL-226 (nom commercial) ont été obtenues de American Type Culture Collection ATCC (Manassas, USA) (LGC Standard). Les cellules sont cultivées dans un milieu DMEM supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal, 100U/ml pénicilline et 100µg/ml de streptomycine.

Les cellules sont cultivées en 2D ou en 3D (pellets).

- Pour les cultures en monolayer, les cellules sontensemencées dans des boîtes de Pétri de 100mm.
- Les cellules sont cultivées sous forme de pellets. Après avoir scrappé les cellules dans leur milieu de culture, les cellules sont centrifugées à 1000tr/min pendant 10 minutes. Le surnageant enlevé, les cellules sont mises en solution dans le milieu de différenciation chondrogénique puis reparties dans des tubes de 15ml et centrifugé 5min à 900tr/min.

3.4.6. Cellules pré chondrocytaires de la lignée : ATDC5

Les cellules pré-chondrocytaires ATDC5 (données par le Dr J Guicheux, INSERM, Nantes), sont cultivées dans un milieu contenant 50% DMEM avec pyruvate / 50% F-12 avec GlutaMAX1, 5% sérum de veau fœtal, 100U/ml pénicilline et 100µg/ml de streptomycine. La différenciation est faite dans un milieu 50% DMEM avec pyruvate / 50% F-12 avec GlutaMAX1 contenant 5% sérum de veau fœtal, (insuline transferrine selenium) (ITS), dexaméthasone et acide ascorbique.

3.4.7. Cellules pré ostéoblastes de lignée : MC3T3-E1

Les cellules pré-ostéoblastiques MC3T3-E1 (mouse calvaria derived cell line) ont été obtenues du CDC (Atlanta). Les cellules MC3T3-E1 sont cultivées à 37°C en milieu α -MEM supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal et 100U/ml pénicilline et 100µg/ml de streptomycine.

3.5. COLORATIONS HISTOLOGIQUES

3.5.1. Coloration Hématoxyline Eosine

Les échantillons sont déparaffinés par passage dans trois bains successifs de xylène, puis réhydratés dans 3 bains d'éthanol à 60%, 80% et 100%. Les échantillons sont mis en contact pendant 5 minutes avec l'hématoxyline de Mayer, rincés puis plongés dans une solution de carbonate de lithium pendant 15 secondes. Les échantillons sont ensuite mis en contact avec une solution éosine-orangeG pendant 2 minutes. Enfin les échantillons sont déshydratés par trois bains successifs d'éthanol à 60%, 80% et 100% 5 minutes chacun puis dans trois bains successifs de xylène de 5 minutes.

3.5.2. Coloration Bleu Alcyan

Les échantillons déparaffinés et réhydratés sont incubés dans une solution de Bleu Alcyan Tetrakis à 0,1% dans une solution 0,1M d'HCl à pH 1 pendant 20 minutes à température ambiante. Les échantillons sont ensuite mis en contact avec une solution rouge nucléaire (red fast nuclear) pendant 5 minutes puis rincés et déshydratés avant de mettre une lamelle.

3.5.3. Coloration de Von Kossa

Les échantillons sont déparaffinés, réhydratés, rincés à l'eau courante, puis incubés dans une solution de nitrate d'argent à 1% et placés sous UV A, pendant 20 minutes. Après rinçage à l'eau distillée, les échantillons sont incubés dans une solution de thiosulfate de sodium à 5% pendant 5 minutes. Une contre-coloration avec du rouge nucléaire (nuclear fast red) pendant 5 minutes puis un rinçage à l'eau distillée est réalisé. Enfin les échantillons sont déshydratés dans des bains d'éthanol puis de xylène.

3.5.4. Coloration au Rouge Alizarine

Les cellules après différenciation sont fixées dans de l'éthanol froid à 70% pendant 1h. Après rinçage avec de l'eau distillée, les cellules sont incubées dans une solution de rouge d'alizarine (40mM, pH 4,2) pendant 10 minutes à température ambiante, mettant en évidence les dépôts de calcium. Les cellules sont lavées dans de l'eau distillée pendant 15 minutes pour retirer l'excès de marquage.

3.5.5. Coloration des squelettes bleu Alcyan/rouge d'Alizarine

Après dissection et fixation dans de l'éthanol à 95°, les squelettes sont colorés au bleu Alcyan dans un milieu contenant 80% d'alcool à 95° et 20% d'acide acétique glacial pendant une journée à température ambiante. Après vérification de la coloration, les squelettes sont mis dans des bains successifs d'alcool 95° renouvelé tous les jours pendant 6 jours puis dans une solution de KOH 2% pendant 24 h. Les squelettes sont ensuite placés dans une solution de rouge Alizarine (50mg/l Alizarine dans KOH à 2%) pendant 24 h. Enfin les squelettes colorés sont nettoyés dans plusieurs bains de 1% KOH /20% glycérol, et sont stockés dans une solution contenant 50% éthanol/50% glycérol.

3.6. IMMUNOHISTOCHEMIE

Les échantillons (tibias) de souris sont inclus en paraffine et des coupes de 5µm d'épaisseur sont réalisées. Les lames sont déparaffinées dans trois bains successifs de xylène de 5 minutes chacun, puis déshydratées dans trois bains successifs d'éthanol de 70%, 80% et 100% 5 minutes chacun. Ensuite un démasquage des sites antigéniques est réalisé dans un tampon

préparé extemporanément avec des solutions d'acide citrique (21g/L, pH 6) et de citrate de sodium (29,4g/L, pH 6), porté à ébullition pendant 3 minutes, puis chauffé pendant 20 minutes. Les sites sont saturés dans du lait écrémé à 5% dans du PBS 1X. Les lames sont ensuite lavées dans du PBS 1X. Après avoir cerclé les échantillons avec le Dako Pen® (Dako), l'anticorps primaire est déposé toute la nuit à 4°C. 3 lavages de 15 minutes sont ensuite réalisés. L'anticorps secondaire est déposé sur l'échantillon au 1/500 pour les Alexa fluo® 488 et au 1/1000 pour les Alexa fluo® 546 pendant 1h à température ambiante à l'abri de la lumière. Trois lavages successifs de 15 minutes dans du PBS sont réalisés puis une coloration au 4',6'-diamidino-2-phénylindole ou Dapi à 1µg/ml pendant 5 minutes, et un lavage de 5 minutes dans du PBS. Enfin le montage est réalisé avec un liquide type milieu de montage fluorescent Dako (S3023) (Dako).

3.7. IMMUNOCYTOCHIMIE

Les cellules sontensemencées dans des plaques 6 puits (Falcon®) dans lesquelles des lamelles ont été placées après stérilisation. Après avoir réalisé les divers traitements, les puits sont rincés 2 fois dans du PBS 1X. Les cellules sont ensuite fixées dans du paraformaldéhyde à 4% (Euromedex) pendant 20 minutes sur la glace puis rincées trois fois 5 minutes au PBS 1X froid. Les cellules sont perméabilisées avec du Triton 0,1% pendant 10 minutes à température ambiante, puis rincées 3 fois 5 minutes avec du PBS 1X. Les sites antigéniques sont saturés avec un bain de lait écrémé à 5% pendant 1 heure. Les lames sont incubées avec l'anticorps au 1/50 dans du PBS 1X contenant 3% de BSA, pendant 1h30 à température ambiante. Après 3 lavages de 5 minutes au PBS, l'anticorps secondaire fluorescent approprié est ajouté dans du PBS 1X contenant 3% de BSA au 1/500 pour le fluorochrome vert à 488nm et au 1/1000 pour le fluorochrome rouge à 546 nm. L'incubation est faite à l'abri de la lumière à température ambiante. Les lames sont lavées avec trois lavages successifs de 5 minutes en PBS puis colorées au 4',6'-diamidino-2-phénylindole ou Dapi à 1µg/ml pendant 5 minutes. Après un 5 minutes de lavage dans du PBS, le montage des lamelles est réalisé avec un liquide type milieu de montage fluorescent Dako (S3023) (Dako).

3.8. DETECTION DE L'APOPTOSE PAR TECHNIQUE TUNEL

Le TUNEL est une méthode utilisée pour détecter les fragmentations d'ADN retrouvées dans les cellules en apoptose. Cette analyse est réalisée avec le kit ApopTag® Peroxidase In situ Apoptosis Detection Kit, de Chemicon/Millipore France. Les cassures dans l'ADN des cellules apoptotiques sont mises en évidence par une désoxynucléotidyl transférase terminale, ou TdT, qui ajoute du dUTP couplé avec de la digoxigénine, à l'extrémité des fragments d'ADN. Un anticorps anti-digoxigénine couplé à une peroxydase génère un marquage localisé au niveau du noyau des cellules apoptotiques.

3.9. RT-PCR QUANTITATIVE

Après avoir enlevé le milieu de culture cellulaire, les cellules sont mises en contact avec 1 ml de réactif TRI Reagent® RT (MRC, Molecular Research Center, Inc, Cincinnati, USA) pour extraire les ARN. Deux microgrammes d'ARN sont utilisés pour réaliser une reverse transcription avec l'aide du kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems/ Life Technologies). Le Fast SYBR green master mix et le système ABI StepOne + (Applied biosystems/Life Technologies) sont utilisés pour quantifier les ARNm selon les recommandations du fabricant. Les primers utilisés sont les suivants : pour sox9 : sens 5'-ACGGAACAGACTCACATCTC-3', et anti sens 5'-GCTTCAGATCAACTTTGCCA-3' ; pour acan : sens 5'-CTATTTCCACACGCTACACCC-3' et anti sens 5'-AAAGACCTCACCTCCATCTC-3' ; pour MMP13 : sens 5'-CTCCTGATATGTCCCATTCT-3' et anti sens 5'-ACCATGTTCTTTAGTCCCAA-3' ; pour VEGF : sens 5'-GAATGCAGACCAAAGAAAGACAG-3' et anti sens 5'-GTTCGTTTAACTCAAGCTGCCT-3' ; pour col2a1 : sens 5'-CCAGAACATCACCTACCACT-3' et anti sens 5'-GTCCACACCAAATTCCTGTT-3' ; pour col10a1 : sens 5'-CTGCTAATGTTCTTGACCCT-3' et anti sens 5'-ATCCCTTTACTCTTTATGGCGT-3' ; pour col1a1 : sens 5'-CTGGAAGAGCGGAGAGTAC-3' et anti sens 5'-GGGTTCGGGCTGATGT-3' ; ; pour runx2 : sens 5'-TCTGGCGTTTAAATGGTTAATCTC-3' et anti sens 5'-CCCTCTGTTGTAAATACTGCT-3' ; pour smpd3 : sens 5'-AAATCTACCTCCTCGACCAG-3' et anti sens 5'-CTGCTCCAGTTTGTTCATCAG-3' ; pour osteopontine : sens 5'-GCAAGAACTCTTCCAAGCA-3' et anti sens 5'-AGATTCATCCGAGTCCACAG-3' ; pour lhh : sens 5'-ATATCACCACCTCAGACCGT-3' et anti sens 5'-GCCGAATGCTCAGACTTGAC-3' ; pour PTHrp : sens 5'-AAAGAACAGCCACTCAAGACAC-3' et anti sens 5'-

ATTTC AATGCGTCCTTAAGCTG-3' ; pour shh : sens 5'-ACGGCCATCATT CAGAGGA-3' et anti sens 5'-CACGGAGTTCTCTGCTTTT CAC-3' ; pour HAS2 : sens 5'-GAAACTTCCTTCCACGACCC-3' et anti sens 5'-GCACCGTACAGTCCAAATGAG-3' ; pour Chop : sens 5'-AAGCCTGGTATGAGGATCTG-3' et anti sens 5'-TTCCGTTTCCTAGTTCTTCC-3' ; pour Bip : sens 5'-CATCAATGAGCCTACAGCAG-3' et anti sens 5'-CCACCACTTCAAAGACACCA-3' ; pour Becline1 : sens 5'-AATCTAAGGAGTTGCCGTTATAC-3' et anti sens 5'-CCAGTGTCTTCAATCTTGCC-3' ; pour LC3 : sens 5'-ATTGCTGTCCCGAATGTCTC-3' et anti sens 5'-CGTCCTGGACAAGACCAAGT-3' ; pour GAPDH : sens 5'-GTATGTCGTGGAGTCTACTG-3' et anti sens 5'-TGCTGACAATCTTGAGTGAG-3' ; pour HPRT : sens 5'-TTGCTCGAGATGTGATGAAGGA-3' et anti sens 5'-CCAGCAGGTCAGCAAAGAATT-3'.

Les conditions d'incubation utilisées sont 95°C pendant 20 secondes, suivi de 40 cycles de 3 secondes à 95°C, annealing/extension pendant 30 secondes à 60°C. Chaque échantillon est fait en double et les données sont analysées à l'aide du logiciel StepOne +software v2.3. L'expression des ARNm d'intérêt est normalisée par rapport à celle de l'ARNm du gène de référence (GAPDH, HPRT) avec la méthode $2\Delta CT$.

3.10. PREPARATION ET OXIDATION DES LDL

Les LDL humaines (d 1.019-1.063) sont isolées par ultracentrifugation d'un pool de sérum humain frais. Après dialyse et filtration, elles sont diluées à 2g/l puis oxydées par exposition aux UV-C (2h, 254 nm, 0.5mW/cm²) en présence de 5µM de CuSO₄ (Negre-Salvayre 1990).

3.11. EVALUATION DE LA TOXICITE

3.11.1. MTT

Le MTT (bromure de 3-[4, 5- diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium) (Sigma) est un sel de tétrazolium (jaune et soluble) qui se transforme en formazan (bleu et insoluble) après réduction par les enzymes de la chaîne respiratoire mitochondriale. Le MTT est ajouté dans le milieu RPMI (sans SVF) à une concentration finale de 0,5 mg/mL. Après 30 min. d'incubation à 37°C, le milieu est éliminé et les cristaux de formazan sont dissous dans 1 mL de DMSO. La lecture se fait par spectrométrie à 580nm (Denisot and Lang, 1986).

3.11.2. Syto13/IP

Le test de Syto13/IP est basé sur la différence de perméabilité des membranes cellulaires à deux sondes fluorescentes s'intercalant dans l'ADN. Le Syto13, une sonde de couleur verte perméante et l'iodure de propidium, de couleur rouge et non perméant. La morphologie nucléaire (noyaux fluorescents) permet de discriminer les cellules vivantes (vertes) les cellules en apoptose primaire, sans modification de perméabilité membranaire, les cellules en nécrose post-apoptotique, cellules en nécrose primaire (Sanson 2008).

Les cellules sont incubées avec les sondes intercalantes pendant 30 minutes (Syto13, 1µM, iodure de propidium, 2µM) et sont observées en microscopie à fluorescence (microscope fluorescent inversé Fluovert FU, Leitz). Les cellules vivantes, apoptotiques et nécrotiques sont caractérisées par leur morphologie nucléaire. Les cellules vivantes intactes ont un noyau vert fluorescent et non condensé. Les cellules apoptotiques présentent un noyau vert/jaune pycnotique ou fragmenté, témoignant de la condensation apoptotique de la chromatine. Les cellules en nécrose post-apoptotique présentent les mêmes caractéristiques nucléaires (noyau condensé et fragmenté) mais sont rouges de par la perméabilisation des membranes qui permet la pénétration de l'iodure de propidium dans le noyau. Les cellules en nécrose primaire présentent des noyaux rouges avec une chromatine lâche.

3.12. DOSAGE des PROTEINES

Le dosage des protéines est réalisé à l'aide du réactif de Bradford (Bio-Rad Laboratories GmbH, Marnes-la-Coquette, France). La concentration protéique des échantillons est déterminée à partir d'une gamme de serum albumine bovine (BSA). La quantification se fait par spectrométrie à 595nm.

3.13. WESTERN BLOT

Après stimulation, les cellules sont lavées dans du PBS à 4°C et sont remises en suspension dans un tampon contenant des antiprotéases et antiphosphatases (1 mM de NaVO₄, 2 µg/ml de leupeptine, 1 mM de PMSF, 10 µg/ml d'Aprotinine dilués dans du PBS). Après centrifugation, le culot cellulaire est lysé dans un tampon d'extraction pH 7,4, contenant 50mM HEPES, 150mM NaCl, 10% glycérol, 0,5% de DOC, 1% Triton X-100, 1 mM de NaVO₄, 10mM

de β -glycérophosphate, 5mM de NaF, 2 μ g/ml de pepstatine, 1mM de PMSF et 10 μ g/ml d'aprotinine durant 30 minutes à 4°C.

Après centrifugation (12500 tr/min pendant 10 minutes), le dosage des protéines est réalisé et 30 à 50 μ g de protéines de chaque échantillon sont repris dans un tampon de dénaturation contenant 62,5 mM de Tris-HCl pH 6.8, 2% de SDS, 10% de glycérol, 0,04% de bleu de bromophénol et 4% de β -mercaptoéthanol. Le mélange est chauffé 5 minutes à 95°C. Les échantillons sont déposés sur un gel à 10% ou 7% de polyacrylamide. Après migration entre 15 et 30 mA par gel pendant 90 minutes, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose pendant 2h à 220 mA. La membrane est saturée pendant 2 h avec une solution de PBS contenant 5% de BSA ou de lait écrémé. L'anticorps primaire, dilué généralement au 1/1000 est incubé toute la nuit à 4°C avec la membrane. Après trois lavages de 10 minutes, l'anticorps secondaire couplé à HRP est dilué au 1/5000, et incubé avec la membrane pendant 1 h à température ambiante. Après trois lavages de 10 minutes, la révélation s'effectue par chimioluminescence avec de l'ECL[®] (Amersham, GE Healthcare, Velizy-Villacoublay, France). Les anticorps secondaires utilisés dépendent des anticorps primaires, et sont dirigés contre des Ig de souris, de lapin ou de chèvre couplés à la peroxydase (HRP, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Allemagne).

3.14. TRANSFECTION

Les cellules (fibroblastes, chondrocytes, cellules souches mésenchymateuses) ont été transfectées avec des esiRNA dirigés contre HAS2 (EMU0401111) provenant de chez Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier France (100nM final). Après 6h, on rajoute du milieu supplémenté avec 10% SVF et les siRNA sont incubés pendant 24h. L'efficacité est testée par RT-PCR quantitative.

3.15. STATISTIQUES

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. L'estimation de la significativité statistique est réalisée avec le test de Student (pour la comparaison de deux groupes) ou avec le test ANOVA one-way (étude de l'effet d'un facteur sur plusieurs groupes), à l'aide du logiciel SigmaStat 3.5, et du logiciel Systat. Les résultats pour lesquels $p < 0,05$, sont considérés comme statistiquement significatifs.

4. TRAVAUX EXPERIMENTAUX

La mutation récessive “fragilitas ossium” (*fro*) découverte à l’Institut Pasteur par le groupe du Dr. Jean-Louis Guénet, est considérée comme un modèle d’OI (Guénet 1981; Aubin 2005a). Le phénotype des souriceaux *fro/fro* nouveaux-nés, est caractérisé par une fragilité osseuse, une absence de minéralisation des os longs, associée à un retard de croissance, des déformations osseuses en particulier au niveau des pattes postérieures, et une forte mortalité néo- et périnatale, sans mutation du collagène de type I (Muriel 1991). Cette OI s’accompagne d’une dentinogenèse imparfaite, mise en évidence par les travaux du Pr. Michel Goldberg (Faculté de chirurgie dentaire de Montrouge) (Goldberg 1996).

Les travaux de l’équipe de Jean-Louis Guénet montrent que le phénotype de la souris *fro/fro* est associé à une mutation du gène *smpd3* codant pour la sphingomyélinase neutre de type 2 (nSMase2) (Aubin 2005b), dont l’activité enzymatique est inexistante dans les tissus des souris *fro/fro*. Le phénotype de cette souris est proche de celui des souris knock-out pour *smpd3* (Stöffel 2005). Cependant Stöffel ne signale pas d’OI chez les souris *smpd3*^{-/-}, mais décrit des signes de chondrodysplasie chez les animaux mutants (Stöffel 2007). Ces différentes études indiquent une implication de la voie des shingolipides dans le développement osseux.

Des travaux réalisés au cours de mon Master 2 de Recherche sur des précurseurs d’ostéoblastes MC3T3-E1 ne montraient pas ou peu de différence de minéralisation (évaluée avec le rouge d’alizarine), entre les contrôles et les cellules traitées par un inhibiteur pharmacologique de nSMase2, le GW4869. De même, des cellules souches obtenues à partir de moelle osseuse de souris *fro/fro* et différenciées en ostéoblastes, montrent une diminution partielle de la minéralisation, par comparaison avec des cellules souches d’animaux “sauvages” (Fig 26A). Cependant on ne retrouve pas de diminution d’expression ni de l’activité de la phosphatase alcaline (PAL) caractéristique de la différenciation des ostéoblastes entre les souris *fro/fro* et les souris contrôles (Fig 26B), indiquant donc que le défaut de minéralisation osseuse chez les souris *fro/fro*, est complexe et pourrait affecter non seulement la différenciation des ostéoblastes, mais aussi d’autres voies du développement osseux.

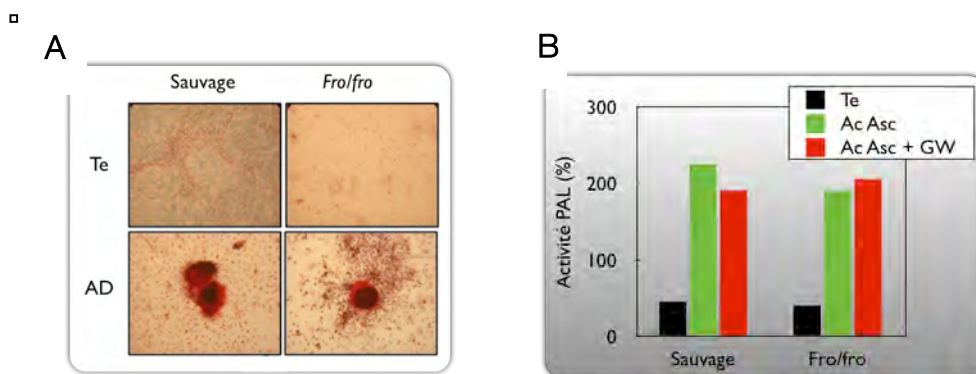


Figure 26 : Implication de la nSMase2 dans la minéralisation. (A) Comparaison de la coloration au rouge d'alizarine du calcium dans les progéniteurs ostéoblastiques issus de la moelle osseuse de souris sauvages et *fro/fro* différenciés dans un milieu ostéogénique en ostéoblastes. (B) Mesure de l'activité phosphatase alcaline (PAL) dans les progéniteurs ostéoblastiques issus de la moelle osseuse de souris sauvages et *fro/fro* différenciés dans un milieu ostéogénique en ostéoblastes en présence ou non de GW4869 (5μM).

Le groupe de Murshed (Khavandgar 2011) a développé une souris corrigée sur la nSMase2, exprimant *smpd3* sur un promoteur de Col1A1 spécifique des ostéoblastes et des odontoblastes (souris *fro/fro*; Col1a1-*Smpd3*). Cette souris montre une restauration partielle du phénotype osseux de la souris *fro/fro*, et du défaut de minéralisation, confirmant le rôle de la nSMase2 dans le développement de l'os.

A côté du défaut de minéralisation, caractéristique du phénotype OI de la souris *fro/fro*, les travaux de Khavandgar (Khavandgar 2011) montrent également une accumulation de chondrocytes hypertrophiques avec un déficit d'apoptose dans la plaque de croissance des os longs chez les souriceaux *fro/fro* nouveau-nés, suggérant une anomalie de développement de l'os endochondral chez ces souris.

Ce déficit d'apoptose pourrait être la conséquence directe de la mutation de nSMase2 dont le rôle pro-apoptotique est largement rapporté dans la littérature (Castillo 2007; Golkorn 1998).

Les objectifs de ce travail de thèse ont été orientés vers l'étude du rôle de la nSMase2 dans la différenciation, la maturation et l'apoptose des chondrocytes au cours du développement de la plaque de croissance chez la souris *fro/fro* comparée à la souris sauvage.

Ce travail expérimental est subdivisé en trois parties:

- Dans la première partie, nous étudions l'implication de la nSMase2 dans l'apoptose des fibroblastes et des cellules différenciées en chondrocytes hypertrophiques soit soumis à des agents de stress, soit placés dans des conditions de privation en nutriments (qui mime les conditions de maturation des chondrocytes hypertrophiques).
- Dans la deuxième partie, nous rapportons les caractéristiques des chondrocytes hypertrophiques qui s'accumulent dans la plaque de croissance des os longs chez la souris *fro/fro*. Nous mettons en évidence le déficit de maturation de ces cellules, caractérisé entre autres par une absence d'expression du VEGF et de la métalloprotéase MMP13, ainsi que par un défaut d'apoptose et d'autophagie.
- La troisième partie de ce travail montre que la chondrodysplasie observée chez la souris *fro/fro*, est de type "campomélique", avec un défaut d'expression de Col2A1 et d'Acan ainsi que de Sox9, qui est retrouvé sur des modèles de chondrocytes en culture (ATDC5, C3H10T1/2), différenciés en présence de l'inhibiteur de nSMase2, le GW4869.

4.1. Implication de la nSMase2 dans l'apoptose induite par la privation en nutriments

4.1.1. Sphingomyélinase et apoptose

Les sphingomyélinases sont impliquées dans le catabolisme de la sphingomyéline, un sphingolipide constituant majeur des membranes plasmiques, des rafts et des cavéoles (Cremesti 2002; Clarke 2006). La dégradation de la sphingomyéline génère du céramide, un médiateur sphingolipidique impliqué dans la différenciation cellulaire, l'autophagie et l'apoptose (Jarvis 1996; Hetz 2002; Hannun 2008). L'activation de la nSMase2 et la génération de céramide sont activées par de nombreux facteurs de stress, en particulier le stress oxydant (Cinq-Frais 2013), les LDL oxydées (Devillard 2010), le $\text{TNF}\alpha$ (Tellier 2007), ou la privation en nutriments. Le catabolisme du céramide conditionne la réponse cellulaire vers la prolifération ou l'apoptose, du fait de la conversion en sphingosine par les céramidases puis en sphingosine 1-phosphate (S1P), après phosphorylation de la sphingosine par les SK1 et SK2 (Maceyka 2012). La S1P est impliquée dans la prolifération et la survie cellulaire, et la balance S1P/céramide pourrait orienter le devenir cellulaire vers la survie ou l'apoptose, en fonction de la nature du stress, de sa durée et de son intensité.

Les résultats précédents rapportés par l'équipe ont montré que la nSMase2 n'est pas impliquée dans l'apoptose induite par les agents de stress (stress oxydant, LDL oxydées, cytokines), et la mutation de la nSMase2 ne protège pas les cellules mutantes de la mort cellulaire induite par ces agents. De même, l'hépatotoxicité induite par l'injection de $\text{TNF}\alpha$ est comparable dans les souris sauvages et les souris *fro/fro*, et la mutation de la nSMase2 ne leur confère pas de résistance (Devillard 2010). D'autres études cependant montrent un effet protecteur de la mutation en nSMase2 contre l'apoptose induite par divers agents (Filosto 2011, Meyers-Needham 2012). De plus, les travaux de Kavandhgar et coll. (Kavandhgar 2011) montrent que les chondrocytes hypertrophiques résistent à l'apoptose dans la plaque de croissance des os longs chez les souris *fro/fro*. L'apoptose des chondrocytes hypertrophiques constitue une étape essentielle dans la maturation de ces cellules, et se produit dans un environnement pauvre en nutriments (Shapiro 2005), qui permet l'activation de la nSMase2 et la génération de céramide (Bedia 2011).

Une hypothèse serait donc que la mutation en nSMase2 pourrait protéger les chondrocytes hypertrophiques de l'apoptose induite par la privation en nutriments chez la souris *fro/fro*.

Nous avons étudié l'effet des agents de stress et de la privation en nutriments sur des fibroblastes et dans un second temps sur des chondrocytes isolés à partir de têtes fémorales de souris sauvages et *fro/fro*. Nos travaux présentés dans la publication jointe, montrent que la mutation de nSMase2 ne protège pas les cellules mutantes de l'apoptose induite par les agents de stress, comme déjà rapporté (Devillard 2010), mais protègerait les fibroblastes et les chondrocytes de l'apoptose induite par la privation en nutriments. Cet effet protecteur fait intervenir une surexpression de la hyaluronan synthase 2 (HAS2) et l'acide hyaluronique (HA), dont l'expression et la sécrétion sont très augmentées chez les souris *fro/fro* mutantes.



Contents lists available at ScienceDirect

Redox Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/redox

Research Paper

Hyaluronan synthase-2 upregulation protects *smpd3*-deficient fibroblasts against cell death induced by nutrient deprivation, but not against apoptosis evoked by oxidized LDL

Sandra Garoby-Salom^{a,b}, Myriam Rouahi^{a,b}, Elodie Mucher^{a,b}, Nathalie Auge^{a,b}, Robert Salvayre^{a,b}, Anne Negre-Salvayre^{a,b,*}

^a INSERM UMR-1048, BP 84225, 31432 Toulouse Cedex 4, France

^b University of Toulouse, Toulouse, France



ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 November 2014

Received in revised form

10 December 2014

Accepted 12 December 2014

Available online 16 December 2014

Keywords:

Neutral sphingomyelinase-2

Nutrient starvation

Hyaluronan synthase-2

Oxidized LDL

Apoptosis

Hsp72

ABSTRACT

The neutral type 2 sphingomyelinase (nSMase2) hydrolyzes sphingomyelin and generates ceramide, a major bioactive sphingolipid mediator, involved in growth arrest and apoptosis. The role of nSMase2 in apoptosis is debated, and apparently contradictory results have been observed on fibroblasts isolated from nSMase2-deficient fragilitas ossium (homozygous *fro/fro*) mice. These mice exhibit a severe neonatal dysplasia, a lack of long bone mineralization and delayed apoptosis patterns of hypertrophic chondrocytes in the growth plate. We hypothesized that apoptosis induced by nutrient deprivation, which mimics the environmental modifications of the growth plate, requires nSMase2 activation. In this study, we have compared the resistance of *fro/fro* fibroblasts to different death inducers (oxidized LDL, hydrogen peroxide and nutrient starvation). The data show that nSMase2-deficient *fro/fro* cells resist to apoptosis evoked by nutrient starvation (fetal calf serum/glucose/pyruvate-free DMEM), whereas wt fibroblasts die after 48 h incubation in this medium. In contrast, oxidized LDL and hydrogen peroxide are similarly toxic to *fro/fro* and wt fibroblasts, indicating that nSMase2 is not involved in the mechanism of toxicity evoked by these agents. Interestingly, wt fibroblasts treated with the SMase inhibitor GW4869 were more resistant to starvation-induced apoptosis.

The resistance of *fro/fro* cells to starvation-induced apoptosis is associated with an increased expression of hyaluronan synthase 2 (HAS2) mRNAs and protein, which is inhibited by ceramide. In wt fibroblasts, this HAS2 rise and its protective effect did not occur, but exogenously added HA exhibited a protective effect against starvation-induced apoptosis.

The protective mechanism of HAS2 involves an increased expression of the heat-shock protein Hsp72, a chaperone with antiapoptotic activity. Taken together, these results highlight the role of nSMase2 in apoptosis evoked by nutrient starvation that could contribute to the delayed apoptosis of hypertrophic chondrocytes in the growth plate, and emphasize the antiapoptotic properties of HAS2.

© 2014 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introduction

Sphingomyelinases are a family of enzymes implicated in the catabolism of sphingomyelin, a major sphingolipid present in cellular membranes, rafts and caveolae [1,2]. Several sphingomyelinases have been cloned and characterized, and are known to play a major role in cell biology, via the degradation of sphingomyelin, which generates ceramide, a bioactive sphingolipid

mediator involved in cell growth arrest, apoptosis, autophagy and cell differentiation [3–6]. A variety of factors, such as nature of the stressors, stress duration, cell and tissue specificity, subcellular localization and metabolism of ceramide can influence its biological effects [6,7]. Ceramide can be catabolized by ceramidases into sphingosine, which can be converted by sphingosine kinases into sphingosine 1-phosphate (S1P), another sphingolipid mediator exhibiting survival and mitogenic properties [6,8].

Several evidences indicate that the balance ceramide/S1P (ceramide/S1P rheostat) is an important determinant of cell fate towards survival or apoptosis depending on the ability of cells to generate S1P from ceramide [9]. The neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2), encoded by the *smpd3* gene, is a redox-sensitive [6] enzyme that plays a key role in ceramide generation upon

Abbreviations: nSMase2, neutral sphingomyelinase type 2; HAS2, hyaluronan synthase 2; HA, hyaluronan; LDL, low density lipoprotein

* Corresponding author at: INSERM, UMR1048, BP 84225, 31432 Toulouse Cedex 4, France.

E-mail address: anne.negre-salvayre@inserm.fr (A. Negre-Salvayre).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2014.12.004>

2213–2317/© 2014 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

stimulation by stress-inducing agents, including hydrogen peroxide (H_2O_2) and oxidized LDL [10–13]. We have recently reported that nSMase2 activation by low H_2O_2 concentrations mediates the proliferation and migration of smooth muscle cells (SMC) and fibroblasts, via a ceramide-dependent sequential signaling cascade implicating the activation of src, and the subsequent phosphorylation and activation of the PDGF receptor, that is implicated in the activation of sphingosine kinase and the generation of S1P [12]. In contrast, high oxidative stress inhibits sphingosine kinase and triggers apoptotic cell death [14].

The expression of nSMase2 is high in the brain and bones [15,16]. Mice knockout for nSMase2 and nSMase2-deficient *fro/fro* mice (homozygous *smpd3^{fro}/smpd3^{fro}* with fragilitas ossium phenotype) exhibit bone deformations and neonatal growth retardation [16–18]. A number of studies have been carried out on cells and tissues isolated from these mice, to decipher the physiological role of nSMase2 and its implication in apoptosis evoked by cell death inducers. We recently reported that mutant fibroblasts isolated from *fro/fro* mouse undergo apoptosis similarly to wt fibroblasts, when exposed to stress-inducing agents such as cytokines (TNF- α), H_2O_2 or oxidized LDL [11]. Likewise, the hepatotoxicity resulting from TNF- α injection to mice, is similar in *fro/fro* and wild type mice, indicating that the nSMase2 mutation does not confer any resistance to these acute stress-inducing agents [11]. However, other studies, including experiments done on *fro/fro* cells, indicate an apoptotic role for nSMase2 [19,20]. Recently Kavandhgar et al. [21] reported that the defect in bone mineralization in *fro/fro* mouse is associated with an accumulation of hypertrophic chondrocytes in the growth plate and a reduced number of TUNEL positive cells, indicating a defective apoptosis, which is necessary for bone mineralization [22]. These reports point out the complicated role of nSMase2 in apoptosis, which may differ as function of the state of development, the tissue specificity and the nature of the stress inducer.

The terminal apoptotic differentiation of hypertrophic chondrocytes, is necessary for bone mineralization and involves environmental modifications, including nutrient deprivation [23], which is a known sphingolipid pathway trigger [24]. The present study was carried out to decipher whether nSMase2 is involved in cell death induced by nutrient starvation and to characterize the mechanisms of resistance evoked by nSMase2 mutation in *fro/fro* cells.

Materials and methods

Chemicals and reagents

Anti-HAS2 mouse monoclonal antibody (sc-365263) was from Santa Cruz Biotechnology (Texas, USA); anti-hsp72/73 mouse antibody was from Calbiochem (Merck Millipore, United Kingdom). Anti Akt-phospho (Ser473) rabbit was from Cell Signalling. Secondary antibodies anti-mouse and anti-rabbit were from Cell Signalling Technology (Denver, USA). SYTO-13, propidium iodide, alexa-Fluor 488 (green)- and Alexa-Fluor 546 (red)-conjugated secondary antibody were from Molecular Probes (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), GW4869, KNK437 were from Sigma-Aldrich. RPMI 1640, DMEM, fetal calf serum (FCS) were from Invitrogen (France). Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) without D-glucose and Sodium pyruvate was from Gibco/Life Technology (Paisley, United Kingdom). Hyaluronan (High Molecular Weight > 950 kDa) was from RD System (Minneapolis, USA). C2-ceramide was from Biomol, Laboratory Research. Acrylamide-4 × /bisacrylamide-2 × solution was from Euromedex (Souffelweyersheim, FR). The ECL chemoluminescence kit was

from Amersham Pharmacia (Velizy-Villacoublay, France).

Cell culture

Primary cultures of fibroblasts were obtained by skin biopsies from newborn control and *fro/fro* mice. Briefly, skin samples were minced and put in Petri dishes, dermis facing down. After 15 min of dry contact with the dishes, DMEM culture medium containing 10% FCS penicillin, streptomycin, amphotericin A was added, and the skin preparation was cultured at 37 °C, 5% CO₂. After 1–3 weeks, cells growing around the tissue pieces were expanded.

Control (wt) or *fro/fro* fibroblasts were grown in DMEM Glutamax culture medium supplemented with 10% fetal calf serum and antibiotics (100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin) in a 5% CO₂ humidified incubator, at 37 °C. At sub-confluency, this medium was removed and replaced by serum/glucose/pyruvate-free DMEM (nutrient-starvation conditions), or by serum-free RPMI-1640 containing oxidized LDL (200 μ g/ml), or H_2O_2 (100 μ M), for 48 h.

Animals

The genetic background of *fro/fro* and wt mice was 129/SV. Homozygous mice, harboring a truncating mutation in nSMase2 and fragilitas ossium (*fro*) phenotype were genotyped by PCR, as previously described [17], using the following primers: 5'-GCCCGCAGCCATGTATAGTA-3', 5'-CTCAATGGAGGGCACACAG-3' and 5'-CAGGTTTAGGGACCTGACG-3'.

TUNEL assay

For detecting apoptosis in cells and tissues, we used the ApopTag® In Situ Apoptosis Detection Kit (Millipore). Apoptotic cells were detected by labeling and by modifying DNA fragments utilizing terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT). Total and apoptotic cells were counted after immunoperoxidase and DAPI staining.

Real time quantitative PCR assay

TRI Reagent RT (Molecular Research Center) was added to cell pellets for RNA extraction according to the manufacturer's instructions. RNA was quantified with Xpose (Trinean). One microgram of RNA was used for reverse transcription with a high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems/Life Technologies). Fast SYBR green master mix (Applied Biosystems/Life Technologies) and the ABI StepOne+ real-time PCR system (Applied Biosystems) were used to evaluate mRNA levels according to the manufacturer's recommendations. The following primers were used: For HAS2, forward, 5'-GAAACTTCCTTCCACGACCC-3', and reverse 5'-GCACCGTACAGTCCAAATGAG-3'. For Beclin 1, forward 5'-AATCTAAGGAGTTGCCGTTATAC-3' and reverse 5'-CCAGTGTCTCAATCTTGCC-3'; for LC3b, forward, 5'-ATTGCTGTCCGAATGTCTC-3' and reverse 5'-CGTCCTGGACAAGACCAAGT-3'; for HPRT, forward 5'-TTGCTCGAGATGTGATGAAGGA-3' and reverse 5'-CCAGCAGGTCAGCAAAGAATT-3'. Incubation were 95 °C for 20 s, followed by 40 cycles of 3 s at 95 °C and annealing/extension for 30 s at 60 °C. Each sample was done in duplicate and data were analyzed using StepOne+ software version 2.3. Expression was normalized to HPRT.

LDL preparation and oxidation

Human LDL were isolated from pooled fresh sera by sequential ultracentrifugation, dialyzed, sterilized by filtration, and oxidized by UV-C irradiation. Mildly oxidized LDL were obtained by UV oxidation as previously described [11].

Cell viability and apoptosis

The cell viability was evaluated by the MTT assay [11]. Apoptotic/necrotic cells were counted by fluorescence microscopy after staining by fluorescent DNA intercalating agents SYTO-13 and propidium iodide (PI). Cells grown in 6-multiwell plates were

incubated with permeant DNA intercalating green fluorescent probe SYTO-13 (0.6 μ M) and the non-permeant DNA intercalating red fluorescent probe PI (15 μ M), using an inverted fluorescence microscope (Fluovert FU, Leitz). Intact, apoptotic and necrotic cells were characterized on the basis of their morphological features.

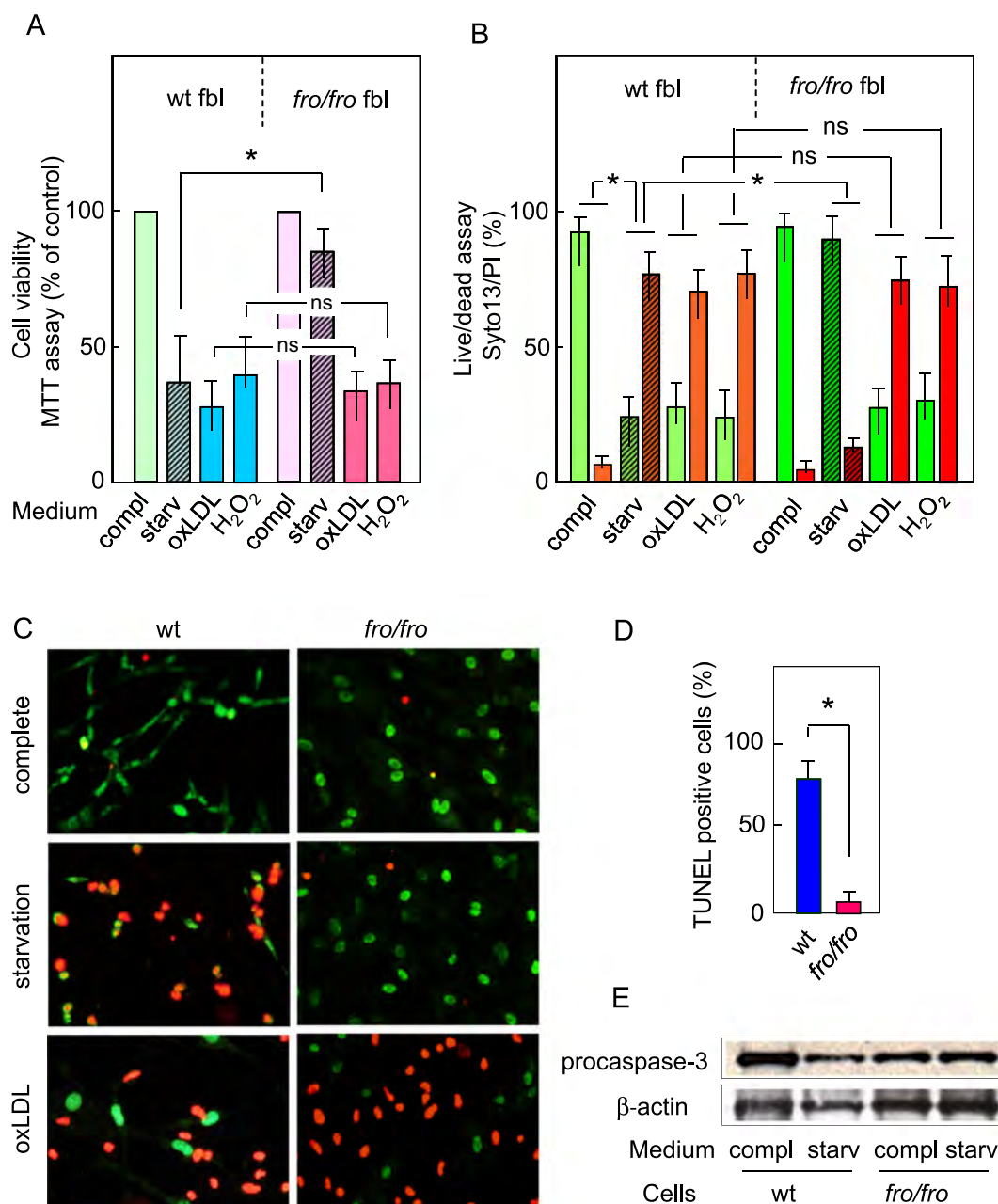


Fig. 1. Resistance of *fro/fro* fibroblasts to apoptosis induced by serum starvation, but not to oxidized LDL and H₂O₂. Sub-confluent fibroblasts from *fro/fro* (fro) or wt mice (wt) were incubated for 48 h in standard medium DMEM containing 10% FCS, 4.5 g/l glucose, pyruvate and GlutaMAX (ref. 61965-026, Life Technologies) (compl) or in serum/glucose/pyruvate-free DMEM culture medium containing L-glutamine (ref. 11966-025, Life Technologies) (nutrient deprivation condition) (starv, stripped bars), or in serum free RPMI, supplemented with oxidized LDL (200 μ g apoB/ml) (oxLDL) or H₂O₂ (100 μ M). At the end of 48 h incubation, cell viability was evaluated by the MTT assay (A). (B) Counting of apoptotic vs living cells after staining with Syto13/PI fluorescent probes which allow to distinguish between living cells (green bars), and apoptotic cells (primary apoptosis and post-apoptotic necrosis) (orange bars for wt, red bars for *fro/fro* fibroblasts). Apoptotic cells were counted, and are expressed as percent of the unstimulated control. C, Representative pictures of syto13/PI-stained wt and *fro/fro* fibroblasts. (D) TUNEL positive wt and *fro/fro* fibroblasts. Cells were incubated for 48 h in serum-free medium, and stained with the ApopTag® In Situ Apoptosis Detection Kit (Millipore), and counterstained with DAPI. The number of TUNEL positive cells is expressed as percent of the total cell number counted as DAPI stained fibroblasts. (E) Western-blot showing the degradation of procaspase-3, indicative of its activation. These data are a mean \pm SEM of 5 separate experiments, * p < 0.05.

Western blot analysis

Cultured cells were washed and scrapped in PBS, then disrupted at 4 °C in the extraction buffer (20 mM HEPES, 1 mM EDTA, 1 mM Na₃VO₄, 250 mM sucrose, 5 μ M digitonin, 1 mM DTT, and 1 mM PMSF) for 15–30 min on ice. Cell extracts were centrifuged at 12,000g for 15 min (Beckman Optima) and the supernatant was used for Western-blot experiments. Protein concentration was determined using the Bradford reagent (Biorad). 50 μ g of protein cell extracts were resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, transferred onto PVDF membranes (Millipore). Then membranes were probed with the primary antibodies and revealed with secondary antibodies coupled to horseradish peroxidase using the ECL chemoluminescence kit (Amersham). β -actin was used to control equal loading of proteins.

SiRNA transfection

Murine fibroblasts were transfected with murine HAS2 or control siRNA using OptiMEM (Invitrogen) and HiPerFect reagent according to the manufacturer's recommendations.

Statistical analysis

Data are given as mean \pm SEM. Estimates of statistical significance were performed by One Way Anova followed by multiple comparison analysis by Holm-Sidak method (SigmaStat software). Values of $p < 0.05$ were considered significant.

Results

nSMase2 and Cer are involved in the apoptotic process triggered by nutrient starvation, but not by hydrogen peroxide or oxidized LDL: fro/fro fibroblasts resist to cell death induced by nutrient deprivation

Wt and *fro/fro* fibroblasts were exposed to toxic concentrations of oxidized LDL (200 μ g apoB/ml), hydrogen peroxide (H₂O₂, 100 μ M) in serum-free RPMI (5 g/l glucose) or to nutrient deprivation in (glucose/pyruvate/serum)-free DMEM culture medium, for 48 h. As shown in Fig. 1A, cytotoxicity experiments, using the MTT assay, indicate that the cytotoxic effect of oxidized LDL or H₂O₂ is comparable in *fro/fro* and wt fibroblasts. In contrast, *fro/fro* fibroblasts strongly resisted to cell death evoked by nutrient starvation, showing more than 90% viability vs less than 30% for wt, after 48 h of contact with nutrient-free medium (Fig. 1A). Live-dead experiments using syto13/PI staining confirmed the resistance of *fro/fro* cells to apoptosis evoked by nutrient deprivation, in contrast to oxidized LDL that induced similar apoptosis in wt and in *fro/fro* cells (Fig. 1B and C). TUNEL staining (Fig. 1D) and procaspase 3 cleavage (Fig. 1E), confirmed that nSMase2-deficient *fro/fro* fibroblasts are more resistant to nutrient starvation induced-apoptosis than wt fibroblasts. It is to note that i/ the serum-free RPMI medium, in which oxidized LDL and H₂O₂ were added, was not toxic to wt fibroblasts for the period of the experiment, indicating that glucose and pyruvate starvation is the main trigger of cell death in wt fibroblasts, and ii/ oxidized LDL were toxic for *fro/fro* fibroblasts in the nutrient-free culture medium (data not shown).

The role of nSMase2 in cell death induced by nutrient starvation was confirmed by the effect of the sphingomyelinase inhibitor GW4869, which prevented (or delayed) the apoptotic effect of nutrient deprivation of wt fibroblasts (Fig. 2A). In contrast, GW4869 had no effect on cell death evoked by oxidized LDL in agreement with previously reported data [11]. In the same way, the resistance of *fro/fro* fibroblasts was reversed by the addition of the permeant C2-ceramide (5 μ M) to the nutrient-starved medium

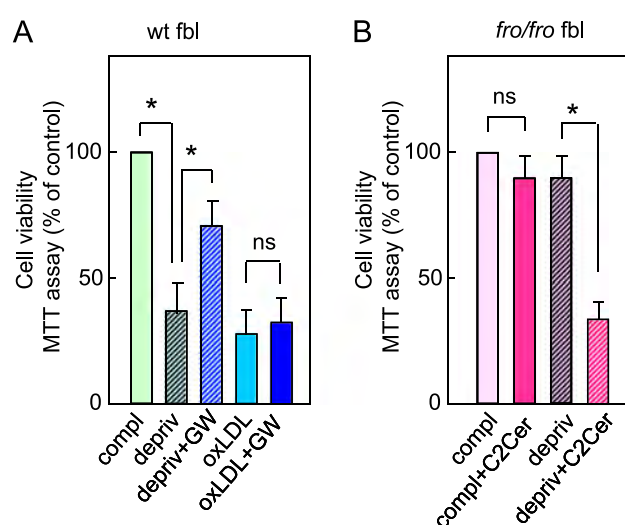


Fig. 2. Modulation of nSMase2 activity by the GW4869 inhibitor and ceramide level by C2Cer alters the cell viability under nutrient depletion conditions. Sub-confluent fibroblasts from wt (A) or *fro/fro* (B) mice were incubated in standard medium containing 10% FCS (compl) or in nutrient deprivation serum/glucose/pyruvate-free DMEM culture medium (depriv), or in serum free RPMI, supplemented with oxidized LDL (oxL, 200 μ g apoB/ml). In A, protective effect of the nSMase2 inhibitor GW4869 (GW, 10 μ M) on cell death evoked by starvation (depriv) or oxidized LDL (oxLDL). In (B) effect of C2 ceramide (C2Cer, 5 μ M). After 48 h, the toxicity was evaluated by the MTT test. The results are mean \pm SEM of 6 experiments. * $p < 0.05$.

(less than 25% cell viability) (Fig. 2B). No toxicity of C2-ceramide was observed in complete culture medium (Fig. 2B).

Altogether, these data indicate that i/ nSMase2 and ceramide are involved in cell death of wt fibroblasts evoked by nutrient starvation, but not by oxidized LDL, ii/ nSMase2-deficient *fro/fro* fibroblasts resist to nutrient-starvation induced cell death, but not to oxidized LDL.

Autophagy is not involved in the resistance to apoptosis induced by nutrient starvation in *fro/fro* fibroblasts

Autophagy and apoptosis processes are often associated, either through a cross inhibitory signaling, or sometimes through interconnected pathways [25,26]. Generally, autophagy is a survival system that blocks the induction of apoptosis, whereas activated caspases inhibit the autophagic process [26]. Moreover, ceramide is a potent autophagy inducer [27], via a downregulation of nutrient transporters [28]. This led us to investigate whether Cer generated by nSMase2 plays a role in autophagy induced by nutrient deprivation and in the mechanism of resistance of *fro/fro* fibroblasts.

As shown in Fig. 3, in *fro/fro* and wt cells, nutrient starvation elicited a strong conversion of LC3-I into LC3-II and an increase of Beclin-1 expression, both parameters being characteristic markers of autophagy activation. In contrast, the autophagic machinery was not activated by oxidized LDL, in *fro/fro* and wt cells (Fig. 3A and B). No difference was observed between *fro/fro* and wt fibroblasts, in the induction of autophagy parameters by nutrient starvation, this indicating that autophagy evoked by nutrient starvation does not require the nSMase2 activity.

Finally, autophagy markers are similarly induced by nutrient deprivation in wt and *fro/fro* cells, while these cells exhibit a great difference in their resistance to apoptosis induced by starvation. Thus, it may be concluded that, in this model, i/ ceramide is not required for autophagy marker induction by nutrient deprivation, ii/ autophagy alone plays no major role in the resistance of *fro/fro* cells to nutrient deprivation.

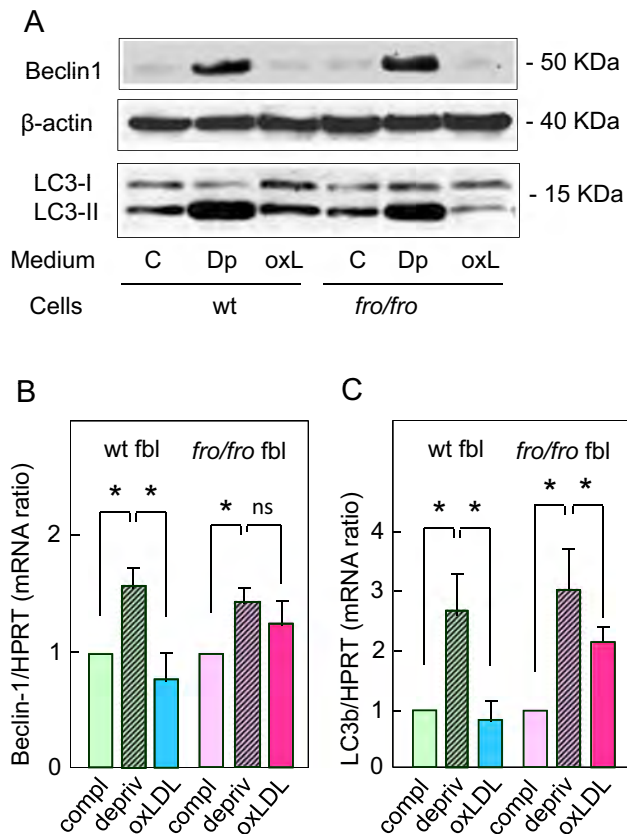


Fig. 3. Autophagy markers are similarly up-regulated in *fro/fro* and wt fibroblasts by nutrient deprivation. Fibroblasts were incubated for 48 h under nutrient starvation condition, or with oxidized LDL, as reported in the legend to Fig. 1. (A) Western-blot experiments showing the expression of Beclin-1 and the conversion of LC3-I to LC3-II, in complete medium (C), nutrient deprivation (Dp) and oxidized LDL (oxL) conditions. B. qPCR experiments showing the expression of LC3b and beclin-1, normalized to HPRT. The results are mean \pm SEM of 3 separate experiments. * $p < 0.05$.

Hyaluronan synthase 2 (HAS2) and hyaluronan mediate the resistance to apoptosis induced by nutrient deprivation in *fro/fro* fibroblasts

Fibroblasts from *fro/fro* mouse secrete high amounts of hyaluronan (HA), due to an increased expression and activity of the hyaluronan synthase 2 (HAS2), resulting from PP2A inhibition and Akt phosphorylation [29]. As HA and HAS2 protect fibroblasts against environmental stress-induced apoptosis [30], we checked whether HA, HAS2 and Akt are involved in the resistance of *fro/fro* cells to apoptosis induced by nutrient starvation.

As expected, HAS2 expression was much higher in *fro/fro* fibroblasts than in wt fibroblasts (Fig. 4A and B), in agreement with Qin et al. [29], but HAS2 expression was not (or only slightly) dependent on culture conditions, since HAS2 was high in *fro/fro* cells grown in complete medium and in nutrient starvation conditions, while HAS2 of wt fibroblasts was low in both culture media (Fig. 4A and B). HAS2 expression was dependent on Cer generated by nSMase2, as shown by treatment with C2-ceramide (5 μ M) that decreased HAS2 expression in *fro/fro* fibroblasts (Fig. 4B).

We then checked whether HAS2 plays a role in the mechanism of *fro/fro* fibroblast resistance to nutrient deprivation. HAS2-specific siRNA transfected in *fro/fro* fibroblasts reduced the expression of HAS2 and decreased the resistance of *fro/fro* cells to apoptosis evoked by starvation (Fig. 4C and D). Likewise, methylumbelliferone (MU), a classical HAS2 inhibitor (1 mM), reversed the

resistance of *fro/fro* fibroblasts to apoptosis induced by nutrient starvation (Fig. 4D). Conversely, the addition of HA to wt fibroblasts significantly improved their resistance to apoptosis induced by nutrient starvation (Fig. 5A–C). However, HA did not protect wt fibroblasts against cell death evoked by oxidized LDL, in accordance to the lack of resistance of *fro/fro* fibroblasts to oxidized LDL toxicity.

Finally, these data suggest that the increased resistance of *fro/fro* cells to nutrient starvation results from the rise of HAS2 expression and subsequent increased synthesis of HA induced by the deficiency of Cer generated by nSMase2 (deficient in *fro/fro* cells).

Hsp72 is involved in the protective effect of HAS2 in *fro/fro* fibroblasts

Previous report from Xu et al. [31] had shown that synovial cell death evoked by stress conditions (including serum starvation) in an arthritis model, is suppressed by hyaluronan via upregulation of stress-inducible heat-shock proteins of the HSP70 family. In agreement with this report, we found that Hsp72 expression is increased in *fro/fro* fibroblasts both in standard and nutrient-starved conditions (Fig. 6A). In contrast, Hsp72 expression was strongly decreased in cells transfected with the HAS2-specific siRNA, thus confirming that Hsp72 expression in *fro/fro* fibroblasts depends on HA and HAS2 (Fig. 6B). The protective role of Hsp72 was supported by the effect of the pharmacological Hsp70 inhibitor KNK437, which reversed the resistance of *fro/fro* fibroblasts to apoptosis evoked by serum starvation. No increased expression of Hsp72 was observed in wt fibroblasts and in *fro/fro* fibroblasts incubated with oxidized LDL (data not shown).

Taken together, these data indicate that HAS2 expression and HA secretion in *fro/fro* fibroblasts, resulting from Akt activation, are protective against cell death evoked by nutrient starvation.

Discussion

In this article, and as summarized in the graphical abstract, we show that nSMase2 is involved in apoptosis evoked by nutrient starvation, and this is protected in *fro/fro* fibroblasts mutant for nSMase2, via an increased expression of HAS2 and of Hsp72.

Role of nSMase2 in apoptosis induced by nutrient starvation

A first important point is that nSMase2 is involved in apoptosis induced by nutrient starvation, but not by oxidized LDL or H_2O_2 . A number of studies have been focused on the apoptotic signaling of nSMase2, with controversial responses depending on the cell type, or the nature of the stressors [6]. We recently reported that nSMase2-deficient *fro/fro* mice, characterized by a strong neonatal growth retardation [17], do not resist to TNF α -induced hepatotoxicity, and fibroblasts isolated from these mice, do not resist to apoptosis evoked by oxidized LDL or TNF α ([11] and present article), suggesting that nSMase2 is not involved in acute stress-induced cell death. Here we show that *fro/fro* fibroblasts resist to cell death evoked by nutrient starvation in contrast to wt fibroblasts. Apoptotic cell death of wt cells is evidenced by the increased number of TUNEL positive cells, and by the morphological features of apoptosis observed using Syto13/PI staining, all these parameters being reduced in *fro/fro* fibroblasts. These data point out the different mechanisms of apoptosis evoked by nutrient starvation (protected in *fro/fro* fibroblasts) or by oxidized LDL (not protected in these cells). We previously reported that ceramide is not involved in apoptosis induced by oxidized LDL in endothelial cells, SMC and fibroblasts [32,33], which mainly depends on the deregulation of cytosolic calcium and the subsequent activation of the intrinsic mitochondrial apoptotic pathway [34,35]. In contrast, nSMase2 activation by oxidized LDL, and subsequent ceramide

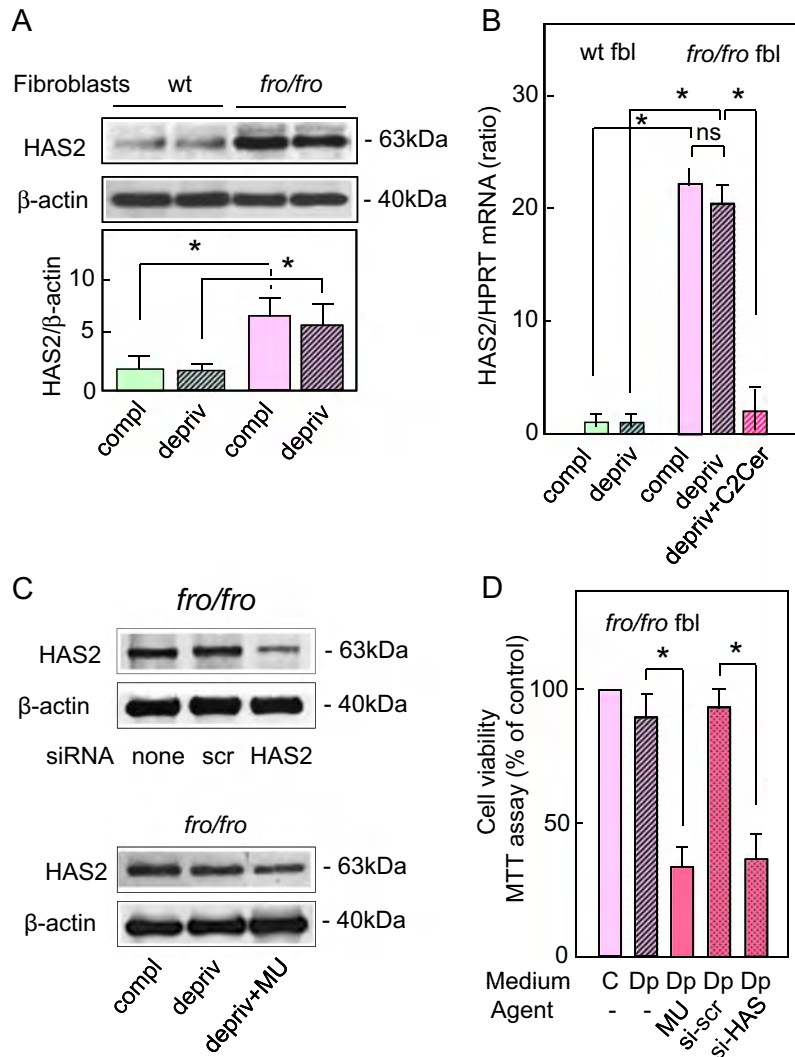


Fig. 4. HAS2 expression is dependent on nSMase2/Cer and is involved in the resistance of *fro/fro* to nutrient deprivation-induced apoptosis. (A) Western blot of HAS2 in wt and *fro/fro* fibroblasts grown in complete medium (compl) and nutrient deprivation conditions (depriv). (B) HAS2 mRNA expression evaluated by q-PCR experiments, and normalized to HPRT, in *fro/fro* and wt fibroblasts grown in complete medium (compl), nutrient deprivation conditions (depriv). The effect of C2-ceramide (C2Cer, 5 μ M), was tested in *fro/fro* fibroblasts, as indicated. (C) Western blot of HAS2 in *fro/fro* fibroblasts grown in complete medium and treated with scrambled siRNA or with specific HAS2 siRNA (upper panel) or in complete (compl) or nutrient deprivation (depriv) medium with or without methylumbelliferone (MU, 1 mM) (lower panel). (D) After 48 h incubation, the cytotoxicity was evaluated by the MTT test. Data are mean \pm SEM of 5 separate experiments, * $p < 0.05$.

generation, are involved in SMC proliferation, *via* the activation of a signaling cascade leading to the activation of sphingosine kinase-1 and the generation of the survival and mitogenic sphingolipid mediator, S1P [12]. Indeed, *fro/fro* fibroblasts and nSMase2-silenced SMC do not proliferate in the presence of oxidized LDL [11].

In contrast, our data show that in our model, the mechanism of apoptosis evoked by nutrient starvation involves nSMase2 since i/ *fro/fro* fibroblasts mutant for this nSMase2, resist to apoptosis, ii/ the addition of GW4869, an inhibitor of neutral SMases, protects wt fibroblasts against cell death induced by nutrient privation, but not that induced by oxidized LDL, iii/ the addition of C2-ceramide to *fro/fro* fibroblasts, reverses their resistance to cell death. Thus it can be hypothesized that ceramide released *via* the degradation of sphingomyelin by nSMase2, elicits apoptosis in nutrient-starved conditions.

Our data show that autophagy activation is not deficient in *fro/fro* fibroblasts, thus is probably not involved in the mechanism of cell death mediated by nSMase2. Apoptosis induced by serum or nutrient starvation, is often associated to autophagy, which is a

survival mechanism, able to mediate a non-apoptotic cell death, when apoptotic pathways are blocked [36]. Ceramide is a potent autophagic cell death inducer, *via* a downregulation of nutrient transporters [28], thus it was hypothesized that autophagy could be defective in *fro/fro* fibroblasts, in which the ceramide generation is reduced. However, our data do not show any defect in the activation of autophagy markers such as the conversion LC3-I to LC3-II, or beclin-1 mRNA and protein expression, which suggests that ceramide is either not involved in the autophagic process evoked by nutrient starvation in these fibroblasts, or is generated by another SMase, such as the acidic SMase which modulates autophagy in several pathophysiological models for Alzheimer's disease, steatosis or atherosclerosis [37–39].

The resistance of fro/fro fibroblasts to nutrient starvation involves HAS2 increased expression

HAS2 is highly expressed in *fro/fro* fibroblasts, leading to an increased secretion of HA in the extracellular medium [29]. HAS2

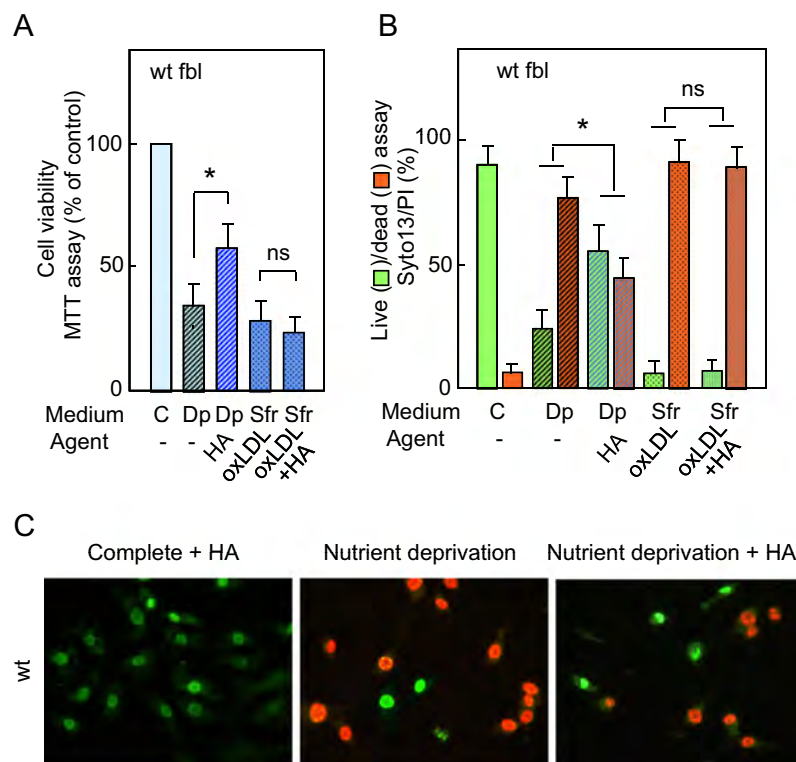


Fig. 5. Protective effect of exogenous hyaluronic acid in wt fibroblast grown under nutrient deprivation conditions. Cell viability of wt type fibroblasts grown for 48 h in complete medium (C), in nutrient deprivation medium (Dp) with or without exogenous high molecular mass hyaluronic acid (HA), or with oxidized LDL with and without HA, in serum free RPMI medium (Sfr). The cytotoxicity was evaluated by the MTT assay (A) or by the live/dead Syto13/PI assay (B), as explained in the Fig. 1. (C) representative pictures of syto13/PI stained cells. Data are expressed as mean \pm SEM of 5 separate experiments, * $p < 0.05$.

protects against apoptosis evoked by environmental stress, such as serum starvation [30]. High molecular weight HA are antiapoptotic and protective in various pathophysiological conditions, such as human corneal epithelial cells [40], cornea protection and oxidative stress [41], trophoblasts [42], chondrocytes and synovial lesions [43,44]. We hypothesized that HAS2 contributes to the resistance of *fro/fro* fibroblasts in nutrient deprivation conditions.

In *fro/fro* cells, the high HAS2 expression depends on Akt activation, itself resulting from the decreased activity of PP2A, due to a reduced ceramide content [29]. Indeed, ceramide is a potent activator of PP2Ac/ceramide-activated protein phosphatases [45,46], which in turn inhibits Akt [47]. In *fro/fro* fibroblasts, the nSMase2/Cer deficiency in *fro/fro* cells prevents PP2A activation, thereby impeding Akt inactivation. Thus, Akt activation persists and supports the expression of HAS2 [29]. Under nutrient deprivation conditions, we found that HAS2 expression remains high in *fro/fro* fibroblasts. This high HAS2 expression is required for survival of *fro/fro* fibroblasts under deprivation conditions, as shown by the reversion of this resistance to deprivation by silencing of HAS2 by specific siRNAs and by inhibiting HAS2 with MU, in agreement with Wang et al. [30]. In the same way, the addition of HA protects in part wt fibroblasts against apoptosis induced by nutrient starvation. However this protective effect was not effective against the toxicity of oxidized LDL, which inhibited HAS2 expression in *fro/fro* fibroblasts.

Hsp72 expression is involved in HAS2-induced resistance of *fro/fro* fibroblasts to nutrient starvation

Heat-shock proteins (Hsps) are induced in response to various stressors including heat stress, toxic chemicals or modifications of cell environment, to suppress apoptosis [48]. HA are known to up-

regulate the expression of heat-shock proteins from the Hsp70 family, particularly Hsp72, which may suppress cell degeneration and apoptosis in various models, such as canine arthritis [49], K562 cells exposed to hyperthermia and PC12 cells in serum deprivation conditions serum deprivation [31]. Our results show that Hsp72 expression is increased in *fro/fro* fibroblasts, and its inhibition, either by the specific pharmacological inhibitor KNK437, or by siRNA directed against HAS2, reversed the resistance of *fro/fro* cells, indicating that Hsp72 expression depends on HAS2 and is anti-apoptotic in nutrient-starved conditions, as reported [31].

In conclusion, the reported data show that nSMase2 is involved in cell death induced by nutrient deprivation, through a ceramide-dependent activation of PP2A that negatively regulates Akt activity, thereby reducing HAS2 and Hsp72 expression. In contrast, the data on *fro/fro* cells confirm that oxidized LDL-induced apoptosis occurs through ceramide-independent mechanisms, as previously reported [35,50–52]. Moreover, nutrient starvation triggers a robust increase of autophagy markers, which is independent of nSMase2/Cer and plays no major role in cell death induced by nutrient deprivation.

Finally, the functional link between nSMase2/Cer, Akt and HAS2 suggests that this pathway is involved in the protection against cell death induced by nutrient deprivation, by regulating not only the classical anti-apoptotic mechanisms mediated by Akt, but also the additional protective pathway mediated by HAS2, which is apparently required to prevent the apoptotic effect of nutrient deprivation.

Acknowledgments

The authors wish to thank M.H. Graziade and C. Bernis for their excellent technical assistance. This work was supported by

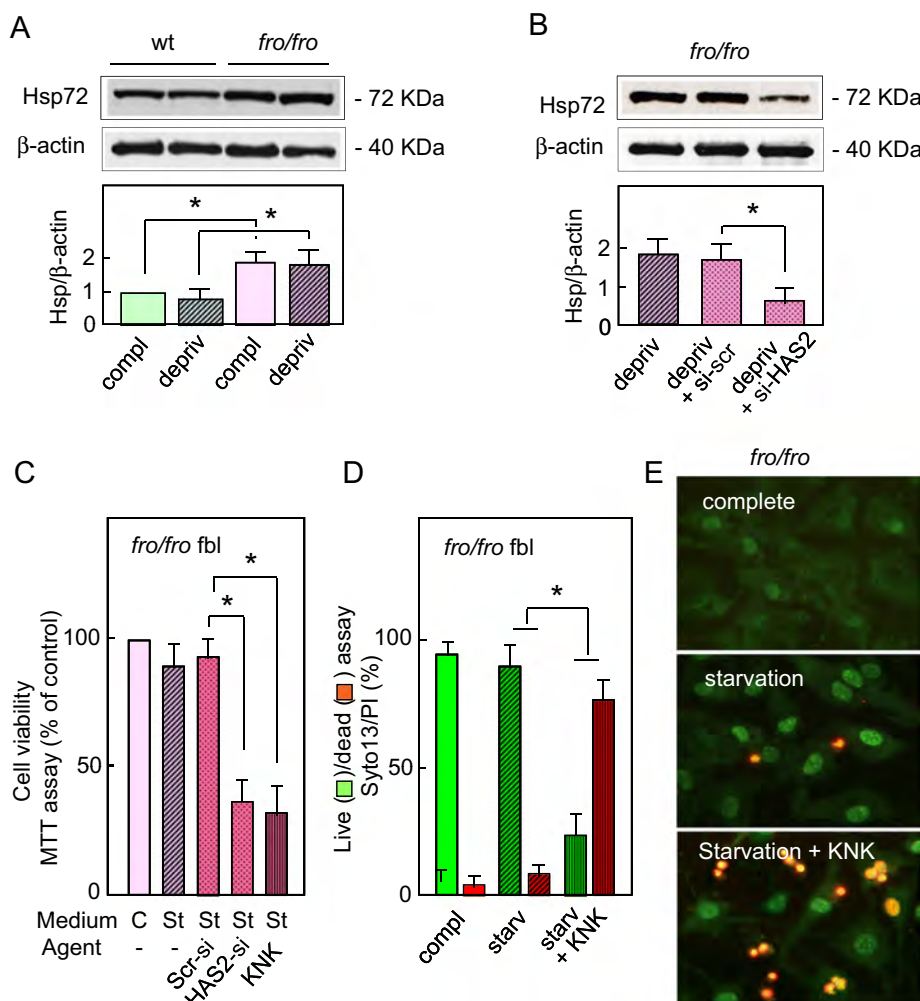


Fig. 6. Hsp72 expression is increased in a HAS2-dependent manner in *fro/fro* fibroblasts and is involved in their resistance to nutrient deprivation. (A) Expression of Hsp72 in wt and in *fro/fro* fibroblasts, after 48 h incubation in complete medium (compl) or in nutrient deprivation conditions (depriv). (B) Effect of scrambled (scr) siRNA or HAS2-specific siRNA on Hsp72 expression in *fro/fro* fibroblasts. (C,D) Effect of the specific Hsp72 inhibitor KNK437 (KNK, 5 μ M), on the viability of *fro/fro* fibroblasts, in nutrient starvation conditions (St) evaluated by the MTT assay (C), and by counting the apoptotic cell number, after syto13/PI staining (D). These data are expressed as percent of the results obtained in complete medium (C), and are a mean \pm SEM of 5 separate experiments, * p < 0.05.

INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale), University Paul Sabatier Toulouse, and ANR-Carina (ANR-12-BSV1-0016-01). COST Action CM1001 is gratefully acknowledged. Sandra Garoby-Salom is recipient of an Inserm “Poste d’Accueil” fellowship.

References

- [1] A.E. Cremesti, F.M. Goni, R. Kolesnick, Role of sphingomyelinase and ceramide in modulating rafts: do biophysical properties determine biologic outcome? *FEBS Letters* 531 (1) (2002) 47–53. [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)03489-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03489-0)
- [2] C.J. Clarke, C.F. Snook, M. Tani, N. Matmati, N. Marchesini, Y.A. Hannun, The extended family of neutral sphingomyelinases, *Biochemistry* 45 (38) (2006) 11247–11256. <http://dx.doi.org/10.1021/bi061307z>
- [3] R. Kolesnick, Z. Fuks, Ceramide: a signal for apoptosis or mitogenesis? *Journal of Experimental Medicine* 181 (6) (1995) 1949–1952. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.181.6.1949>
- [4] W.D. Jarvis, S. Grant, R.N. Kolesnick, Ceramide and the induction of apoptosis, *Clinical Cancer Research* 2 (1996) 1–6. <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-95-0082>
- [5] C.A. Hetz, M. Hunn, P. Rojas, V. Torres, L. Leyton, A.F. Quest, Caspase-dependent initiation of apoptosis and necrosis by the Fas receptor in lymphoid cells: onset of necrosis is associated with delayed ceramide increase, *Journal of Cell Science* 115 (23) (2002) 4671–4683. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.00153>
- [6] Y.A. Hannun, L.M. Obeid, Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9 (2) (2008) 139–150. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2329>
- [7] M. Nikolova-Karakashian, A. Karakashian, K. Rutkute, Role of neutral sphingomyelinases in aging and inflammation, *Subcellular Biochemistry* 49 (2008) 469–486. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4020-8831-5_18
- [8] M. Maceyka, K.B. Harikumar, S. Milstien, S. Spiegel, Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease, *Trends in Cell Biology* 22 (1) (2012) 50–60. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2011.09.003>
- [9] O. Cuvillier, G. Pirianov, B. Kleuser, P.G. Vanek, O.A. Coso, S. Gutkind, S. Spiegel, Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate, *Nature* 381 (6585) (1996) 800–803. <http://dx.doi.org/10.1038/381800a0>
- [10] B. Liu, Y.A. Hannun, Inhibition of the neutral magnesium-dependent sphingomyelinase by glutathione, *Journal of Biological Chemistry* 272 (26) (1997) 16281–16287. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.272.26.16281>
- [11] R. Devillard, S. Galvani, J.C. Thiers, J.L. Guenet, Y. Hannun, J. Bielawski, A. Nègre-Salvayre, R. Salvayre, N. Augé, Stress-induced sphingolipid signaling: role of type-2 neutral sphingomyelinase in murine cell apoptosis and proliferation, *PLoS One* 5 (3) (2010) e9826. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0009826>
- [12] C. Cinq-Frais, C. Coatrieux, M.H. Grazide, Y.A. Hannun, A. Nègre-Salvayre, R. Salvayre, N. Augé, A signaling cascade mediated by ceramide, src and PDGFR β coordinates the activation of the redox-sensitive neutral sphingomyelinase-2 and sphingosine kinase-1, *Biochimica et Biophysica Acta* 1831 (8) (2013) 1344–1356. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.04.014>
- [13] P.P. Dotson, A.A. Karakashian, M.N. Nikolova-Karakashian, Neutral sphingomyelinase-2 is a redox sensitive enzyme: role of catalytic cysteine residues in regulation of enzymatic activity through changes in oligomeric state, *Biochemical Journal* (2014). <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20140665>
- [14] D. Pchejetski, O. Kunduzova, A. Dayon, D. Calise, M.H. Seguelas, N. Leducq, I. Seif, A. Parini, O. Cuvillier, Oxidative stress-dependent sphingosine kinase-1 inhibition

- mediates monoamine oxidase A-associated cardiac cell apoptosis, *Circulation Research* 100 (1) (2007) 41–49. <http://dx.doi.org/10.1161/01.RES.0000253900.66640.34> 17158340.
- [15] K. Hofmann, S. Tomiuk, G. Wolff, W. Stoffel, Cloning and characterization of the mammalian brain-specific, Mg²⁺-dependent neutral sphingomyelinase, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (11) (2000) 5895–5900. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.97.11.5895> 10823942.
 - [16] W. Stoffel, B. Jenke, B. Blöck, M. Zumbansen, J. Koebke, Neutral sphingomyelinase 2 (*smpd3*) in the control of postnatal growth and development, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (12) (2005) 4554–4559. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0406380102> 15764706.
 - [17] I. Aubin, C.P. Adams, S. Opsahl, D. Septier, C.E. Bishop, N. Auge, R. Salvayre, A. Nègre-Salvayre, M. Goldberg, J.L. Guénet, C. Poirier, A deletion in the gene encoding sphingomyelin phosphodiesterase 3 (*Smpd3*) results in osteogenesis and dentinogenesis imperfecta in the mouse, *Nature Genetics* 37 (8) (2005) 803–805. <http://dx.doi.org/10.1038/ng1603> 16025116.
 - [18] W. Stoffel, B. Jenke, B. Holz, E. Binczek, R.H. Günter, J. Knifka, J. Koebke, A. Niehoff, Neutral sphingomyelinase (SMPD3) deficiency causes a novel form of chondrodysplasia and dwarfism that is rescued by Col2A1-driven *smpd3* transgene expression, *American Journal of Pathology* 171 (1) (2007) 153–161. <http://dx.doi.org/10.2353/ajpath.2007.061285> 17591962.
 - [19] S. Filosto, S. Castillo, A. Danielson, L. Franz, E. Khan, N. Kenyon, J. Last, K. Pinkerton, R. Tuder, T. Goldkorn, Neutral sphingomyelinase 2: a novel target in cigarette smoke-induced apoptosis and lung injury, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 44 (3) (2011) 350–360. <http://dx.doi.org/10.1165/rncmb.2009-0422OC> 20448054.
 - [20] M. Meyers-Needham, J.A. Lewis, S. Gencer, R.D. Sentelle, S.A. Saddoughi, C.J. Clarke, Y.A. Hannun, H. Norell, T.M. da Palma, M. Nishimura, J.M. Kravka, Z. Khavandgar, M. Murshed, M.O. Cevik, B. Ogretmen, Off-target function of the sonic hedgehog inhibitor cyclopamine in mediating apoptosis via nitric oxide-dependent neutral sphingomyelinase 2/ceramide induction, *Molecular Cancer Therapeutics* 11 (5) (2012) 1092–1102. <http://dx.doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0705> 22452947.
 - [21] Z. Khavandgar, C. Poirier, C.J. Clarke, J. Li, N. Wang, M.D. McKee, Y.A. Hannun, M. Murshed, A cell-autonomous requirement for neutral sphingomyelinase 2 in bone mineralization, *Journal of Cell Biology* 194 (2) (2011) 277–289. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201102051> 21788370.
 - [22] T. Michigami, Regulatory mechanisms for the development of growth plate cartilage, *Cellular and Molecular Life Sciences* 70 (22) (2013) 4213–4221. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-013-1346-9> 23640571.
 - [23] I.M. Shapiro, C.S. Adams, T. Freeman, V. Srinivas, Fate of the hypertrophic chondrocyte: microenvironmental perspectives on apoptosis and survival in the epiphyseal growth plate, *Birth Defects Research Part C: Embryo Today* 75 (4) (2005) 330–339. <http://dx.doi.org/10.1002/bdrc.20057> 16425255.
 - [24] C. Bedia, T. Levade, P. Codogno, Regulation of autophagy by sphingolipids, *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 11 (9) (2011) 844–853. <http://dx.doi.org/10.2174/187152011797655131> 21707487.
 - [25] B. Loos, A.M. Engelbrecht, R.A. Lockshin, D.J. Klionsky, Z. Zakeri, The variability of autophagy and cell death susceptibility: unanswered questions, *Autophagy* 9 (9) (2013) 1270–1285. <http://dx.doi.org/10.4161/auto.25560> 23846383.
 - [26] G. Mariño, M. Niso-Santano, E.H. Baehrecke, G. Kroemer, Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15 (2) (2014) 81–94. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3735> 24401948.
 - [27] S. Pattinige, C. Bauvy, T. Levade, B. Levine, P. Codogno, Ceramide-induced autophagy: to junk or to protect cells? *Autophagy* 5 (4) (2009) 558–560. <http://dx.doi.org/10.4161/auto.5.4.8390> 19337026.
 - [28] A.L. Edinger, Starvation in the midst of plenty: making sense of ceramide-induced autophagy by analysing nutrient transporter expression, *Biochemical Society Transactions* 37 (1) (2009) 253–258. <http://dx.doi.org/10.1042/BST0370253> 19143642.
 - [29] J. Qin, E. Berdyshev, C. Poirier, N.B. Schwartz, G. Dawson, Neutral sphingomyelinase 2 deficiency increases hyaluronan synthesis by up-regulation of hyaluronan synthase 2 through decreased ceramide production and activation of Akt, *Journal of Biological Chemistry* 287 (17) (2012) 13620–13632. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111.304857> 22383528.
 - [30] Y. Wang, M.E. Lauer, S. Anand, J.A. Mack, E.V. Maytin, Hyaluronan synthase 2 protects skin fibroblasts against apoptosis induced by environmental stress, *Journal of Biological Chemistry* 289 (46) (2014) 32253–32265. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M114.578377> 25266724.
 - [31] H. Xu, T. Ito, A. Tawada, H. Maeda, H. Yamanokuchi, K. Isahara, K. Yoshida, Y. Uchiyama, A. Asari, Effect of hyaluronan oligosaccharides on the expression of heat shock protein 72, *Journal of Biological Chemistry* 277 (19) (2002) 17308–17314. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M112371200> 11864979.
 - [32] I. Escargueil-Blanc, N. Andrieu-Abadie, S. Caspar-Bauguil, R. Brossmer, T. Levade, A. Nègre-Salvayre, R. Salvayre, Apoptosis and activation of the sphingomyelin-ceramide pathway induced by oxidized low density lipoproteins are not causally related in ECV-304 endothelial cells, *Journal of Biological Chemistry* 273 (42) (1998) 27389–27395. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.273.42.27389> 9765267.
 - [33] N. Auge, V. Garcia, F. Maupas-Schwalm, T. Levade, R. Salvayre, A. Nègre-Salvayre, Oxidized LDL-induced smooth muscle cell proliferation involves the EGF receptor/PI-3 kinase/Akt and the sphingolipid signaling pathways, *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 22 (12) (2002) 1990–1995. <http://dx.doi.org/10.1161/01.ATV.0000043453.21629.3B> 12482824.
 - [34] I. Escargueil-Blanc, R. Salvayre, A. Nègre-Salvayre, Necrosis and apoptosis induced by oxidized low density lipoproteins occur through two calcium-dependent pathways in lymphoblastoid cells, *FASEB J.* 8 (1994) 1075–1080.
 - [35] C. Vindis, M. Elbaz, I. Escargueil-Blanc, N. Augé, A. Heniquez, J.C. Thiers, A. Nègre-Salvayre, R. Salvayre, Two distinct calcium-dependent mitochondrial pathways are involved in oxidized LDL-induced apoptosis, *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 25 (3) (2005) 639–645. <http://dx.doi.org/10.1161/01.ATV.0000154359.60886.33> 15618541.
 - [36] W. Bursch, A. Karwan, M. Mayer, J. Dornetshuber, U. Fröhwein, R. Schulte-Hermann, B. Fazi, F. Di Sano, L. Piredda, M. Piacentini, G. Petrovski, L. Fésüs, C. Gerner, Cell death and autophagy: cytokines, drugs, and nutritional factors, *Toxicology* 254 (3) (2008) 147–157. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2008.07.048> 18694801.
 - [37] J.K. Lee, H.K. Jin, M.H. Park, B.R. Kim, P.H. Lee, H. Nakauchi, J.E. Carter, X. He, E. H. Schuchman, J.S. Bae, Acid sphingomyelinase modulates the autophagic process by controlling lysosomal biogenesis in Alzheimer's disease, *Journal of Experimental Medicine* 211 (8) (2014) 1551–1570. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20132451> 25049335.
 - [38] R. Fuchs, L. Martínez, A. Baulies, S. Torres, N. Tarrats, A. Fernandez, V. Ribas, A. M. Astudillo, J. Balsinde, P. Garcia-Rovés, M. Elena, I. Bergheim, S. Lotersztajn, C. Trautwein, H. Appelqvist, A.W. Paton, J.C. Paton, M.J. Czaja, N. Kaplowitz, J. C. Fernandez-Checa, C. García-Ruiz, ASMase regulates autophagy and lysosomal membrane permeabilization and its inhibition prevents early stage non-alcoholic steatohepatitis, *Journal of Hepatology* 61 (5) (2014) 1126–1134. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2014.06.009> 24946279.
 - [39] F.C. Luft, Acid sphingomyelinase, autophagy, and atherosclerosis, *Journal of Molecular Medicine (Berlin)* 92 (5) (2014) 429–431. <http://dx.doi.org/10.1007/s00109-014-1134-5> 24584950.
 - [40] J. Ye, H. Wu, Y. Wu, C. Wang, H. Zhang, X. Shi, J. Yang, High molecular weight hyaluronan decreases oxidative DNA damage induced by EDTA in human corneal epithelial cells, *Eye (London)* 26 (7) (2012) 1012–1020. <http://dx.doi.org/10.1038/eye.2012.89> 22595911.
 - [41] T. Pauloin, M. Dutot, J.M. Warnet, P. Rat, In vitro modulation of preservative toxicity: high molecular weight hyaluronan decreases apoptosis and oxidative stress induced by benzalkonium chloride, *European Journal of Pharmaceutical Science* 34 (4–5) (2008) 263–273. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2008.04.006> 18534829.
 - [42] R. Zhu, Y.H. Huang, Y. Tao, S.C. Wang, Ch. Sun, H.L. Piao, X.Q. Wang, M.R. Du, D.J. Li, Hyaluronan up-regulates growth and invasion of trophoblasts in an autocrine manner via PI3K/AKT and MAPK/ERK1/2 pathways in early human pregnancy, *Placenta* 34 (9) (2013) 784–791. <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2013.05.009> 23806178.
 - [43] G.M. Campo, A. Avenoso, S. Campo, A. D'Ascola, P. Traina, C.A. Rugolo, A. Calatroni, Differential effect of molecular mass hyaluronan on lipopolysaccharide-induced damage in chondrocytes, *Innate Immunity* 16 (1) (2010) 48–63. <http://dx.doi.org/10.1177/1753425909340419> 19710088.
 - [44] L. Galois, S. Etienne, C. Henrionnet, J. Scala-Bertola, L. Grossin, D. Mainard, P. Gillet, A. Pinzao, Ambivalent properties of hyaluronate and hyaluron during post-traumatic OA in the rat knee, *Bio-medical Materials and Engineering* 22 (4) (2012) 235–242. <http://dx.doi.org/10.3233/BME-2012-0713> 22785367.
 - [45] R.T. Dobrowsky, C. Kamibayashi, M.C. Mumby, Y.A. Hannun, Ceramide activates heterotrimeric protein phosphatase 2A, *Journal of Biological Chemistry* 268 (21) (1993) 15523–15530 8393446.
 - [46] S. Zolnierowicz, Type 2A protein phosphatase, the complex regulator of numerous signaling pathways, *Biochemical Pharmacology* 60 (8) (2000) 1225–1235. [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-2952\(00\)00424-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-2952(00)00424-X) 11007961.
 - [47] P.P. Ruvolo, Intracellular signal transduction pathways activated by ceramide and its metabolites, *Pharmacological Research* 47 (5) (2003) 383–392. [http://dx.doi.org/10.1016/S1043-6618\(03\)00050-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1043-6618(03)00050-1) 12676512.
 - [48] H.M. Beere, B.B. Wolf, K. Cain, D.D. Mosser, A. Mahboubi, T. Kuwana, P. Tailor, R. I. Morimoto, G.M. Cohen, D.R. Green, Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome, *Nature Cell Biology* 2 (8) (2000) 469–475. <http://dx.doi.org/10.1038/35019501> 10934466.
 - [49] A. Asari, S. Miyauchi, S. Matsuzaka, T. Ito, E. Kominami, Y. Uchiyama, Molecular weight-dependent effects of hyaluronate on the arthritic synovium, *Archives of Histology and Cytology* 61 (2) (1998) 125–135. <http://dx.doi.org/10.1679/aohc.61.125> 9650887.
 - [50] I. Escargueil-Blanc, R. Salvayre, A. Nègre-Salvayre, Necrosis and apoptosis induced by oxidized low density lipoproteins occur through two calcium-dependent pathways in lymphoblastoid cells, *FASEB Journal* 8 (13) (1994) 1075–1080 7926374.
 - [51] M.P. Muriel, J. Bonaventure, R. Stanescu, P. Maroteaux, J.L. Guénet, V. Stanescu, Morphological and biochemical studies of a mouse mutant (fro/fro) with bone fragility, *Bone* 12 (4) (1991) 241–248. [http://dx.doi.org/10.1016/8756-3282\(91\)90070-Y](http://dx.doi.org/10.1016/8756-3282(91)90070-Y) 1793673.
 - [52] H.I. Roach, T. Aigner, J.B. Kouri, Chondroptosis: a variant of apoptotic cell death in chondrocytes? *Apoptosis* 9 (3) (2004) 265–277 15258458.

4.1.3. Discussion

Les résultats présentés dans cet article montrent que la mutation de la nSMase2 ne protège pas les fibroblastes *fro/fro* de l'apoptose induite par les agents de stress comme déjà rapporté par Devillard et coll. (Devillard 2010). A l'inverse, les fibroblastes de souris sauvages, cultivés dans un milieu pauvre en nutriments (sans SVF ni glucose), meurent par apoptose, alors que les fibroblastes de souris *fro/fro* semblent résister à la mort cellulaire dans ces conditions. Le mécanisme de protection impliquerait une surexpression de HAS2, qui synthétise l'acide hyaluronique, et serait consécutive à l'activation continue d'Akt de par l'inhibition de la phosphatase PP2A, dont l'activation implique le céramide (Dobrowsky 1993). Ces résultats sont résumés dans le schéma ci-dessous (Fig 27).

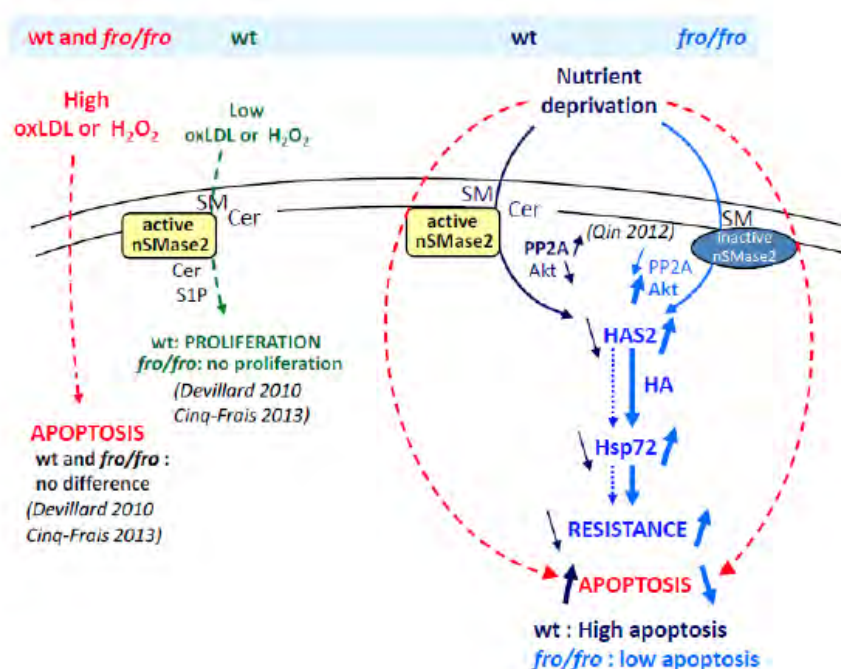


Figure 27 : Schéma résumant la sensibilité à l'apoptose des fibroblastes issus de souris wt ou *fro/fro*, en fonction des agents utilisés: LDL oxydées (oxLDL, 200 µg/ml); H₂O₂ (100 µM); privation en nutriments (milieu sans glucose, sans SVF).

Des résultats comparables sont retrouvés sur les cellules souches issues de moelle osseuse de souris sauvages ou *fro/fro*, différenciées en chondrocytes hypertrophiques et incubées dans un milieu pauvre en nutriments (Fig 28).

□

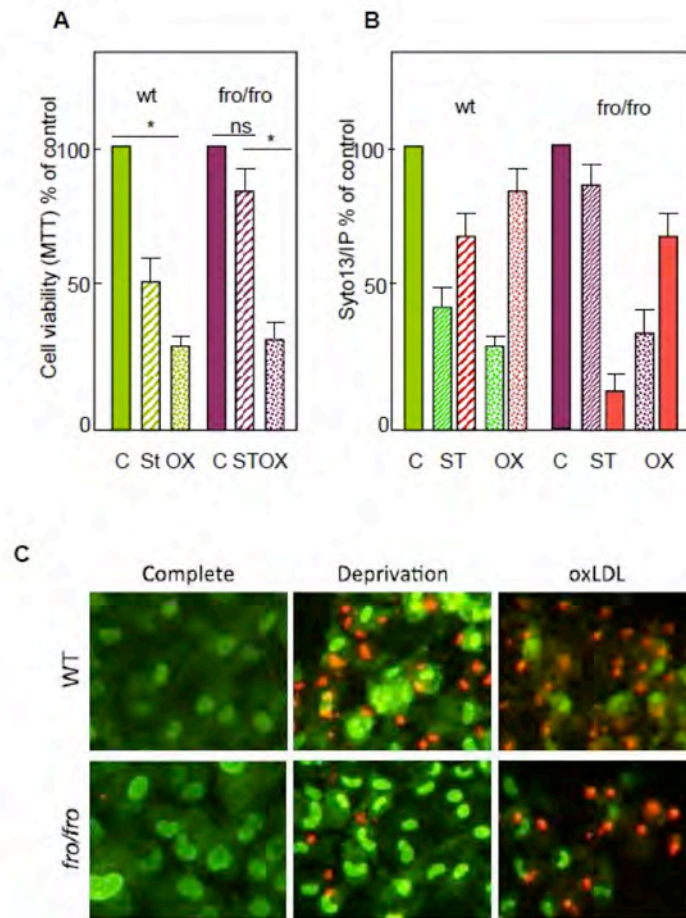


Figure 28: Les chondrocytes résistent à l'apoptose induite par la starvation en nutriments, mais pas à celle induite par les LDL oxydés. Les chondrocytes différenciés sub confluents issus de souris wt (wt) et fro/fro (fro) sont incubés pendant 48h dans un milieu de différenciation chondrogénique de DMEM/F12 contenant 5% SVF, ITS (compl) ou dans un milieu de culture DMEM sans SVF/glucose/pyruvate (condition de déprivation en nutriments) (starv, colonnes striées), ou en milieu RPMI sans SVF supplémenté en LDL oxydés (200mg apoB/ml). Après 48h d'incubation, la viabilité cellulaire est évaluée par MTT (A). (B) Comptage des cellules apoptotiques et vivantes après coloration au Syto13/IP qui permet de distinguer les cellules vivantes (colonnes vertes) et les cellules apoptotiques (apoptose primaire et nécrose post apoptotique) (colonnes orange pour les chondrocytes wt, colonnes rouges pour les chondrocytes de fro). Les cellules apoptotiques ont été comptées et exprimées en pourcentage par rapport au contrôle non stimulés. (C) Images représentant le marquage Syto13/IP dans les chondrocytes différenciés issus de souris wt et fro/fro.

Plusieurs études montrent que le céramide est impliqué dans l'autophagie, qui est une voie de survie permettant aux cellules de survivre sur leurs propres réserves lors de la privation en nutriments. Lorsque la situation se prolonge, l'autophagie induit la mort cellulaire (Bursch 2008). Le céramide est un puissant inducteur de mort par autophagie, car il diminue l'expression des transporteurs de nutriments (Guenther 2008). Une hypothèse est que l'autophagie pourrait être

déficiente dans les fibroblastes de souris *fro/fro*, du fait de l'absence de céramide. Cependant nos résultats montrent que les voies d'autophagie classiques, représentées par l'activation de la Becline-1 ou la conversion de LC3-I en LC3-II, ne sont pas affectées dans les fibroblastes de souris *fro/fro*, ce qui suggère que l'autophagie dans ces cellules n'implique pas le céramide généré par la nSMase2. Une autre source de céramide pourrait être impliquée dans cette voie, telle que la sphingomyélinase acide qui module l'autophagie dans plusieurs modèles physiopathologiques concernant la maladie d'Alzheimer, la stéatose hépatique ou l'athérosclérose (Lee 2014; Fucho 2014; Luft 2014).

La résistance des fibroblastes *fro/fro* à la privation de nutriments, implique la surexpression de HAS2 qui se traduit par la présence de grandes quantités d'acide hyaluronique (HA) dans le milieu extracellulaire (Qin 2012). HAS2 et HA ont des effets protecteurs connus contre l'apoptose générée par les stress environnementaux, tels que la privation en nutriments (Wang 2014). L'acide hyaluronique de haut poids moléculaire protège contre le stress oxydant et l'apoptose dans plusieurs types cellulaires, et pourrait donc protéger les cellules *fro/fro* (Pauloin 2008). L'inhibition de HAS2 par un inhibiteur pharmacologique, la méthylumbelliférone (MU), ou par l'utilisation de siRNA permet de réverser la résistance des fibroblastes *fro/fro* à l'apoptose. A l'inverse l'addition d'HA à des fibroblastes contrôles protège de l'apoptose induite par la privation en nutriments.

Ces résultats suggèrent que l'activation de HAS2 et la synthèse de HA ont un effet protecteur très puissant contre l'apoptose. La surexpression d'HAS2 serait due à l'activation soutenue d'Akt dans les cellules *fro/fro*, résultant de l'absence d'activation de la phosphatase PP2A, qui est normalement activée par le céramide (Qin 2012; Dobrowski 1993; Zolnierowicz 2000).

Il est à noter que la réversion de la résistance à l'apoptose des fibroblastes *fro/fro* via l'inhibition de HAS2 (avec la MU ou les siRNAs) montre que la nSMase2 n'est pas directement responsable de l'apoptose dans ces conditions (les cellules *fro/fro* meurent parce que HAS2 est inhibée alors que l'activation de la nSMase2 reste dysfonctionnelle dans ces cellules). Ces résultats confirment donc que la nSMase2 n'est sans doute pas impliquée dans l'apoptose, mais son inhibition génère une résistance à la privation en nutriments, via l'expression de HAS2 et la sécrétion d'HA. Les résultats que nous présentons, montrent que cette résistance s'accompagne d'une surexpression de la heat-shock protein antiapoptotique Hsp72, dont l'expression est régulée par HAS2 (Beere 2000).

En conclusion, les résultats de cette première partie montrent que l'inhibition de nSMase2 et de la génération de céramide, dûe à l'activation d'Akt et la « non-activation » de PP2A, génère une résistance des fibroblastes et des cellules souche *fro/fro* différenciées en

chondrocytes, à l'apoptose induite par la privation en nutriments. Cette résistance pourrait être un des mécanismes par lesquels les chondrocytes hypertrophiques chez la souris *fro/fro*, résistent à l'apoptose et présentent un retard de maturation dans la plaque de croissance des os longs. Dans la deuxième partie, nous avons étudié le mécanisme de maturation des chondrocytes chez la souris *fro/fro* et la place de la nSMase2 dans les dysfonctions de maturation observées.

4.2. Sphingomyélinase neutre et formation de l'os endochondral: Retard de différenciation et de maturation des chondrocytes chez la souris *fro/fro*

La différenciation terminale des chondrocytes hypertrophiques implique des événements apoptotiques essentiels à l'invasion des microvaisseaux et la vascularisation de l'os, la minéralisation et le remplacement des cartilages par les ostéoblastes et les ostéoclastes et le remodelage de l'os (Shapiro 2014). Récemment le groupe de Khavandgar et coll. (Khavandgar 2011), a rapporté que la minéralisation anormale observée chez les souriceaux *fro/fro* nouveaux-nés pourrait en partie résulter d'un défaut d'apoptose des chondrocytes hypertrophiques, qui est le stade terminal de leur maturation et différenciation. Nous avons étudié différents aspects de la maturation des chondrocytes chez la souris *fro/fro* et sur les cellules chondrocytaires en culture, et nous montrons plusieurs anomalies dans ce processus, ainsi que l'implication de la nSMase2 dans le défaut de maturation.

4.2.1. Accumulation de chondrocytes hypertrophiques et dysfonctionnement de l'apoptose dans les os longs des souris *fro/fro* nouveaux-nés

L'analyse du squelette des souriceaux *fro/fro* nouveaux-nés après coloration au bleu Alcyan (qui colore les cartilages) et au rouge d'Alizarine (qui met en évidence la minéralisation) montre les caractéristiques de la souris *fro/fro*, avec un nanisme, des membres courts et déformés et une minéralisation très réduite par comparaison avec les souris sauvages (Fig 29).

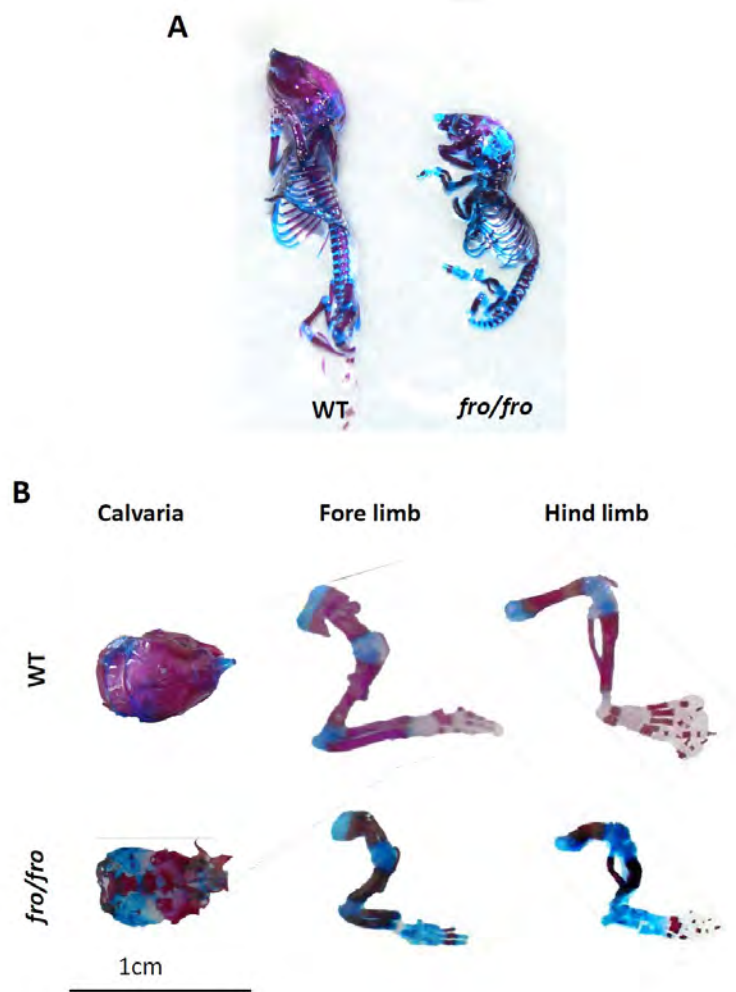


Figure 29: Phénotype des squelettes de souris wt (wt) et fro/fro nouveaux-nés âgés de 12h. (A) Coloration bleu alcyan (met en évidence le tissu cartilagineux)-rouge alizarine (met en évidence le tissu osseux) de squelettes de nouveau-nés wt et fro montrant que la souris fro/fro présente un nanisme, des membres courts et une minéralisation réduite par rapport à la souris wt. (B) Vue agrandie de la calvaria, des membres supérieurs et inférieurs des squelettes wt et fro/fro.

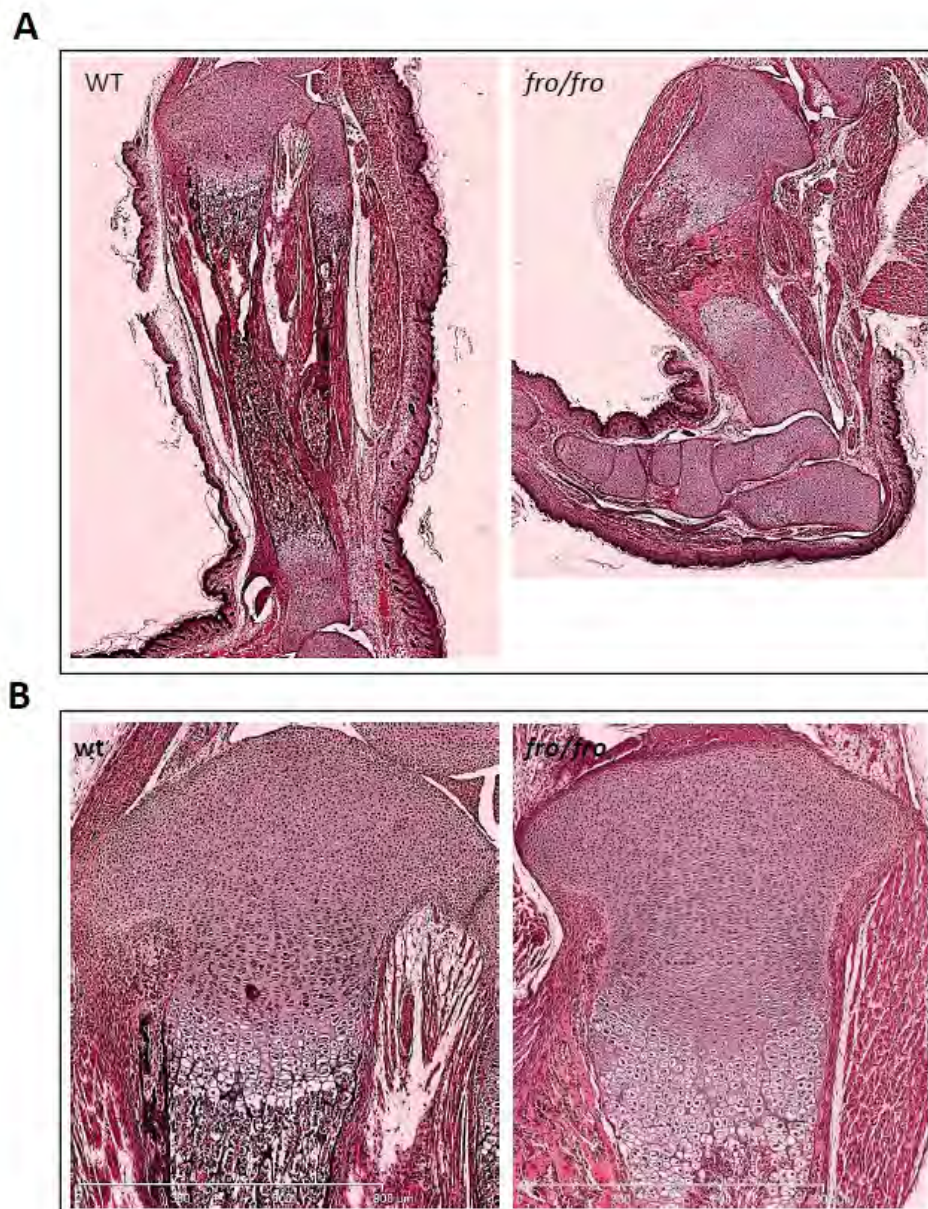


Figure 30: Etude histologique de tibias de souriceaux nouveaux-nés wt et fro/fro par coloration Hématoxyline/éosine. (A) Images NanoZoomer Hamamatsu 2.0 RS $\times 1,25$ montrent une angulation au niveau du tibia des souris fro/fro en comparaison à celui des souris wt. (B) Images NanoZoomer Hamamatsu 2.0 RS $\times 5$ montrent une accumulation des chondrocytes hypertrophiques dans les plaques de croissance des souris fro/fro par rapport aux wt.

La coloration à l'éosine/hématoxyline révèle une plaque de croissance élargie, avec une accumulation de chondrocytes hypertrophiques et des zones de chondrocytes en prolifération ou de réserve désorganisées (Fig 30).

Les colorations au bleu Alcyan et au Von-Kossa montre une absence de minéralisation de la plaque de croissance et l'accumulation de cartilage (Figs 31 et 32).

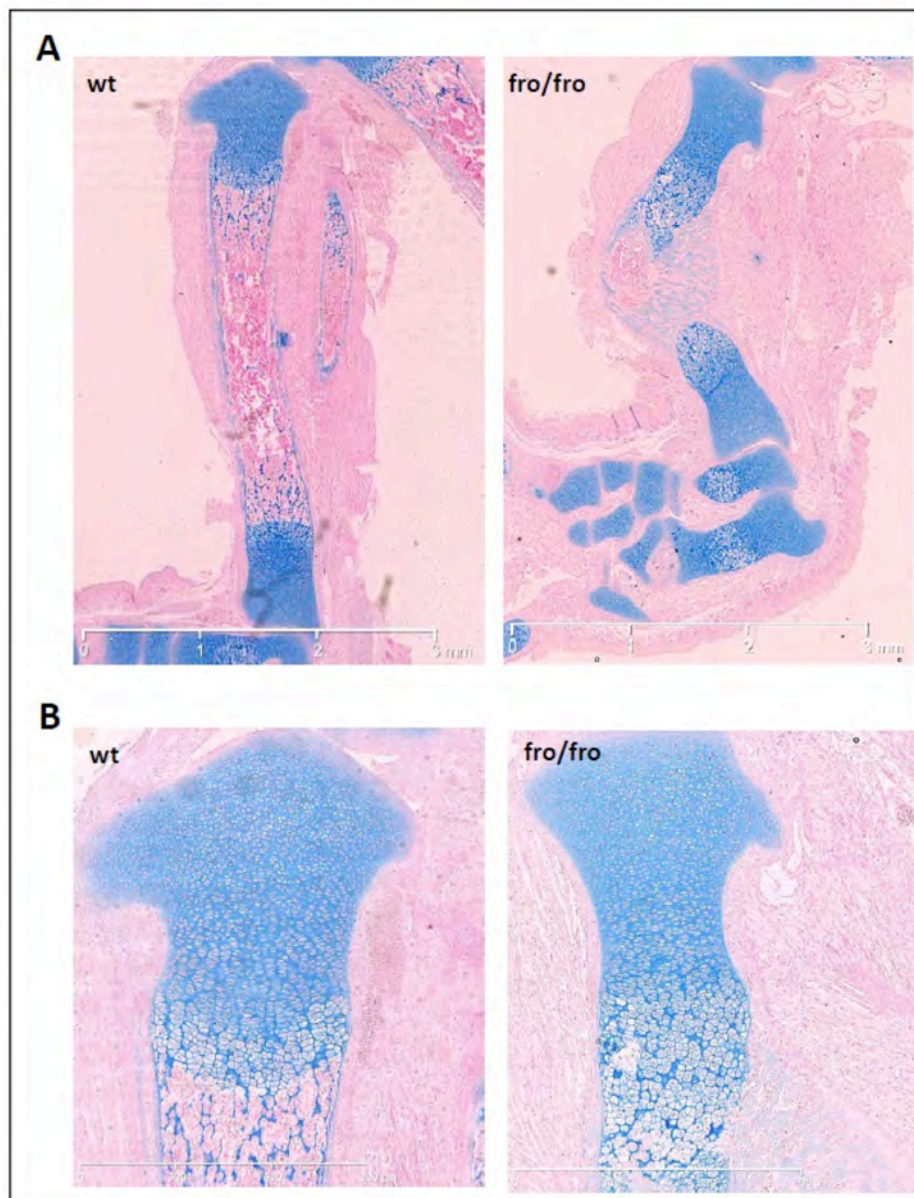


Figure 31: Coloration au bleu Alcian des tibias de souriceaux nouveaux-nés wt et fro/fro.

(A) Images NanoZoomer Hamamatsu 2.0 RS $\times 1,25$ montrant un défaut de chondrogenèse dans les pattes de souris fro/fro en comparaison aux souris wt. (B) Images NanoZoomer Hamamatsu 2.0 RS $\times 5$.

□

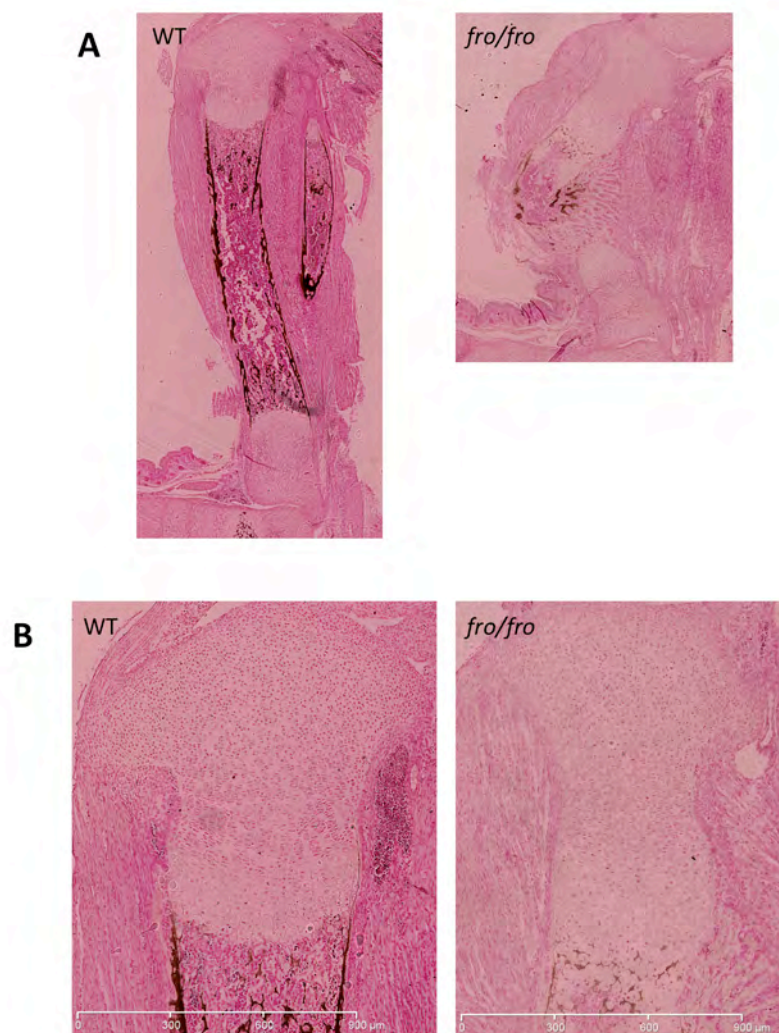


Figure 32: Etude de la minéralisation dans les tibias de souriceaux nouveaux-nés wt et fro/fro par coloration Von Kossa. (A) Images NanoZoomer Hamamatsu 2.0 RS $\times 1,25$. (B) Images NanoZoomer Hamamatsu 2.0 RS $\times 5$ montrent un défaut de minéralisation osseuse dans les pattes de souris fro/fro par rapport aux souris wt.

Nous avons ensuite étudié le déficit d'apoptose chez les souris *fro/fro* utilisées dans l'équipe et qui présentent le fond génétique 129/SJ original décrit par le groupe de Jean-Louis Guénet (Alebrahim 2014). En effet, le groupe de Murshed qui rapporte le déficit d'apoptose des chondrocytes hypertrophiques dans la plaque de croissance, a développé une souche de souris *fro/fro* présentant un fond génétique mixte C57/Bl6/129/SJ (Alebrahim 2014). La détection des cellules apoptotiques par marquage TUNEL (Fig 33) révèle un déficit d'apoptose des chondrocytes hypertrophiques comparable à celui décrit par Khavandgar

(Khavandgar 2011), confirmant que la différenciation terminale des chondrocytes hypertrophiques ne se fait pas correctement chez la souris *fro/fro*.

□

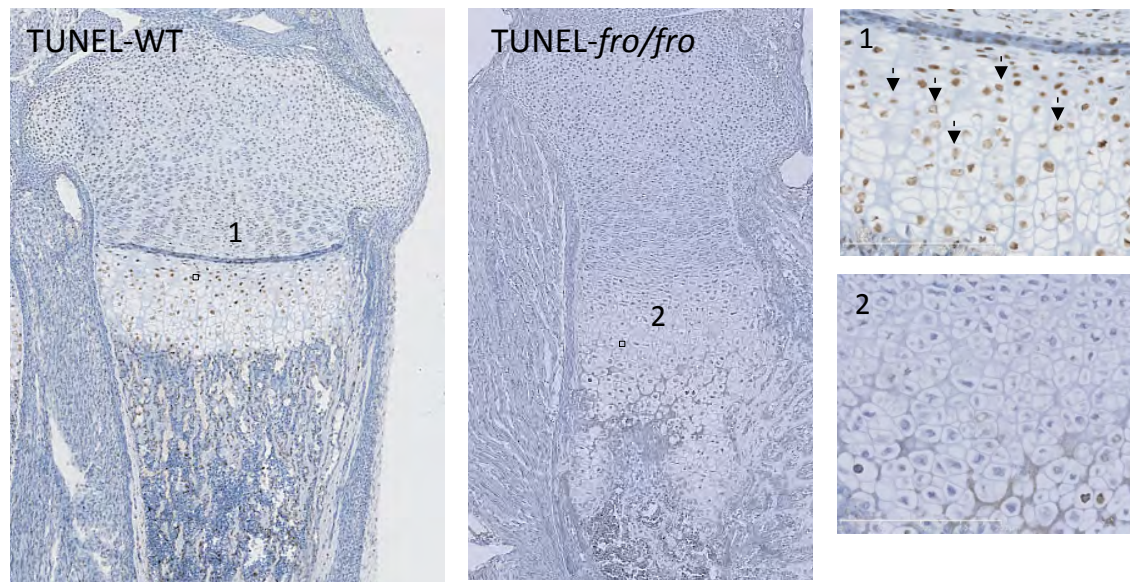


Figure 33: Etude de l'apoptose dans les tibias de souriceaux nouveaux-nés wt et fro/fro par marquage TUNEL. Les images NanoZoomer Hamamatsu 2.0 RS $\times 1,25$ montrent une accumulation des chondrocytes hypertrophiques et un défaut d'apoptose au niveau de la plaque de croissance des souris *fro/fro*. (1) Vue agrandie ($\times 5$) de la zone des chondrocytes hypertrophiques chez la souris wt montrant les chondrocytes TUNEL positifs en apoptose. (2) Vue agrandie ($\times 5$) de la zone des chondrocytes hypertrophiques chez la souris *fro/fro* montrant le déficit d'apoptose des chondrocytes hypertrophiques.

L'expression de la nSMase2 est retrouvée en immunofluorescence dans la zone des chondrocytes préhypertrophiques et hypertrophiques des souris wt (Fig 34). L'expression est plus faible et la localisation est différente dans la plaque de croissance des souris *fro/fro* (Fig 34).

□

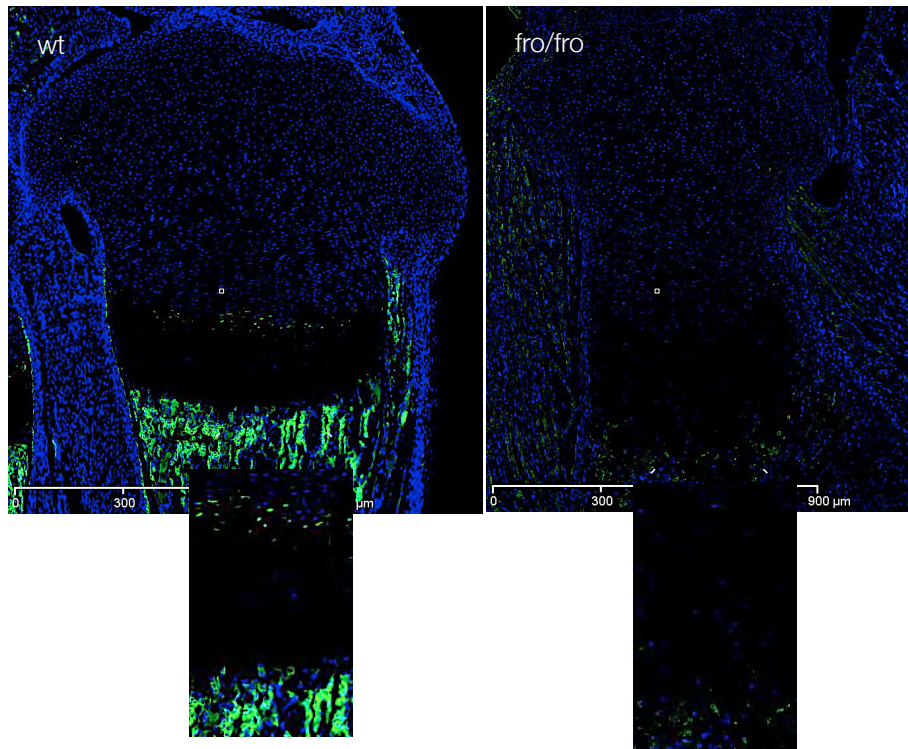


Figure 34: Expression de nSMase2 dans la plaque de croissance des tibias de souris nouveaux-nés wt et fro/fro. Images NanoZoomer Hamamatsu 2.0 RS $\times 5$.

Nous avons étudié le mécanisme par lequel la mutation de la nSMase2 génère le déficit d'apoptose, et son rôle dans la différenciation et la maturation des chondrocytes hypertrophiques.

4.2.2. Le retard de maturation des chondrocytes hypertrophiques est associé à un défaut d'expression du facteur de différenciation Runx2 et de MMP13

Le stade de différenciation terminale des chondrocytes hypertrophiques fait intervenir plusieurs effecteurs parmi lesquels Runx2, qui est un facteur précoce de la différenciation des ostéoblastes, mais joue également un rôle majeur dans la maturation des chondrocytes hypertrophiques, dans lesquels il est exprimé de façon transitoire (Saito 2010). Runx2 régule l'expression de plusieurs marqueurs de différenciation terminale, en particulier MMP13 qui est une métalloprotéase spécifiquement impliquée dans la dégradation de la matrice extracellulaire des chondrocytes hypertrophiques et dans la minéralisation de l'os (Studer 2012). Runx2 pourrait également réguler l'expression du collagène X, spécifique des chondrocytes hypertrophiques (Zheng 2003) ainsi que de Indian Hedgehog Homolog (Ihh) qui joue un rôle majeur dans la prolifération et la maturation des chondrocytes, *via* un rétrocontrôle positif sur PTHrP (parathyroid hormone-related peptide) (Vortkamp 1996).

Nous avons étudié l'expression de ces différents facteurs de maturation dans la plaque de croissance des souris sauvages et *fro/fro*. Runx2 et le collagène X sont présents dans les zones correspondant aux chondrocytes préhypertrophiques et hypertrophiques des souriceaux nouveaux-nés de phénotype sauvage (Figs 35 et 36). Runx2 est très faiblement exprimé chez la souris *fro/fro* (Fig 35), alors que le collagène X est exprimé de façon normale à légèrement augmentée (Fig 36).

Nous avons étudié l'expression du collagène II, qui est spécifique de l'os endochondral et du cartilage, et est dégradé par MMP13 dans la zone des chondrocytes hypertrophiques. Les résultats sont présentés dans la partie 4.3. de ce mémoire et montrent une réduction nette de l'expression du collagène II, en particulier dans la zone des chondrocytes de réserve (Fig 53 cf.Chap.4.3).

□

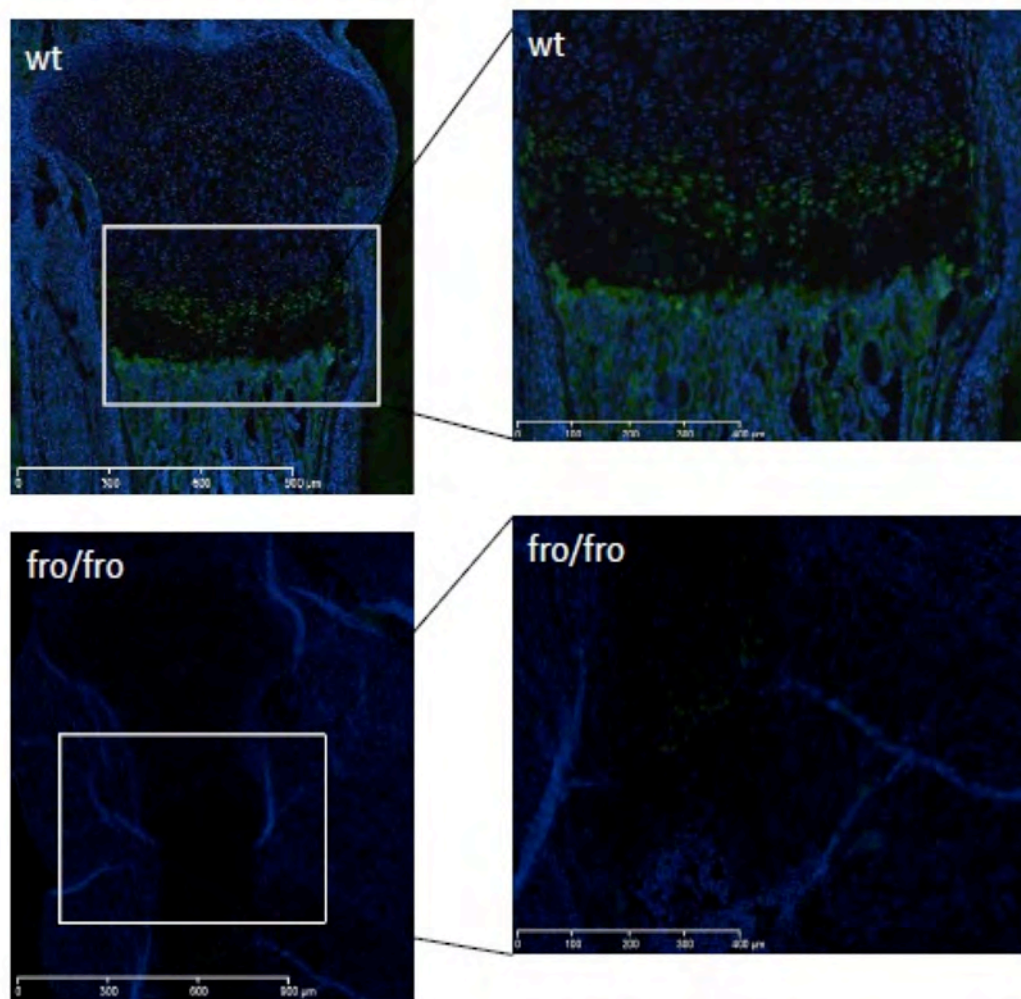


Figure 35 : Expression de Runx2 dans les plaques de croissances de tibias de souris nouveaux-nés wt et fro/fro. Images NanoZoomer Hamamatsu 2.0 RS x5 et x10.

□

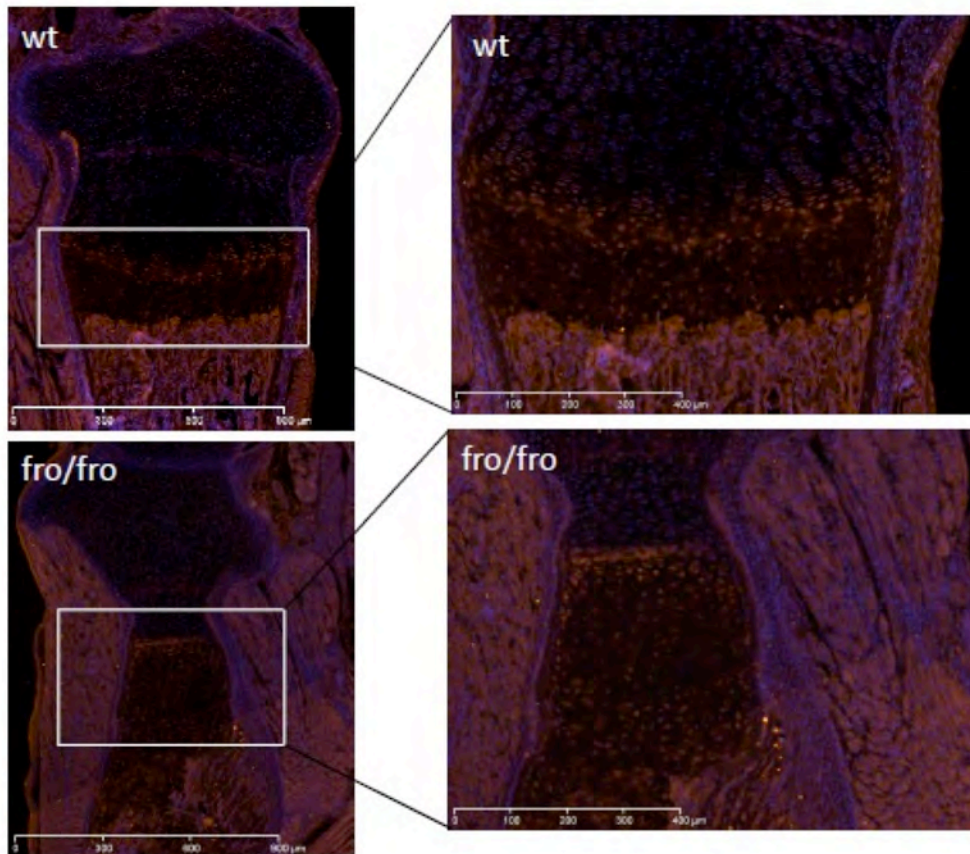


Figure 36: Expression du collagène X dans les plaques de croissances de tibias de souris nouveaux-nés wt et fro/fro. Images NanoZoomer Hamamatsu 2.0 RS $\times 5$ et $\times 10$.

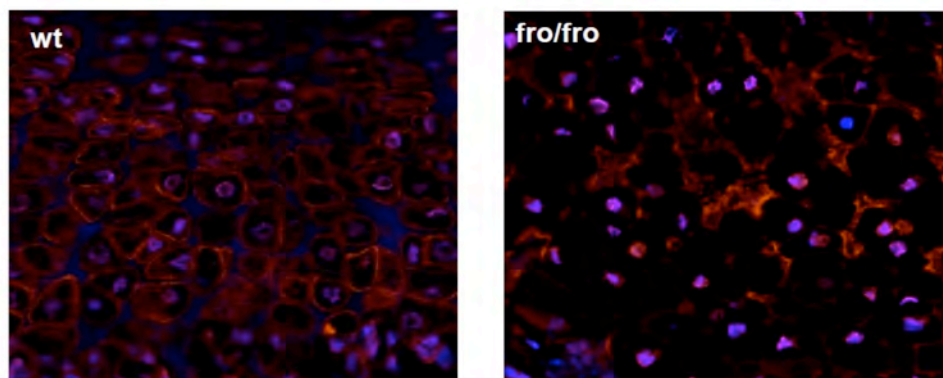


Figure 37 : Expression de MMP13 dans les chondrocytes hypertrophiques de tibias de souris nouveaux-nés wt et fro/fro. Images NanoZoomer Hamamatsu 2.0 RS $\times 20$.

MMP13 est exprimée dans la zone péri-cellulaire des chondrocytes hypertrophiques des souris sauvages, alors que son expression chez les *fro/fro* est plus faible et semble intracellulaire (Fig 37).

Ces résultats suggèrent que les chondrocytes sont bloqués au stade préhypertrophique dans la plaque de croissance des souris *fro/fro*, et que l'absence de minéralisation est associée à un défaut d'expression de Runx2 et MMP13. L'expression du collagène X normale à augmentée chez la souris *fro/fro*, serait indépendante de Runx2.

4.2.3. Défaut d'expression du VEGF et absence de vascularisation de l'os endochondral chez le nouveau-né *fro/fro*

L'environnement hypoxique de la plaque de croissance non vascularisée est favorable à l'expression du facteur de transcription Hif1 α qui régule l'expression du VEGF et la vascularisation de l'os (Shipani 2005).

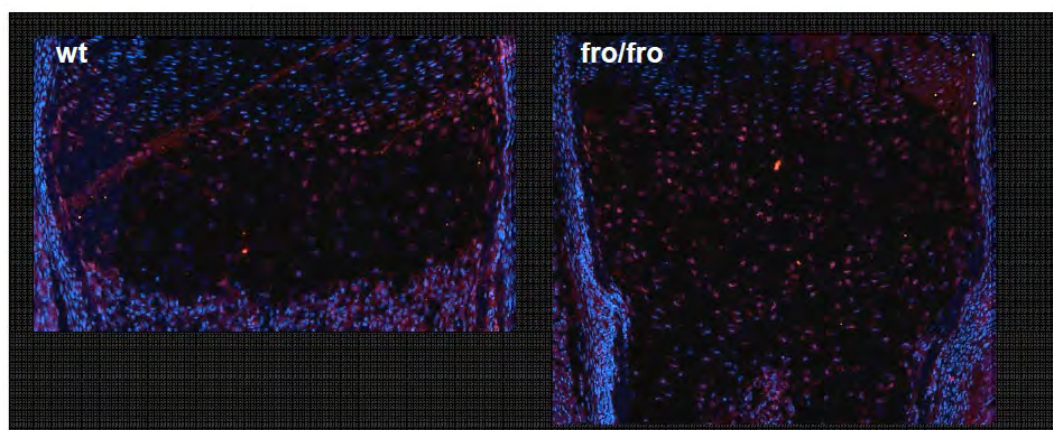


Figure 38 : Expression de Hif1 α dans les chondrocytes hypertrophiques de tibias de souris nouveaux-nés wt et *fro/fro*. Images NanoZoomer Hamamatsu 2.0 RS $\times 10$.

L'expression du facteur Hif1 α est observée dans la zone des chondrocytes pré-hypertrophiques chez la souris sauvage, et dans toute la plaque de croissance chez la souris *fro/fro* (Fig 38).

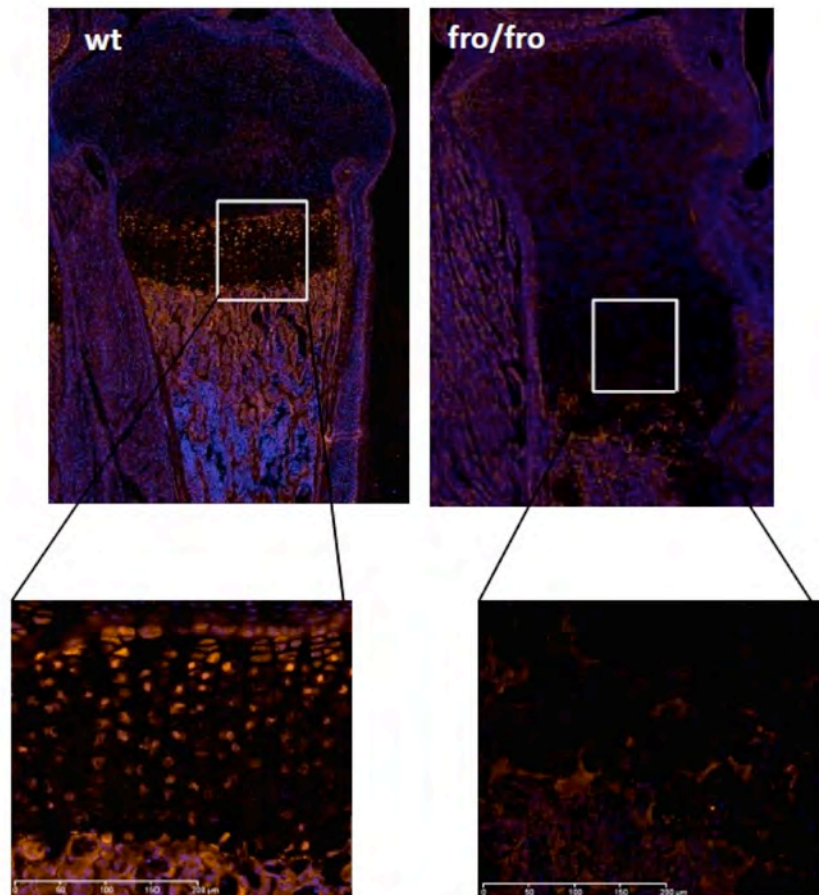


Figure 39: Expression du VEGF dans les tibias de souriceaux nouveaux-nés wt et fro/fro. Images NanoZoomer Hamamatsu 2.0 RS $\times 5$ et $\times 10$.

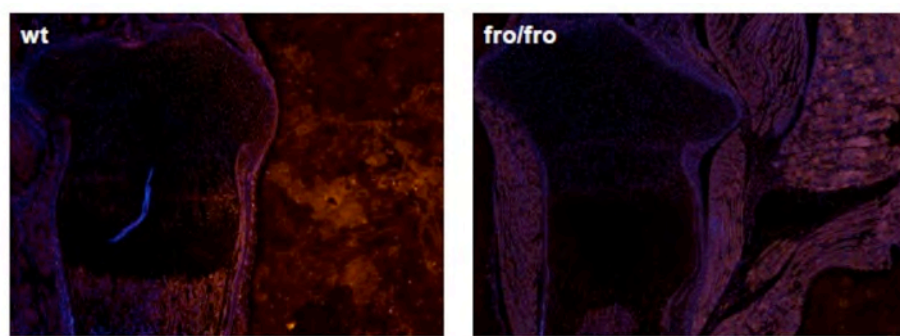


Figure 40: Expression du CD31 dans les tibias de souriceaux nouveaux-nés wt et fro/fro. Images NanoZoomer Hamamatsu 2.0 RS $\times 10$.

L'expression du VEGF qui contrôle l'invasion vasculaire dans la formation du centre d'ossification primaire et le remodelage de la plaque de croissance (Gerber 1999), est très faible chez la souris *fro/fro* (Fig 39). Il semble que cette diminution soit associée à une absence de

vascularisation mise en évidence par le marquage du CD31, spécifique des cellules endothéliales, et non retrouvée chez la souris *fro/fro*, contrairement aux souris sauvages (Fig 40).

4.2.4. L'inhibition de la nSMase2 altère *in vitro* la différenciation et la maturation des cellules souches mésenchymateuses en chondrocytes

Les résultats obtenus en immunofluorescence sur les pattes des souris *fro/fro* nouveaux-nés, montrent que le déficit d'activité de nSMase2 s'accompagne d'un retard sévère de maturation des chondrocytes hypertrophiques, et donc une absence de vascularisation et de minéralisation du centre d'ossification primaire.

Nous avons étudié ces événements *in vitro* sur cellules souches mésenchymateuses (MSC) issues de moelle osseuse de souris *fro/fro* et sauvage, ou sur la lignée de MSC préchondrocytaire C3H10T1/2.

Les C3H10T1/2 ou les MSC de moelle osseuse sont cultivées pendant deux semaines dans un milieu DMEM de différenciation contenant du TGF β 3, ITS et la dexaméthasone, en présence d'un inhibiteur de nSMase2, le GW4869. La différenciation des chondrocytes est suivie par la mesure des ARN messagers de MMP13 et Col10A1 en qRT-PCR.

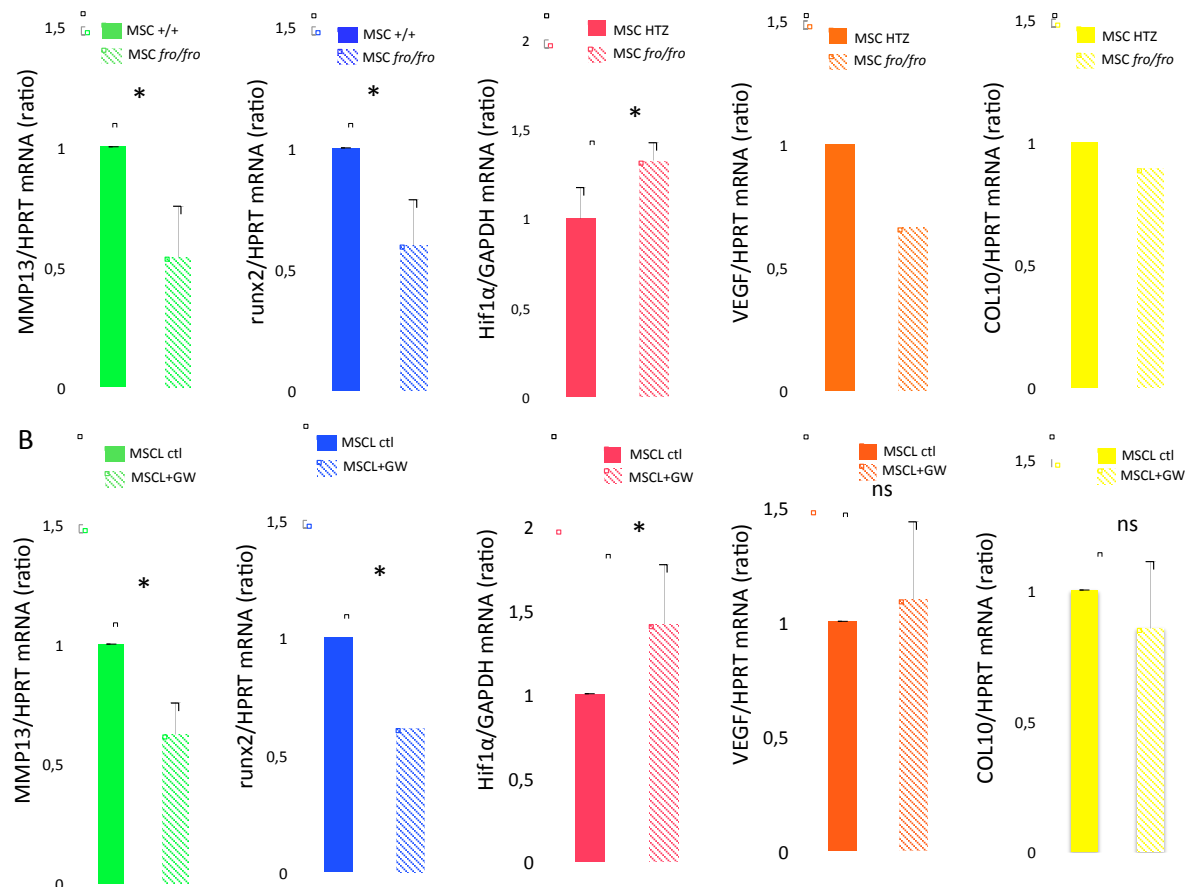


Figure 41: Expression des ARN messagers de MMP13, Runx2, VEGF et Col10A1 évalués par qRT-PCR et normalisés à HPRT. (A) MSC issues de souris wt (MSC+/+) et fro/fro (MSC fro/fro). (B) Lignée C3H10T1/2 contrôle (MSCL) ou traitées par le GW4869, inhibiteur de nSMase (5 µM) (MSCL +GW). Les cellules sont cultivées deux semaines en milieu de différenciation chondrocytaire (stimulation TGFβ3).

Comme observé dans la figure 41, l'expression des ARN messagers de Col10A1 est comparable entre les MSC de souris contrôles et les souris *fro/fro*, ou dans la lignée C3H10T1/2 différenciée en chondrocytes hypertrophiques en présence de GW4869 (Fig41). A l'inverse on note une diminution de l'expression de Runx2 et MMP13 mRNAs dans les cellules issues de souris *fro/fro* et dans les C3H10T1/2 différenciées avec GW4869, en corrélation avec la faible expression de ces facteurs dans l'os endochondral. L'expression des ARNm du VEGF n'est pas diminuée dans les C3H10T1/2 en présence de GW4869. Des résultats comparables sont observés en western-blot (Fig 41), qui montre que le GW4869 seul aurait peu d'effet sur l'expression protéique du VEGF, suggérant l'implication d'autres voies dans l'inhibition d'expression du VEGF.

Ces résultats confirment que la mutation de nSMase2 a des conséquences majeures sur d'une part l'expression du VEGF et la vascularisation, et d'autre part sur l'expression de Runx2, MMP13 et la minéralisation de l'os dans la plaque de croissance, tous ces paramètres

dysfonctionnels s'accompagnant *in vivo* d'une absence d'apoptose et donc de maturation terminale des chondrocytes hypertrophiques.

Le mécanisme conduisant à l'apoptose des chondrocytes ou 'chondroptose' caractéristique de la mort programmée des chondrocytes dans la plaque de croissance, implique plusieurs voies de signalisation dont l'autophagie et le stress du réticulum endoplasmique (Roach 2004). Nous avons étudié l'expression de ces voies dans l'os endochondral de la souris *fro/fro*.

4.2.5. Le dysfonctionnement de l'apoptose des chondrocytes pré-hypertrophiques est associé à une diminution des marqueurs d'autophagie et une induction du stress du réticulum endoplasmique

- Autophagie

En accord avec les travaux du groupe de Shapiro (Pucci 2007; Shapiro 2014), nous retrouvons une expression marquée des marqueurs d'autophagie LC3I/II et Becline-1 dans les zones pré-hypertrophiques et hypertrophiques chez la souris sauvage (Fig 42). L'expression de LC3I/II ne montre pas de différence majeure entre les souris sauvages et *fro/fro*. A l'inverse, l'expression de Becline-1, qui est induite au cours du processus de l'autophagie, est diminuée chez la souris *fro/fro*.

□

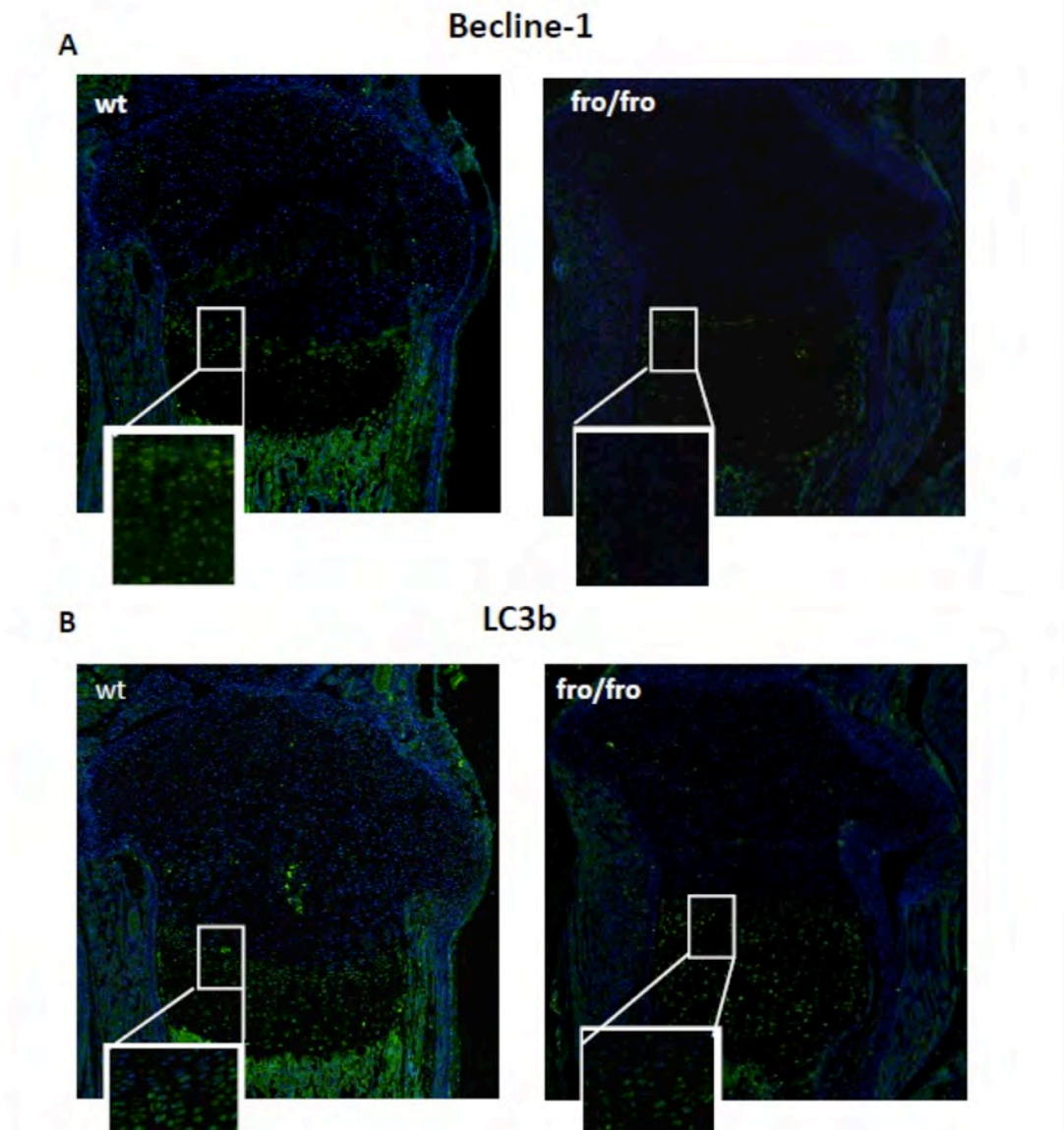


Figure 42: Expression des marqueurs d'autophagie Becline-1 (A) et LC3b (B) dans les tibias de souris nouveaux-nés wt et *fro/fro*. Images NanoZoomer Hamamatsu 2.0 RS $\times 5$ et $\times 20$.

Nous avons étudié le mécanisme impliqué dans le déficit d'autophagie de l'os endochondral chez la souris *fro/fro*. Une première hypothèse est que cette expression réduite pourrait résulter de l'absence de céramide généré dans la zone des chondrocytes hypertrophiques, du fait de la mutation de nSMase2. En effet le céramide est un inducteur d'autophagie de par son effet inhibiteur sur les transporteurs en nutriments (Guenther 2008). Lors de nos travaux précédents (Garoby-Salom 2015), nous avons montré que la mutation de la nSMase2 s'accompagne d'une activation soutenue d'Akt dans les fibroblastes et les

chondrocytes issus de ces souris. Or la voie PI3K/Akt active mTOR qui est un inhibiteur de l'autophagie, *via* la phosphorylation de ULK1 sur sérine-757, ce qui inhibe la formation de l'autophagosome en particulier dans les conditions de privation en nutriments (Egan 2011; Mao 2011).

□

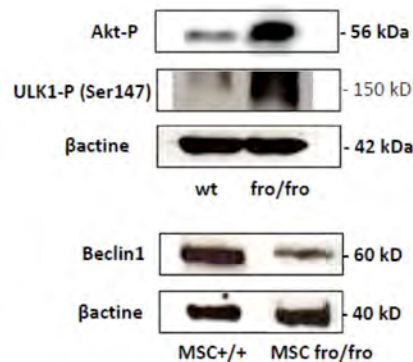


Figure 43: Expression de phospho Akt et de ULK1 phosphorylé sur sérine-757 dans des homogénats de tibias prélevés sur embryons wt et fro/fro au stade 18 (E18), et expression de Becline-1 sur chondrocytes différenciés en culture, provenant de souris sauvage (+/+) et fro/fro.

Nous avons étudié la phosphorylation de ULK1 par western-blot, sur les homogénats d'os de souriceaux *fro/fro* nouveaux-nés. Nos résultats montrent que Akt est activé et ULK1 est phosphorylé sur sérine-757 (Fig 43). De même l'étude de l'expression de Becline-1 dans des chondrocytes en culture issus de souris wt et *fro/fro*, montrent une diminution de l'expression de Becline-1 en accord avec les résultats très faibles observés en immunofluorescence et avec l'absence d'induction de l'autophagie dans la plaque de croissance des souris *fro/fro*.

Le complexe ATG1/ULK1 joue un rôle essentiel dans l'autophagie induite par la privation en nutriments, et est régulé par phosphorylation qui soit inhibe la formation du complexe (sérine 757 phosphorylée par mTOR), ou l'active *via* plusieurs sites phosphorylés par AMPK dont sérine 555 (Egan 2011). La phosphorylation de ULK1 sur sérine 757 dans l'os endochondral de la souris *fro/fro* dépend de mTOR qui est probablement constitutivement activé dans les chondrocytes *fro/fro*. ULK1 ne peut pas former de complexes d'autophagosome, car son activité kinase est inhibée et donc il ne peut pas induire ni phosphoryler Becline-1 et activer la voie de l'autophagie. L'activation de mTOR dans les cellules et tissus de souris *fro/fro* serait due

à l'activation soutenue d'Akt résultant de l'inhibition de la phosphatase PP2A qui est normalement activée par le céramide, et qui déphosphoryle (donc inhibe) Akt (Qin 2012; Garoby-Salom 2015). Par ailleurs, Akt est un inhibiteur d'autophagie, qui inhibe Becline-1 par phosphorylation (Wang 2012).

Le déficit d'autophagie observé chez la souris *fro/fro* pourrait contribuer à l'inhibition de l'apoptose des chondrocytes hypertrophiques, puisque l'autophagie permet la survie des chondrocytes en cours de maturation terminale, tout en les fragilisant et en les préparant à l'apoptose (Shapiro 2014). Ce déficit n'est cependant pas en cause dans l'absence de minéralisation observée dans les os des souris. En effet l'addition de Bafilomycine, un marqueur de fusion entre l'autophagosome et les lysosomes, n'a pas d'effet majeur sur l'expression du VEGF (ARN messagers et protéine) (résultats non montrés), et de plus, augmente très fortement l'expression des ARN messagers de MMP13 (Fig 44) à l'inverse de ce qui est observé dans les cellules et la plaque de croissance de souris *fro/fro*. L'utilisation d'un autre inhibiteur, la 3-méthyladenine, stimule également fortement l'expression de MMP13, ce qui suggère que l'inhibition de l'autophagie accélère la maturation et la minéralisation de l'os endochondral, (comme décrit lors de l'inhibition de Hif1 α (Shapiro 2014) alors que chez la souris *fro/fro*, l'expression de MMP13 (ARNm et immunofluorescence), est très faible, et l'os n'est pas minéralisé.

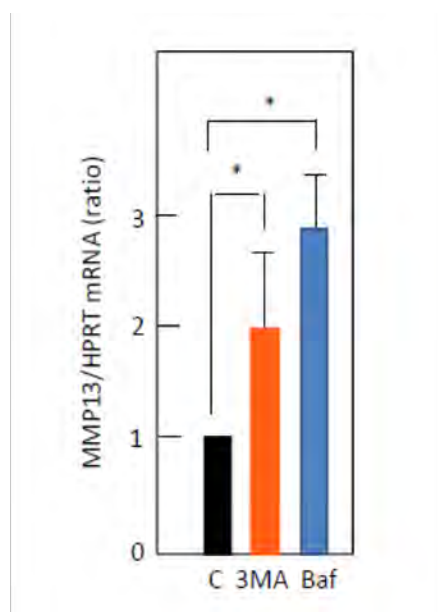


Figure 44: Expression des ARNm de MMP13 dans les cellules souches mésenchymateuses C3H10T1/2. Les cellules sont différenciées pendant 2 semaines en présence d'inhibiteurs de l'autophagie la 3-méthyl-adénine (3MA, 2 μ M) et la bafilomycine (Baf, 100 nM).

Ces résultats indiquent que l'autophagie, bien que déficiente chez la souris *fro/fro*, n'est sans doute pas responsable de la dysfonction observée dans la maturation des chondrocytes hypertrophiques, car le mécanisme de minéralisation de l'os est déficient à la différence de ce qui est observé avec les inhibiteurs d'autophagie. Nous avons étudié également l'induction de l'ER stress qui accompagne l'autophagie et prépare les chondrocytes à l'apoptose (Roach 2004 ; Shapiro 2014).

- ER stress

L'expression des marqueurs de stress du réticulum endoplasmique (ER stress), dans la plaque de croissance, est différente entre les souris wt et *fro/fro*. Chez la souris wt, on observe une expression élevée de la protéine chaperonne antiapoptotique Bip (GRP78), qui maintient la stabilité des sensors de l'ER stress à l'état basal (Tu 2004; Marciniak 2006) (Fig 45).

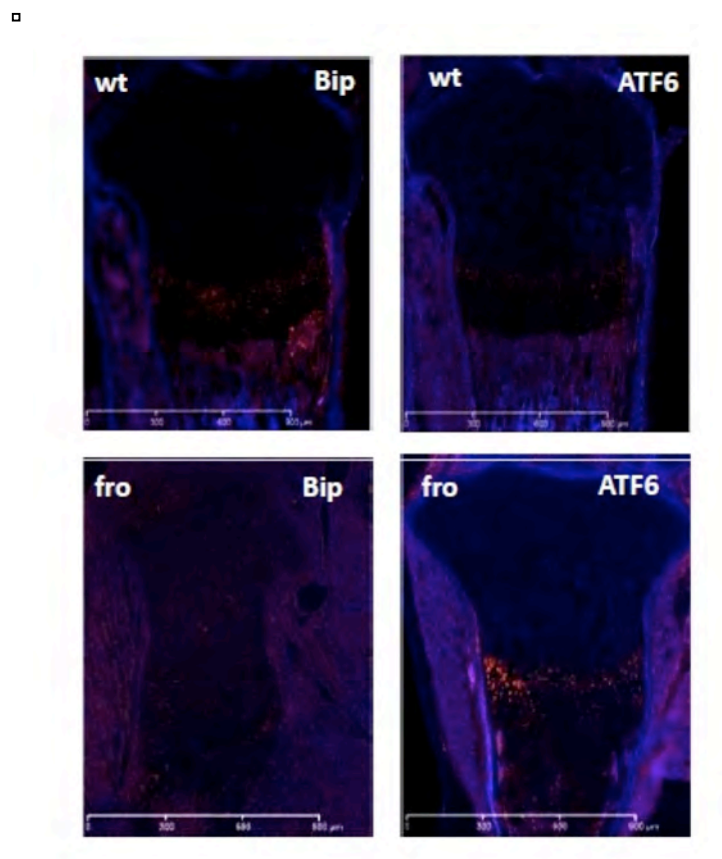


Figure 45 : Etude de l'ER stress dans les tibias de souricaux nouveaux-nés wt et *fro/fro*. Marquage par immunofluorescence de Bip et ATF6. Images NanoZoomer Hamamatsu 2.0 RS x5.

Chez la souris *fro/fro*, l'expression de Bip est très faible alors que le facteur ATF6, (un des 'sensors' de l'ER stress, Sano 2013), est très fortement exprimé (Fig 45). On observe également une expression élevée du facteur proapoptotique CHOP (résultat non montré). Il semble donc que le stress du RE soit plus actif chez la souris *fro/fro*, que chez la souris wt. Or le rôle du stress du RE dans l'apoptose des chondrocytes hypertrophiques est peu connu. Roach décrit l'induction de l'ER stress comme complémentaire de l'autophagie lors de la 'chondroptose', les deux voies étant considérées comme inductrices de l'apoptose des chondrocytes hypertrophiques (Roach 2004). Dans la chondrodysplasie de Schmid, caractérisée par une mutation de *Col10A1*, avec un nanisme, des membres courts et déformés et une accumulation de chondrocytes hypertrophiques (Schmid 1949; Savariarayan 2003), on observe une activation importante du stress du RE et de l'UPR, qui pourrait résulter de l'accumulation intracellulaire du collagène X muté. La différenciation des chondrocytes hypertrophiques est diminuée, de même que le recrutement des ostéoclastes, du fait du taux très réduit de l'expression du VEGF et de l'absence de vascularisation de la plaque de croissance (Savariarayan 2003). Le développement d'une souris transgénique avec un système utilisant le promoteur de *Col10A1*, et codant pour la thyroglobuline, une protéine précurseur des hormones thyroïdiennes, inductrice de l'ER stress, reproduit un phénotype proche de celui de la chondrodysplasie de Schmid, avec une plaque de croissance élargie, une accumulation de chondrocytes hypertrophiques et un défaut de vascularisation (Rajpar 2009). Les auteurs proposent que l'induction du stress du RE serait à l'origine de l'accumulation de chondrocytes hypertrophiques dans la plaque de croissance et de ses conséquences dans les pathologies associées à l'expression de protéines mutantes de la matrice extracellulaire de l'os endochondral (Rajpar 2009).

Une hypothèse comparable pourrait être envisagée chez la souris *fro/fro* qui semble présenter un stress du RE chronique résultant peut-être de l'accumulation de nSMase2 mutante. Cependant le phénotype des souris mutantes pour le collagène X (qui reproduit les caractéristiques de la chondrodysplasie de Schmid), n'est pas le même que celui de la souris *fro/fro* (nanisme moins marqué, défaut de minéralisation différent, pas de courbure des os longs chez les animaux nouveaux-nés) (Kwan 1997; Rajpar 2009). De plus l'induction du stress du RE semble différente, puisque dans le cas du collagène X, on observe une surexpression de Bip, qui est downrégulée chez la souris *fro/fro*.

Une autre possibilité est que le stress du RE chez la souris *fro/fro* pourrait être réactionnel au défaut d'apoptose, comme suggéré par les travaux de Han (Han 2013), qui montrent que la surexpression d'ATF6 inhibe la prolifération des chondrocytes et active leur apoptose en up-régulant CHOP et caspase 3, ce qui suggère un rôle proapoptotique d'ATF6

dans l'os endochondral. Les résultats sont inversés lorsque ATF6 est downrégulé. Le rôle de cette voie semble cependant complexe, car l'induction d'ATF6 et de CHOP est observée aussi chez les souris sauvages, bien que moins intense et limitée aux chondrocytes préhypertrophiques. Par ailleurs l'expression de Bip (antiapoptotique) est réduite chez la souris *fro/fro*, alors qu'elle est up-régulée dans la zone pré-hypertrophique de la souris sauvage. Des études complémentaires seront nécessaires pour élucider le rôle du stress du RE dans l'apoptose des chondrocytes chez les souris *fro/fro*, cependant son implication semble plus réactionnelle (accumulation de nSMase2 mutée, dysfonction de maturation et d'apoptose des chondrocytes hypertrophiques...), que causale, puisqu'il est également présent chez la souris wt.

L'ensemble de ces résultats montre que les chondrocytes hypertrophiques dans la plaque de croissance des souris *fro/fro*, ont un phénotype immature, avec un déficit d'expression des marqueurs-clés des étapes de maturation terminale, en particulier Runx2 et MMP13 (absence de minéralisation) et VEGF (pas de vascularisation). Ces résultats sont reproduits *in vitro* dans les MSC de souris *fro/fro*, ou de souris sauvages en présence de GW4869.

Nous avons étudié l'hypothèse du rôle de HAS2 dans la différenciation des chondrocytes chez la souris *fro/fro*.

4.2.6. Rôle de HAS2 et de l'acide hyaluronique dans le défaut de différenciation des chondrocytes

Dans la première partie de ce mémoire, nous avons montré que la viabilité des fibroblastes *fro/fro* est plus élevée que celle des cellules sauvages dans des conditions de privation en nutriments (Garoby-Salom 2015). Cette résistance accrue est liée à la surexpression de la Hyaluronan Synthase 2 (HAS2) et la sécrétion d'acide hyaluronique (HA) (Qin 2011), qui les protégerait de l'apoptose (Garoby-Salom 2015). Notre hypothèse est que la sécrétion abondante de HA empêche précocément la maturation et la différenciation des chondrocytes chez la souris *fro/fro*.

HAS2 et HA jouent en effet un rôle majeur dans la condensation des cellules mésenchymateuses qui sont les structures les plus précoces de la formation des cartilages et de l'os endochondral chez les vertébrés (Michigami 2013). L'association d'HA à la surface cellulaire est dans un premier temps nécessaire pour permettre l'adhésion cellule-cellule et les interactions entre cellules et matrice extracellulaire durant la condensation mésenchymateuse (Melaski 1996). Cette étape est suivie d'une diminution de l'expression d'HAS2 et de la

production d'HA dans le centre d'ossification primaire du futur membre, nécessaire pour la différenciation en chondrocyte (Li 2007).

La surexpression de HAS2 dans le mésoderme des bourgeons de membres de poulet entraîne un nanisme, ainsi que des malformations majeures des membres. La production soutenue d'HA dans les MSC inhibe la condensation en pré-cartilage et la chondrogenèse (Li 2007). Le knock-out de HAS2 dans les membres, se caractérise par des os très courts, des défauts d'organisation des doigts et des phalanges, une plaque de croissance désorganisée avec une zone hypertrophique très réduite, suggérant un rôle de HA dans l'organisation et la maturation des chondrocytes hypertrophiques (Matsumoto 2009).

Nous avons étudié l'expression de HAS2 et HA dans les pattes de souriceau *fro/fro* nouveau-né. Comme observé dans la figure 46, HAS2 est fortement exprimée dans toute la plaque de croissance de la souris *fro/fro*, alors qu'elle est très peu présente chez la souris sauvage et uniquement dans la zone pré-hypertrophique, en accord avec son rôle dans la maturation de ces cellules (Matsumoto 2009). HA est très peu exprimé chez la souris sauvage et à l'inverse son expression est augmentée chez la souris *fro/fro*, en particulier dans la zone diaphysaire où on note une accumulation très caractéristique, comparable à celle observée lors de la condensation des cellules mésenchymateuses au stade embryonnaire (E12, E14).

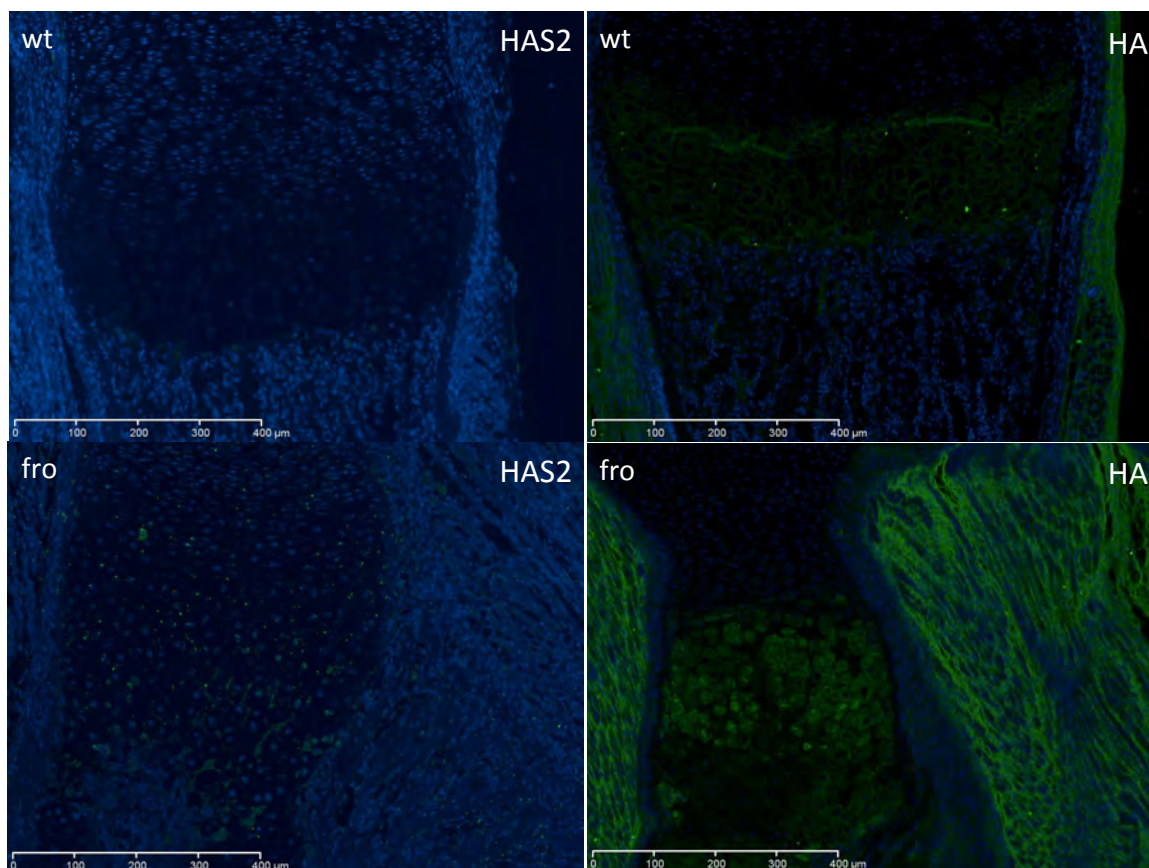


Figure 46 : Expression de HAS2 et HA dans les tibias de souris nouveaux-nés wt et fro/fro. Marquage de HAS2 et HA en immunofluorescence. Images NanoZoomer Hamamatsu 2.0 RS $\times 10$.

La surexpression de HAS2 dans la plaque de croissance et l'accumulation de HA dans la zone diaphysaire indiquent que cette voie est anormalement active chez la souris *fro/fro*, et pourrait contribuer à la dysfonction dans la différenciation et la maturation des chondrocytes hypertrophiques, et au delà, dans la chondrogenèse.

Nous avons recherché *in vitro* si la présence d'HA a des conséquences sur la différenciation chondrocytaire. Les cellules préchondrocytaires C3H10T1/2 ont été différenciées par le TGF β 3 en présence de 0.4% HA, de poids moléculaire élevé (comme décrit dans la partie 4.1.), soit seul soit en association avec l'acide okadaïque (1nM) (inhibiteur spécifique de PP2A), puisque la surexpression d'HAS2 est une conséquence de l'inhibition de PP2A (Qin 2012).

Les résultats présentés dans la figure 47, montrent que l'addition d'HA lors de la différenciation par TGF β 3, inhibe l'expression de Runx2 (ARNm et protéines) mais n'a pas d'effet sur l'expression du VEGF. L'acide okadaïque seul n'a pas d'effet sur l'expression génique de Runx2 (ARNm et protéines) mais inhibe partiellement l'expression protéique du VEGF. L'association des deux agents (acide okadaïque et HA), inhibe fortement VEGF et Runx2 (ARNm et protéines). Dans les chondrocytes de souris *fro/fro*, l'expression des ARN messagers

de Runx2 est peu modifiée, alors que celle du VEGF est diminuée, environ de 50% par rapport à la souris wt (Fig 47). De même l'effet du GW4869 sur la différenciation des C3H10T1/2 inhibe peu l'expression de Runx2 et du VEGF, alors que l'association GW/HA inhibe complètement l'expression du VEGF et bloque à 50% l'expression de Runx2 (Fig 48).

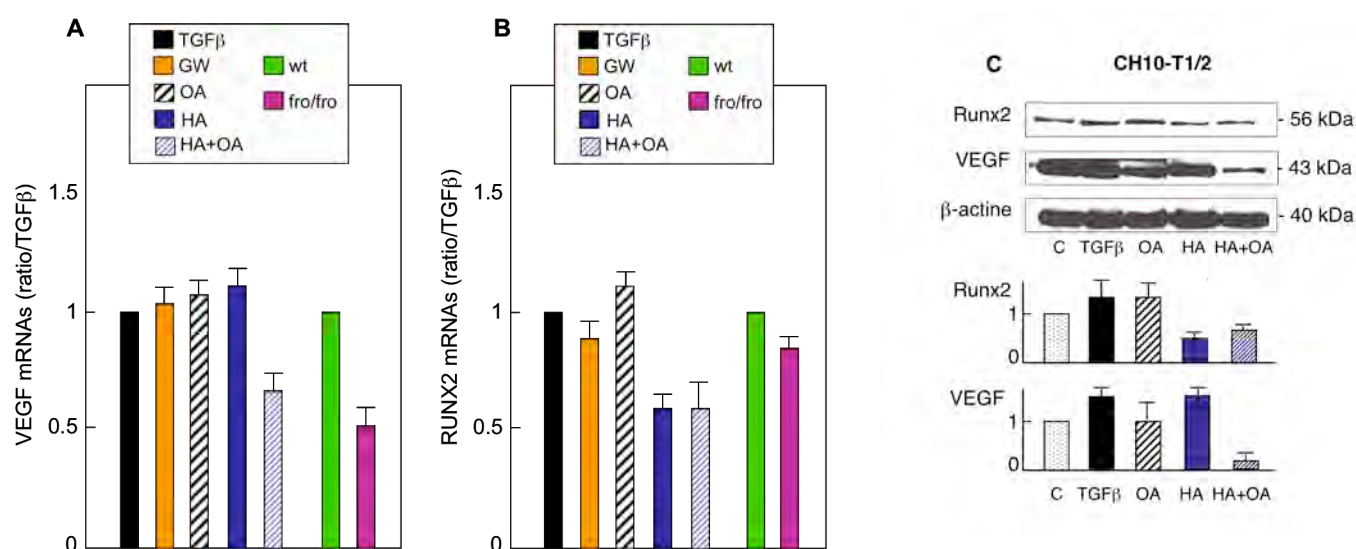


Figure 47: L'association acide okadaïque (OA) et acide hayluronique (HA) altère l'expression de Runx2 et du VEGF. Les cellules C3H10T1/2 sont différenciées en chondrocytes par TGFβ3 (10 jours), soit seul, soit en présence d'OA (1nM), soit HA (0.4%), soit les deux (OA+HA). A et B, étude des ARN messagers du VEGF et de Runx2 en Q-PCR. Les résultats sont exprimés en ratio du TGFβ3 seul (fixé arbitrairement à 1). C Western-blots montrant l'expression du VEGF et de Runx2 dans les C3H10T1/2 différenciées par TGFβ3, seul ou en présence des deux agents OA et HA) seuls ou associés (C) ou en présence de GW4869 (4 μM) seul ou associé avec HA (D). Les résultats sont exprimés par rapport à la β-actine. Moyenne de 3 expériences séparées.

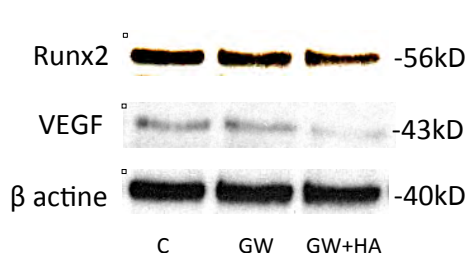


Figure 48 : Expression de Runx2, VEGF et β-actine dans les C3H10T1/2 différenciés en milieu chondrogénique (C), traités par le GW4869 (GW) seul ou en présence d'acide hyaluronique (GW+HA).

Ces résultats montrent que l'expression de Runx2 et du VEGF est affectée par l'association HA et OA, ou HA et GW4869, les résultats mimant ce qui est observé dans la plaque de croissance de la souris *fro/fro*.

Il est à noter que l'acide okadaïque dans les conditions où nous l'utilisons (1nM) n'a pas d'effet toxique sur les C3H10T1/2, et stimulerait leur prolifération, en accord avec les résultats rapportés par Zakany et coll. (Zakany 2014).

Les données de la littérature indiquent que l'HA et l'acide okadaïque ont des propriétés plutôt proangiogéniques et stimulent l'expression du VEGF, en contradiction avec les résultats que nous observons. Cependant l'HA serait angiogénique surtout par sa dégradation en fragments de petit poids moléculaire par la hyaluronidase (Hyal-1), d'où son implication majeure dans certains cancers (Tan 2011). Or dans notre étude, nous utilisons un acide hyaluronique de poids moléculaire élevé, dont les propriétés angiogéniques sont moins connues. De plus, l'HA utilisé seul n'a pas d'effet inhibiteur sur l'expression génique du VEGF (Fig 47).

L'acide okadaïque induirait l'expression du VEGF (Wakiya 1999), en particulier parce qu'il stimule la phosphorylation d'Akt (du fait de l'inhibition de PP2A), et il induit également une surexpression de Hif1 α (Kim 2009). L'acide okadaïque n'a pas d'effet connu sur l'expression de Runx2, contrairement à l'HA qui inhibe l'expression de ce facteur (ARNm et protéines), comme rapporté par le groupe de Tanne et coll. (Tanne 2008) qui montre un effet inhibiteur de l'HA (et surtout des oligoHA) sur l'expression de Runx2 dans la différenciation chondrocytaire. Plusieurs études montrent que Runx2 interagit avec Hif1 α dans le noyau des chondrocytes hypertrophiques sur le domaine RUNT, et cette interaction serait nécessaire pour l'expression du VEGF (Kwon 2011; Lee 2012). Or ni Runx2, ni le VEGF ne sont exprimés dans la plaque de croissance de la souris *fro/fro*, qui par ailleurs présente une accumulation d'HA dans la zone diaphysaire et une inactivation de PP2A (mimée *in vitro* par l'acide okadaïque). On peut faire l'hypothèse que l'accumulation d'HA empêche l'expression de Runx2 chez la souris *fro/fro*, comme mimé *in vitro* dans les C3H10T1/2, et donc que Hif1 α n'est soit pas stabilisé, soit n'est pas localisé dans le noyau, soit ne peut pas induire le VEGF du fait de l'absence de Runx2 dans les chondrocytes hypertrophiques. Les images en immunofluorescence montrent que l'expression de Hif1 α est normale à augmentée dans cette zone chez la souris *fro/fro*. Des travaux complémentaires seront nécessaires pour vérifier la présence de Hif1 α dans le noyau en présence d'HA seul ou avec l'acide okadaïque, ainsi que l'expression du VEGF dans des cellules « silencées » pour Runx2 et/ou PP2A par des siRNAs. Par ailleurs, des études sont actuellement en cours dans des MSC de souris *fro/fro*, pour vérifier si les inhibiteurs de HAS2 (méthylumbelliférone) ou de HA (anticorps anti CD44, hyaluronidase-1), réversent l'inhibition d'expression du VEGF et de Runx2, de même que l'expression de MMP13 dans ces cellules.

4.2.7. Conclusion et perspectives

En conclusion de cette partie, il semble que le retard de maturation et d'apoptose des chondrocytes hypertrophiques, pourrait résulter de l'accumulation d'HA dans la zone diaphysaire, d'où un défaut d'expression de Runx2 et du VEGF, amenant un retard de vascularisation et de minéralisation. Ces résultats devront être validés par des approches plus moléculaires (siRNAs dirigés contre PP2A, Runx2 et HAS2), afin de valider ces observations. Des traitements chez la souris *fro/fro* sont également prévus, en particulier l'injection de methylumbelliférone (inhibiteur de HAS2), ou d'anticorps anti CD44 qui est le récepteur de HA. Ces agents pourront éventuellement être associés entre eux, ou avec des agents stimulant l'activité de PP2A.

4.3. La mutation de la nSMase2 induit un phénotype campomélisque chez la souris *fro/fro*

La souris *fro/fro* présente un phénotype caractéristique, avec un nanisme et une déformation des membres. L'examen attentif de la déformation des tibias montre une angulation très nette chez le souriceau nouveau-né (Figs 49 et 50), comparable à celle observée dans la dysplasie campomélisque. Cette maladie très rare, est due à la mutation du gène codant pour le facteur de transcription Sox9 de la famille SRY (Sex-determining Region Y), qui joue un rôle majeur dans la différenciation des chondrocytes et la détermination des caractères sexuels mâles et la différenciation des chondrocytes.

□

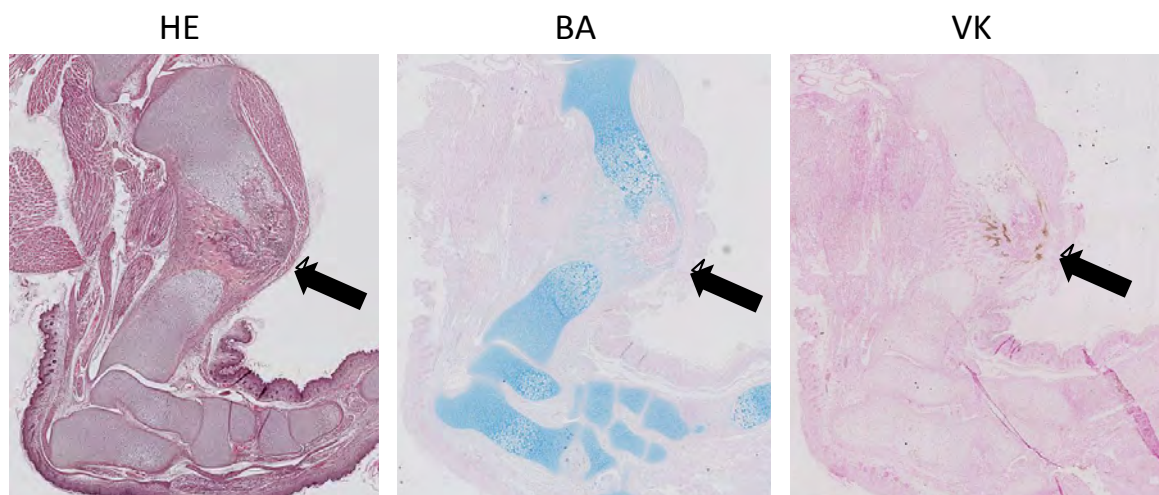


Figure 49: Courbure du tibia chez la souris *fro/fro* mutante pour la nSMase2. Etude histologique de la courbure au niveau du tibia, observée chez la souris *fro/fro* (nouveaux-nés) après coloration hématoxyline/éosine (HE), les cartilages au bleu alcyan (BA) et Von Kossa (VK) montrant la très faible minéralisation. Les flèches indiquent la courbure du tibia, qui est une caractéristique de la chondrodysplasie campomélisque.



Figure 50: Image en radiologie des tibias de souris wt (+/+) et fro/fro âgés de 3 semaines. On note la persistance de la courbure au niveau des tibias des souris fro/fro par rapport aux contrôles.

4.3.1. Dysplasie Campomélique et mutation du gène SOX9

La dysplasie campomélique est décrite pour la première fois en 1971 par Maroteaux et coll. (Maroteaux 1971). C'est une pathologie génétique rare, fréquemment létale dans la période néonatale et périnatale du fait d'insuffisances respiratoires résultant d'une ostéomalacie (décalcification) de la trachée. Quelques individus survivent à cette période et présentent des complications importantes telles que scoliose, troubles respiratoires, compressions médullaires, troubles de l'audition (Mansour 1995) (Fig 51).

La dysplasie campomélique est caractérisée par une courbure caractéristique des os longs, d'où son nom dérivant du grec ancien "kampé" qui signifie courbure, et « melos », membre. Cette courbure affecte principalement les tibias, mais n'affecte pas le fémur ni les membres antérieurs. Par ailleurs, il n'y aurait pas de défaut de minéralisation chez les patients atteints (Mansour 1995). Une autre caractéristique de cette maladie est que les individus au caryotype XY présentent fréquemment une ambiguïté des organes sexuels externes, avec parfois des organes sexuels féminins (Wagner 1994).

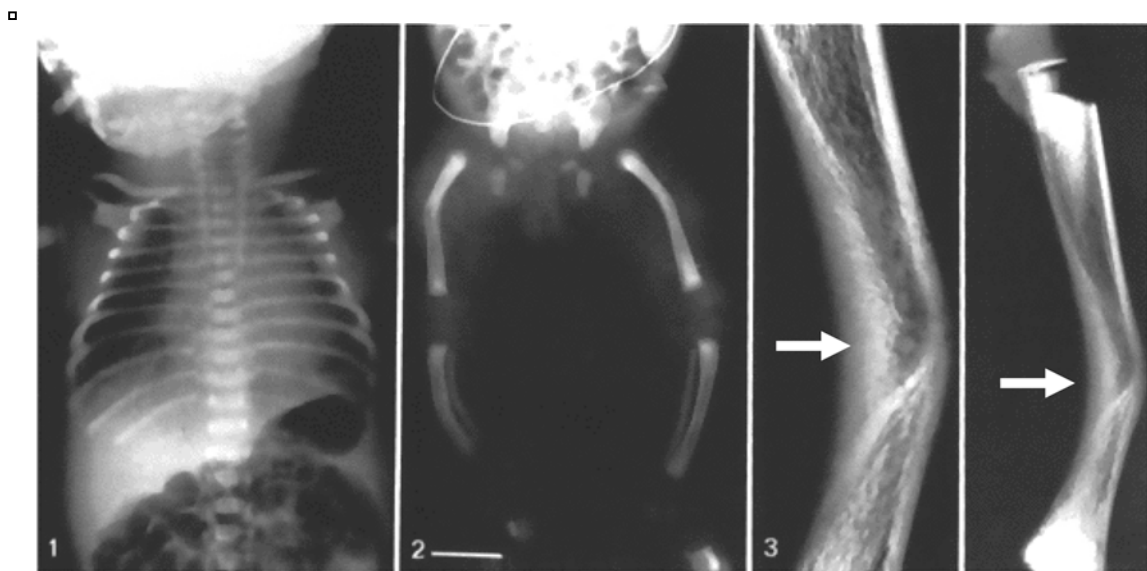


Figure 51: Images radiologiques d'un enfant atteint de dysplasie campomélique (d'après Pazzaglia et al 1987). (1) Radiographie de la cage thoracique. (2) Radiographie des membres inférieurs mettant en évidence une angulation au niveau des fémurs et des tibias. (3) Radiographie d'un tibia montrant cette incurvation au niveau de la métaphyse. Les flèches indiquent la courbure du tibia.

Sur un plan génétique, la dysplasie campomélique est due à la mutation du gène SOX9 situé en position 17q24 sur le chromosome 17 (Wagner 1994). Le gène SOX9 code pour le facteur de transcription Sox9 impliqué très précocément dans la différenciation des chondrocytes et la détermination du sexe porté par le chromosome Y. Plusieurs types de mutations peuvent affecter SOX9, chaque mutation dans la région codante causant une dysplasie campomélique et 75 % une réversion de sexe (Wagner 1994).

Au cours de la chondrogenèse, Sox9 est un facteur de transcription essentiel pour la condensation des chondrocytes qui précède leur différenciation, et il favorise leur progression jusqu'au stade hypertrophique. A ce stade, l'expression de Sox9 diminue pour permettre l'invasion vasculaire et la formation de l'os endochondral (Hattori 2010). Sox9 régule l'expression de nombreux gènes impliqués dans la prolifération des chondrocytes, en particulier les gènes de la matrice extracellulaire tels que *COL2A1* et *ACAN* (aggrecan) (Bell 1997). De plus Sox9 transactive directement *COL2A1*, le gène codant pour le collagène II, exprimé très fortement dans les chondrocytes en prolifération (Lefebvre 1997).

Les souris KO pour Sox9 ne sont pas viables, et meurent au stade embryonnaire, autour de E18 (Akiyama 2002). Ces souris ont un phénotype caractéristique avec des os longs raccourcis et courbes, comparables aux anomalies observées chez les sujets atteints de dysplasie campomélique, ainsi qu'un défaut d'expression de *Col2A1* et *Acan*, que l'on retrouve également au niveau des cellules mésenchymateuses en cours de condensation (Bi 1999).

L'inactivation de Sox9 chez la souris knock-out entraîne une absence complète de la formation des condensations mésenchymateuses et du cartilage (Akiyama 2002). Sox9 régule également l'expression de Sox5 et Sox6 d'où une réduction du nombre de chondrocytes en prolifération chez les souris mutantes, qui dépendent de ces deux facteurs (Smits 2001; Akiyama 2002). Sox9 réprimerait la transition de chondrocytes en prolifération vers le stade hypertrophique, et l'expression de Col10A1 (Leung 2011; Akiyama 2002). Les mutants hétérozygotes de Sox9 présentent une zone hypertrophique élargie et minéralisée prématurément (Bi 2001).

4.3.2. Expression de Sox9 dans les os longs des souris *fro/fro*

Les travaux du groupe de JL Guénet ne font pas état d'anomalies au niveau du gène de Sox9 chez la souris *fro/fro* (Aubin 2005), donc la courbure de type campomélisque au niveau des tibias n'implique pas de mutation de ce gène. De plus, l'analyse radiographique des souris *smpd3* knock-out (Stöffel 2005) montre une courbure au niveau du tibia chez ces animaux, ce qui confirme l'implication de la mutation et/ou de l'absence d'activité de la nSMase2 dans l'aspect « campomélisque » des tibias. A l'inverse des souris knock-out pour Sox9, on note parfois une torsion des fémurs chez la souris *fro/fro*, ce qui pourrait aussi rapprocher le phénotype de cette souris de la chondrodysplasie kyphomélisque dont l'origine génétique n'est pas identifiée (Cormier-Daire 2004). Cependant la courbure des tibias caractéristique de la campomélie est constante chez la souris *fro/fro*.

Nous avons étudié l'expression de Sox9 en immunofluorescence chez les souriceaux nouveaux-nés *fro/fro* et sauvages. Les images présentées dans la figure 52, montrent une expression très faible de Sox9 dans la plaque de croissance des souris *fro/fro* à l'inverse de la souris sauvage où l'expression de Sox9 est élevée dans les chondrocytes préhypertrophiques et hypertrophiques (Fig 52). Ces résultats sont corrélés avec l'expression du collagène II, qui est diminuée dans la zone de réserve et de prolifération des chondrocytes (Fig 53).

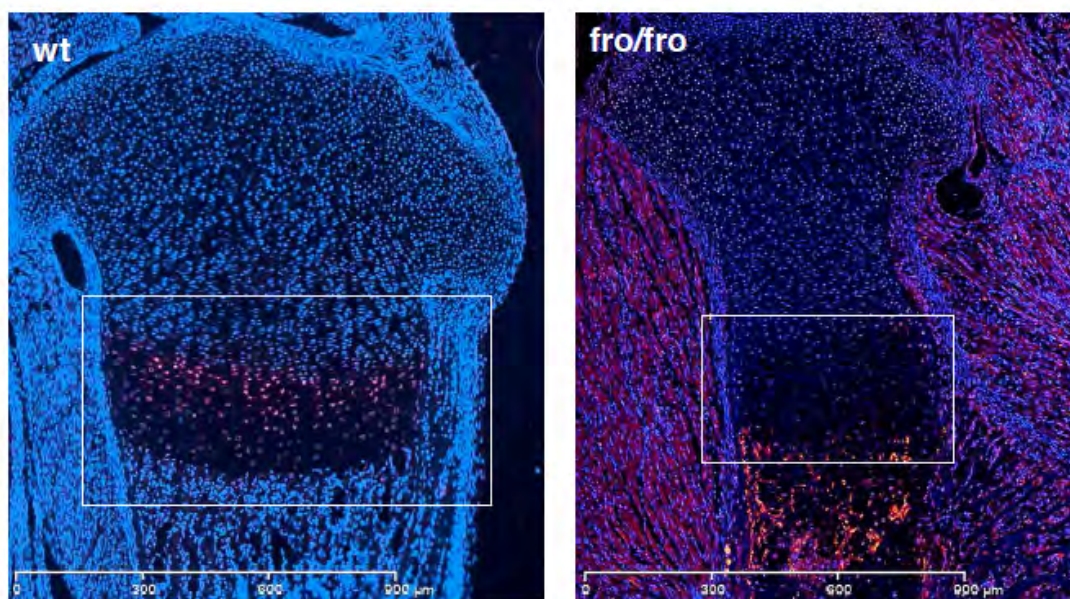


Figure 52 : Expression de Sox9 dans les tibias de souriceaux nouveaux-nés wt et fro/fro. Images NanoZoomer Hamamatsu 2.0 RS x5.

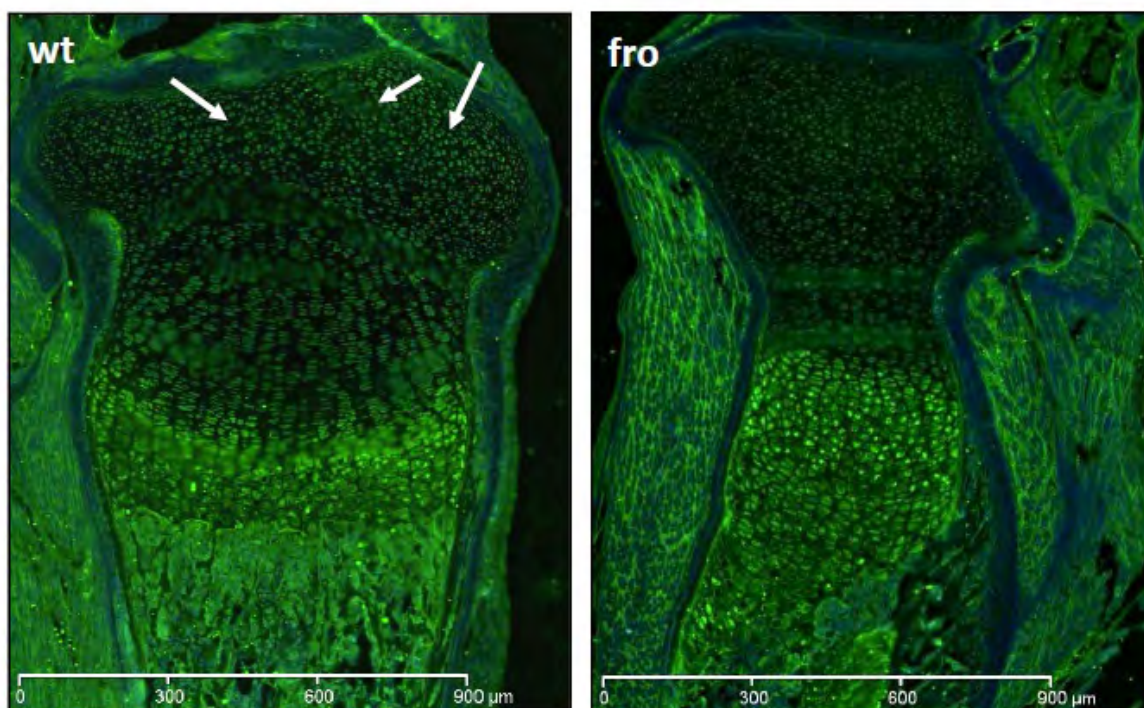


Figure 53: Expression du collagène II dans les tibias de souriceaux nouveaux-nés wt et fro/fro. Images NanoZoomer Hamamatsu 2.0 RS x5.

Les travaux du groupe de B. de Crombrughe (Akiyama 2002) indiquent que Sox9 intervient très tôt dans la chondrogenèse puisqu'elle est activée dès l'étape de condensation des cellules mésenchymateuses. Nous avons étudié l'expression de Sox9 dans des embryons âgés de 14 et 16 jours. L'expression est très faible chez les souris *fro/fro* dans les deux stades embryonnaires étudiés (Fig 54).

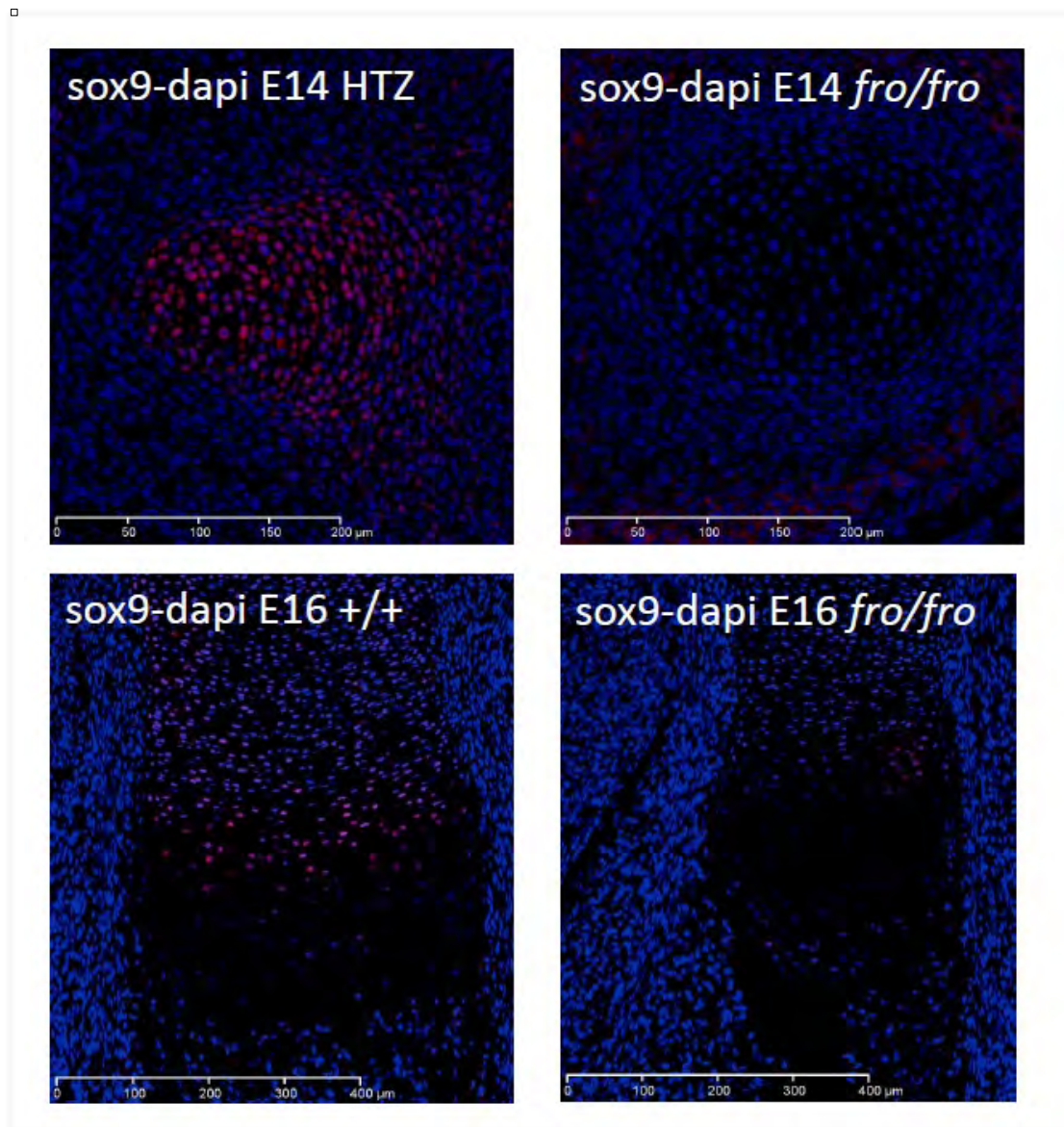


Figure 54: Expression de Sox9 dans les embryons E14 (+/+ et *fro/fro*) et E16 (+/+ et *fro/fro*). L'expression de Sox9 dans les embryons est très faible chez les souris *fro/fro*, dans les deux stades embryonnaires étudiés comme chez les souriceaux nouveaux-nés (Fig 52).

En parallèle, les colorations à l'hématoxyline/éosine et au bleu alcyan, montrent une accumulation de précartilage et une l'angulation visible chez l'embryon de 17 jours (Fig 55).

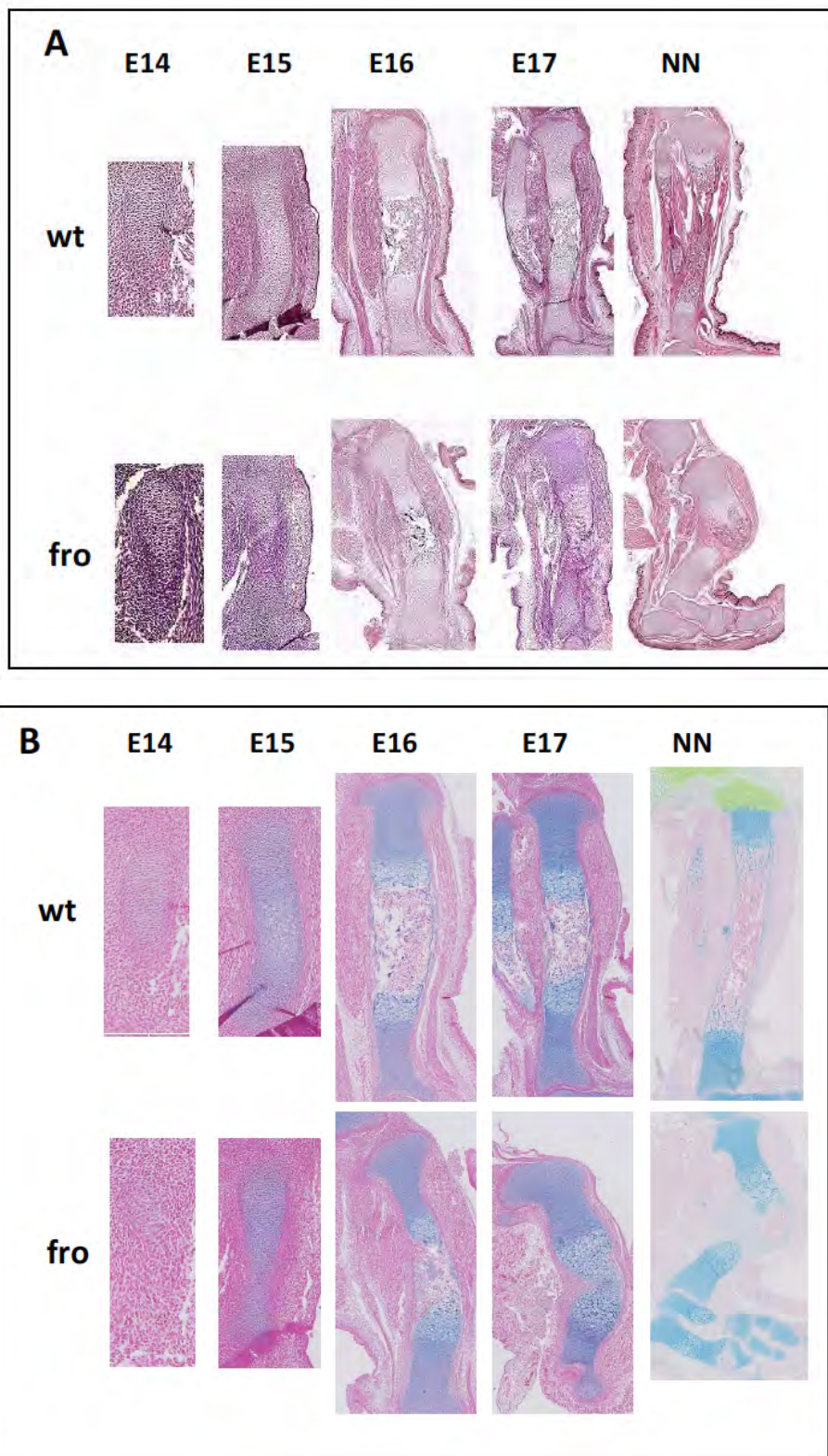


Figure 55: Histologie des tibias provenant d'embryons de souris sauvages (+/+) et *fro/fro* (E14, E15, E16, E17 et nouveaux-nés de 12h (NN)). (A) Coloration à l'hématoxyline/éosine. (B) Coloration au Bleu Alcian. L'angulation est visible dès E16, avec un retard de maturation du centre d'ossification primaire (persistance du cartilage, pas de vascularisation, pas de zone trabéculaire). La coloration bleu alcyan est plus marquée chez la souris *fro/fro* dès le stade E15.

La coloration au Von Kossa est faible dans les embryons (Fig 56), indiquant une absence de minéralisation, comme décrit dans la partie 4.2. Ceci ne correspond pas au phénotype « campomélisque » lié au déficit (partiel) de Sox9, puisqu'il n'y a pas de défaut de minéralisation chez les patients atteints de cette pathologie (Mansour 1995).

Ceci nous a conduit à étudier l'expression de Sox9 en fonction de l'activité nSMase2.

□

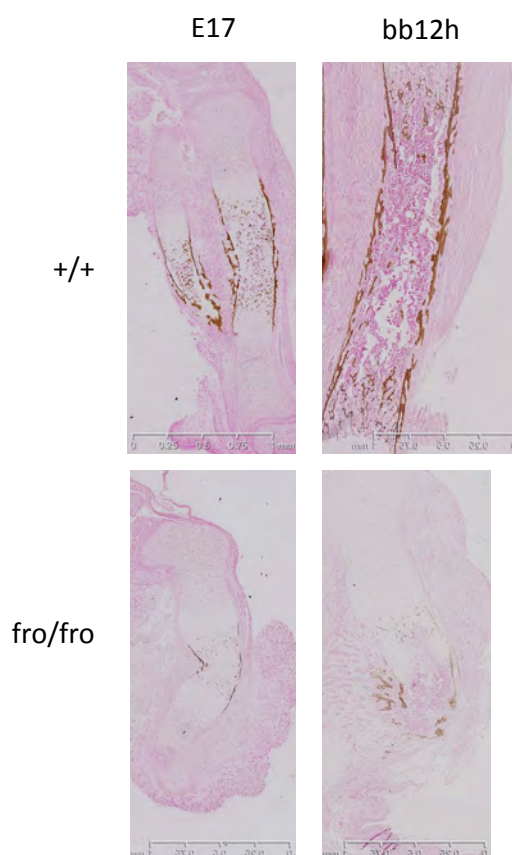


Figure 56 : Coloration Von Kossa des tibias de souris contrôles et fro/fro au cours du développement (E17 et nouveaux-nés de 12h). On note un défaut de minéralisation dans les souris fro/fro par rapport aux contrôles.

4.3.3. Inhibition de la nSMase2 et expression de Sox9 dans la différenciation des chondrocytes

Nous avons étudié l'implication de la nSMase2 dans l'expression de Sox9 et des gènes régulés par cette protéine (Col2a1, Acan), sur des cellules différenciées à partir de MSC provenant de

souris sauvages ou *fro/fro*, et sur la lignée mésenchymateuse C3H10T1/2 ou sur des cellules pré-chondrocytaires ATDC5, différenciées en présence de GW4869.

L'analyse des ARN messagers de Sox9, Col2a1 et Acan est réalisée en RT-qPCR après 5 jours de culture en milieu de différenciation chondrocytaire en présence de TGF β 3.

Les résultats obtenus montrent que l'expression de Col2a1 et Acan est fortement diminuée (25-30% d'expression résiduelle) dans les cellules issues de souris *fro/fro*, ainsi que l'expression de Sox9 (Fig 57B). De même, la présence de GW4869, inhibiteur de la nSMase, inhibe fortement l'expression de Col2a1 et Acan dans les ATDC5. L'expression des ARNm de Sox9 est peu affectée par le GW4869 dans les ATDC5 (alors qu'elle est abaissée dans les cellules *fro/fro*) (Fig 57A).

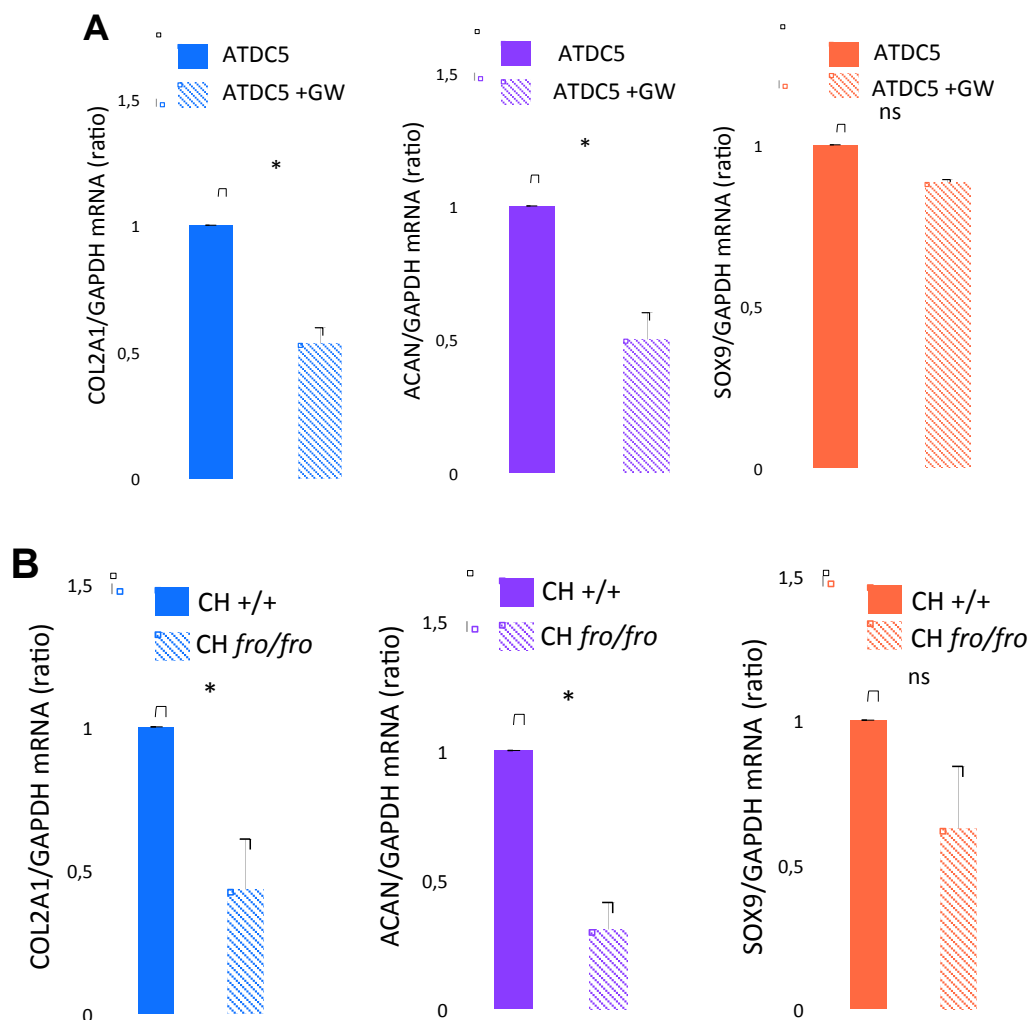


Figure 57 : RTqPCR. Etude de l'expression des ARN messagers Col2a1, Sox9 et Acan dans les cellules préchondrocytaires ATDC5 (A) et les C3H10T1/2 (B) différenciés en milieu chondrogénique et traités ou non par le GW4869.

L'expression protéique de Sox9 est fortement diminuée dans les chondrocytes isolés à partir des têtes fémorales de souris *fro/fro* (Fig 58).

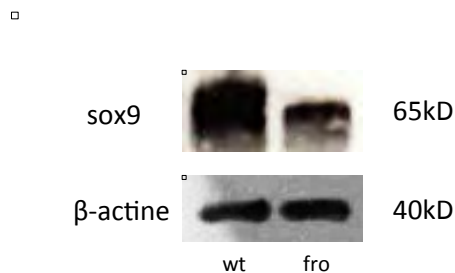


Figure 58: Expression de Sox9 dans les chondrocytes wt et *fro/fro*. L'expression de Sox9 est étudiée par western Blot dans les chondrocytes issus de souris wt et *fro* nouveaux-nés de 3 jours, et exprimée par comparaison avec la β -actine comme contrôle interne.

L'ensemble de ces résultats confirme que la mutation (souris *fro/fro*) ou l'inhibition de la nSMase2 par le GW4869, génère un dysfonctionnement de Sox9 qui se traduit par une forte diminution de l'expression de Col2A1 et Acan, comparable aux événements observés au cours de la chondrodysplasie campomélique. De plus l'expression protéique de Sox9 est nettement diminuée chez la souris *fro/fro* (immunofluorescence, ARNm et protéine).

4.3.4. Réversion partielle de la dysfonction de Sox9 par le C2-céramide perméant

Afin de valider l'implication de la nSMase2 dans l'expression et l'activation de Sox9, nous avons étudié l'effet du C2-céramide sur l'expression de Sox9, Col2A1 et Acan dans des chondrocytes en culture issus de souris *fro/fro*, ou des MSC différenciées en chondrocytes.

L'addition de C2-céramide (5 μ M) permet de restaurer significativement l'expression des ARN messagers de Col2A1 dans les MSC issues de souris *fro/fro* en cours de différenciation par le TGF β 3, ce qui confirme l'implication de la nSMase ou du céramide dans la régulation de Sox9 (Fig 59).

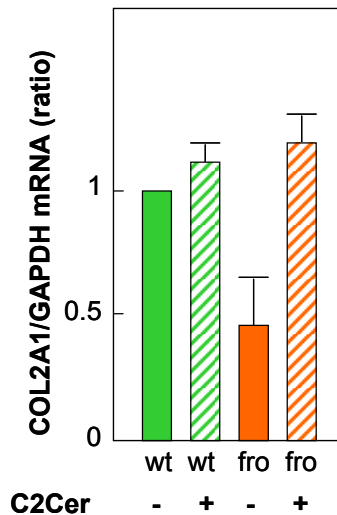


Figure 59 : Effet du C2-céramide sur l'expression de Col2A1 lors de la différenciation chondrocytaire des MSC de souris *fro/fro* ou *wt*. Les ARNm de Col2A1 sont analysés en RT-QPCR après 5 jours de culture en présence de C2-céramide (C2Cer, 5 μ M).

Nous avons également étudié l'effet du C2-céramide sur des organocultures de pattes de souris *fro/fro* et sauvages, prélevées au stade embryonnaire à 15 jours et cultivées jusqu'à 21 jours en milieu de différenciation chondrocytaire. Les résultats présentés dans la figure 60, indiquent que le C2-céramide restaure l'expression des ARN messagers de Col2A1 et Acan ainsi que l'expression de Sox9 (Fig 60).

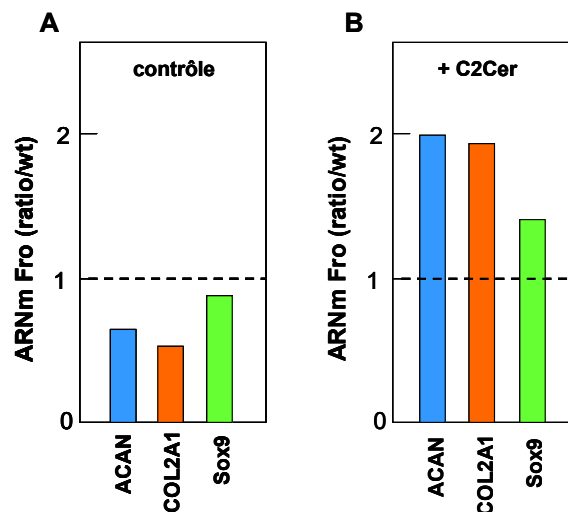


Figure 60: Le C2-céramide restaure l'expression de Col2A1 et Acan dans les organocultures de pattes de souris *fro/fro*. Les pattes d'embryons sont récupérées à E15 et sont incubées dans du milieu de différenciation chondrocytaire et du TGF β 3 (conditions contrôle, A), et supplémenté en C2-céramide (C2Cer, 5 μ M). Après 6 jours de culture (E21), l'expression de Sox9, Acan et Col2A1 est recherchée par RTqPCR. On note une augmentation de l'expression d'Acan, Col2A1 et Sox9 dans les pattes de souris traitées par le C2-céramide. Les souris sont génotypées afin de déterminer leur caractéristique (*fro/fro* ou contrôle). La ligne en pointillé détermine la moyenne d'expression du contrôle wt arbitrairement fixé à 1.

Ces résultats confirment l'implication précoce de la nSMase2 dans la régulation de Sox9. Les études préliminaires ne montrent cependant pas de correction de l'angulation dans les pattes traitées en organoculture (résultats non montrés). Cette absence de correction n'est pas surprenante car l'implication de la nSMase2 intervient sans doute beaucoup plus tôt dans la régulation de Sox9, puisque l'étude sur les embryons de souris montre une expression très faible de la protéine dès 12 jours sur les bourgeons des membres en cours de condensation.

Nous avons précédemment montré que le défaut de maturation des chondrocytes hypertrophiques chez la souris *fro/fro*, pourrait résulter de la surexpression de HAS2 et la sécrétion d'HA qui interviennent très tôt dans la condensation des cellules mésenchymateuses (Kosher 2009). Nous avons montré que l'expression d'HAS2 est uprégulée dans les tissus de souris *fro/fro*, de par l'activation chronique d'Akt et l'inactivation de la phosphatase PP2A, cible du céramide (Dobrowski 1993). Sox9 jouant un rôle très précoce dans la condensation, notre hypothèse est que le système PP2A/Akt pourrait être responsable de la dysfonction de Sox9 chez la souris *fro/fro*.

4.3.5. Hypothèse mécanistique: L'inhibition de PP2A induit une dysfonction de la chondrogenèse

4.3.5.1. PP2A et chondrogenèse

La protéine phosphatase 2A (PP2A) est une sérine/thréonine phosphatase qui existe sous deux formes, un core-enzyme hétérodimérique, et un holoenzyme hétérotrimérique. Le core-enzyme est composé d'une sous-unité catalytique C de 36 kDa complexée avec une sous-unité structurale A de 65kDa. L'association du core-enzyme avec des sous-unités régulatrices de taille variable forme des hétérotrimères qui présentent des propriétés différentes en fonction des holoenzymes produits (Götz 1999; Xu 2006).

L'expression de PP2A peut représenter jusqu'à 0.1% des protéines totales dans certains types cellulaires (Matta 2014). PP2A est très largement impliquée dans la régulation du développement, de la prolifération, de la mort et du cycle cellulaire de même que dans l'organisation du cytosquelette (Matta 2014). Sa dérégulation a des conséquences importantes dans les domaines du cancer et de la maladie d'Alzheimer (Tian 2002, Janssens 2005).

- PP2A, embryogenèse, voie Wnt et Akt

Les souris knock-out pour la sous-unité catalytique C meurent au stade embryonnaire (13.5 jours environ) (Götz 1998). Les embryons se développent normalement jusqu'à l'âge de 5 à 6 jours, cependant la formation du mésoderme et la transition cellules épithéliales/mésenchymateuses ne se fait pas correctement chez ces souris. Les travaux du groupe de Götz et coll. (1998) montrent que la sous-unité C α serait nécessaire pour la stabilisation des complexes E-cadherine/ β -caténine à la membrane plasmique, d'où une redistribution de ces complexes dans le cytosol chez les embryons PP2A-C α ^{-/-}.

PP2A est un régulateur négatif de la voie Wnt/ β -caténine: en l'absence de stimulus Wnt, la β -caténine est dégradée dans un complexe multi-protéique qui inclue les supresseurs de tumeurs Axine et APC (adenomatous polyposis coli), les Ser/Thr kinases GSK-3 β et CK1, PP2A et la E3-ubiquitin ligase β -TrCP. La signalisation Wnt stimule la phosphorylation et l'activation d'Akt qui inactive GSK-3 β par phosphorylation (Stamos 2013). PP2A déphosphoryle Akt et régule négativement son activité (Seshacharyulu 2013).

- PP2A et céramide

Les travaux du groupe de Y. Hannun montrent que les céramides courts (C2 à C6-céramide) et plus longs, activent directement PP2A (autre nom, CAPP pour ceramide-activated protein phosphatase) (Dobrowsky 1993). Le mécanisme d'activation est encore mal élucidé mais il semble que des sites de fixation pour le céramide soient présents sur la sous-unité catalytique C de PP2A (Law 1995). PP2A est considérée comme un suppresseur de tumeur, et son activité est inhibée dans de nombreux types de cancers en particulier le cancer du poumon, la leucémie myéloïde chronique et la leucémie myéloïde aigüe (Oaks 2015). Sa réactivation par des approches génétiques ou pharmacologiques (FTY720, céramides perméants, perphénazine) induit la mort des cellules tumorales aussi bien en culture que dans les modèles animaux (Oaks 2015).

- PP2A et chondrogenèse

Les travaux du groupe de Zakany (2002) montrent que PP2A régulerait négativement la chondrogenèse. En effet l'inhibition de PP2A par l'acide okadaïque stimule la prolifération des cellules progénitrices issues de l'embryon de poulet en cours de différenciation chondrogénique, et la formation de la matrice du cartilage, *via* l'activation de la PKA qui induit une phosphorylation et une translocation nucléaire de Sox9 (Zakany 2002). Plus récemment, ce groupe a montré que la stimulation mécanique de ces cellules active une voie chondrogénique PKA/CREB/Sox9, qui serait régulée négativement par PP2A (Juhász 2014). Les auteurs notent

cependant, que l'application d'acide okadaïque (20 nM dans ces études), interfère avec le cytosquelette d'actine et que les cellules traitées ont un aspect arrondi proche des chondroblastes (Matta 2014).

L'acide okadaïque est un inhibiteur puissant et spécifique de PP2A. C'est une phycotoxine sécrétée par des dinoflagellés de genre *Dinophysis* et *Prorocentrum*, présents dans certains coquillages marins responsables d'intoxications alimentaires graves (Dawson 1999). Certaines études de tératogénèse ont été réalisées avec cet agent, mais très peu chez les mammifères du fait de sa très forte toxicité. Les travaux de Casarini (2007), montrent que l'administration d'acide okadaïque à des jeunes larves de *Xenopus Laevis*, résulte en une forte mortalité des embryons et de nombreuses malformations chez les survivants, en particulier au niveau de la taille plus petite et de la queue déformée (Fig 61) (Casarini 2007).

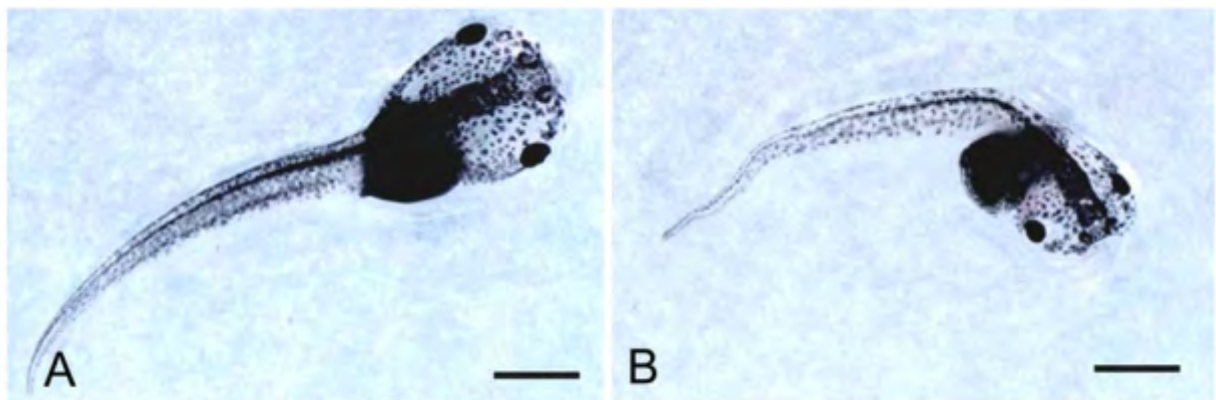


Figure 61 : Images représentant des larves de *X. Laevis* contrôle (A) ou traitée par 1 nM OA pendant 5 jours (B). On note la taille plus petite et la courbure de la queue chez la larve traitée par OA (d'après Casarini 2007; Franchini 2010).

Les travaux précédents réalisés chez la souris *fro/fro* montrent que PP2A est phosphorylée sur la tyrosine 307, et donc est inactive, en grande partie du fait de la mutation de la nSMase2. Cette inactivation se traduit par l'activation chronique d'Akt (Fig 62).

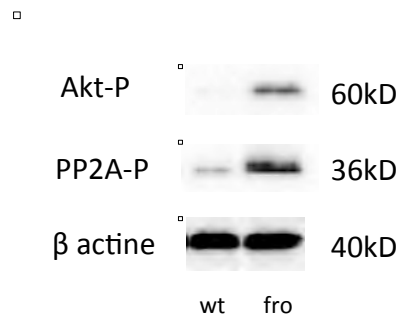


Figure 62: Phosphorylation de PP2A sur tyrosine 307 et activation d'Akt dans les chondrocytes de souris *fro/fro* et comparaison avec les chondrocytes de souris *wt*. L'équilibre des protéines est vérifié avec l'expression de la β -actine.

L'activation constante d'Akt a des conséquences négatives sur certaines réponses impliquées dans la chondrogenèse, telles que l'autophagie qui n'est pas activée dans la zone hypertrophique (cf.§4.2), ou la surexpression de HAS2 et la sécrétion d'HA (cf. 4.1 et 4.2, et Qin 2012; Garoby-Salom 2015). Nous avons étudié l'implication de PP2A sur la dysfonction de Sox9 associée au phénotype de la souris *fro/fro*.

4.3.5.2. Etude de l'inhibition de PP2A sur la différenciation des chondrocytes

Afin de voir s'il existe un lien entre l'inhibition de PP2A et la dysfonction de Sox9, nous avons étudié la différenciation des cellules mésenchymateuses C3H10T1/2 et des cellules préchondrocytaires ATDC5 en présence d'acide okadaïque (1nM).

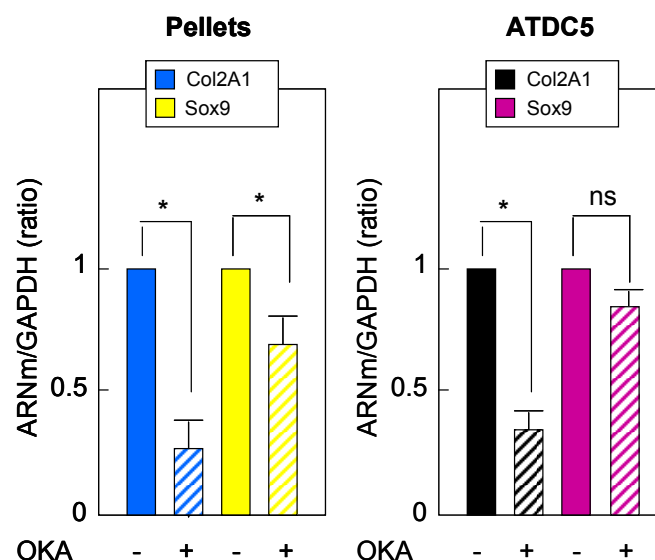


Figure 63: Expression de Col2A1 et Sox9 dans des pellets formés à partir de cellules C3H10T1/2, et dans les cellules pré-chondrocytaires ATDC5, cultivées dans un milieu chondrogénique (barres pleines) et en présence d'acide okadaïque (1nM) (barres striées).

Les résultats présentés dans la figure 63 montrent que l'acide okadaïque diminue très fortement l'expression des ARN messagers de Col2A1 dans les deux types cellulaires, après 5 jours de différenciation stimulée par TGF β 3. L'expression des ARN messagers de Sox9 est diminuée par le traitement avec l'acide okadaïque dans les pellets, moins dans les ATDC5, alors que l'expression de Col10A1 est augmentée de façon comparable entre les cellules traitées et les contrôles (résultats non montrés), comme rapporté par Zakany et coll. (2002). Ces résultats indiquent que l'inhibition de PP2A génère une dysfonction de Sox9 avec un défaut d'expression de Col2A1, ce qui suggère un rôle pour PP2A dans la différenciation précoce des chondrocytes et l'activité de Sox9.

Il est à noter que l'acide hyaluronique (HA) dont nous avons montré l'effet inhibiteur sur l'expression de Runx2 et du VEGF, n'a pas d'effet notable sur l'expression de Col2A1 et de Sox9 dans les modèles chondrogéniques utilisés.

En résumé, nos résultats indiquent que l'inhibition de PP2A par l'acide okadaïque génère une dysfonction (et un défaut d'expression) de Sox9 qui se traduit par un défaut d'expression des gènes de la matrice extracellulaire Col2A1 et Acan, comparable à ce qui est décrit au cours de la dysplasie campomélique, et proche de ce que nous observons chez la souris *fro/fro*. Ces observations suggèrent que le phénotype "campomélique" de cette souris pourrait résulter (entre autre) de l'inhibition (ou de la non-activation) de PP2A, induite par la mutation de la nSMase2 et l'absence de génération de céramide. Les travaux de C. Clarke dans le groupe de

Y. Hannun (Stony Brook, NY, USA) montrent que le taux de céramide dans les pattes de souris *fro/fro* est 50% plus bas que celui des souris wt (Fig 64), ce qui confirme le déficit en céramide chez cette souris, et la non-disponibilité du céramide résiduel pour l'activation des voies de signalisation céramide-dépendantes, telles que PP2A. Nous avons montré dans les fibroblastes que l'addition de C2-ceramide induit une déphosphorylation de PP2A sur tyrosine 307, et diminue l'activation d'Akt (Garoby-Salom 2015), et par ailleurs C2Cer restaure l'expression de Col2A1 dans les chondrocytes et les organocultures (Figs 59 et 60), ce qui confirme le rôle de la nSMase2 et du céramide dans la régulation de PP2A.

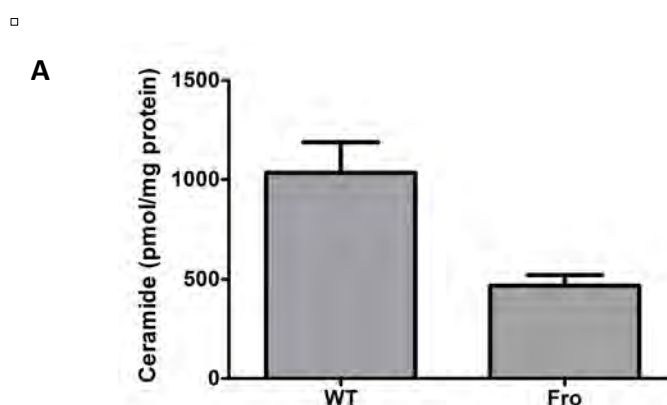


Figure 64: Dosage du céramide dans les homogénats de tibias de souris wt et *fro/fro* (Résultats Chris Clarke, Stony Brook, NY, 2013).

Notre hypothèse est que PP2A pourrait réguler très précocement et positivement l'expression de Sox9, peut-être en régulant négativement la voie Wnt, qui s'active très précocement dans la chondrogenèse et inhibe l'activité de Sox9 (Akiyama 2004). La nSMase2 pourrait stimuler l'activité de PP2A qui permet la stabilisation des complexes E-cadherine/ β -caténine à la membrane plasmique, et donc inhibe l'activation de la β -caténine (Götz 1998). Nos résultats préliminaires montrent que la β -caténine est activée dans les bourgeons de membres des embryons de souris *fro/fro* âgés de 12 à 14 jours dans lesquels Sox9 n'est pas exprimée (contrairement aux souris sauvages) (Fig 65). Cette observation suggère que la β -caténine n'est pas régulée correctement à ce stade embryonnaire, (peut-être du fait de l'inactivité de PP2A), d'où une dysfonction de Sox9, comme rapporté par le groupe de B. de Crombrughe (Akiyama 2003). Il semble par ailleurs, que cette activation de la β -caténine soit transitoire car on n'observe pas d'expression de la β -caténine active dans la plaque de croissance du souriceau nouveau-né, en accord avec l'absence d'expression de Runx2 et de minéralisation, contrairement à ce qui est observé chez la souris sauvage. A noter cependant que l'expression

de β -caténine dans les jonctions ne semble pas anormale chez la souris *fro/fro* (résultats non montrés).

Ces résultats devront être validés par des approches moléculaires (siRNAs dirigés contre PP2A, *smpd3*), afin de démontrer la régulation de PP2A par la nSMase2 et le céramide, et les conséquences sur l'activité de Sox9 et la β -caténine. Par ailleurs, le rôle de l'induction de HAS2 et de la sécrétion de HA et leur place dans ces voies de régulation dans le contexte de l'inhibition de PP2A, pourra également être étudié.

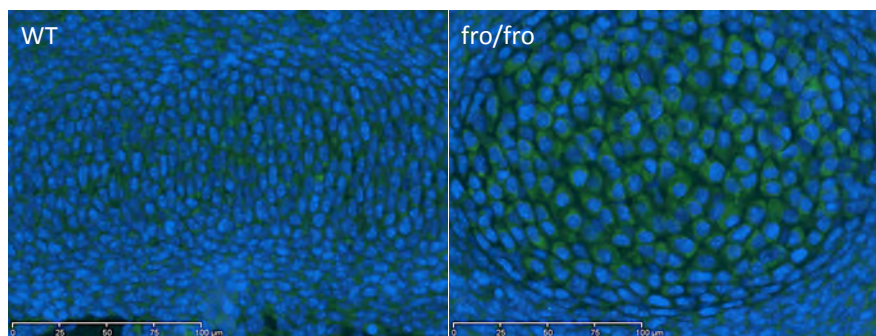


Figure 65: Expression de β -caténine dans les embryons E14 (+/+ et *fro/fro*). L'expression de β -caténine dans les embryons est plus importante chez les souris *fro/fro* à ce stade embryonnaire.

5. DISCUSSION GENERALE et PERSPECTIVES

Les résultats obtenus au cours de ce travail de thèse ont permis de caractériser plusieurs aspects impliqués dans le phénotype des souris *fro/fro*, et de clarifier certaines propriétés de la nSMase2 au cours de l'apoptose et de la chondrogenèse.

- Dans la première partie de nos résultats expérimentaux, nous avons pu montrer que la nSMase2 n'a pas d'implication dans l'apoptose induite par des agents de stress dans les fibroblastes issus de souris *fro/fro*, comme cela avait déjà été rapporté dans l'équipe (Devillard 2010), dans ces cellules et dans les souris elles-mêmes, qui ne survivaient pas plus longtemps que les contrôles après injection de TNF α . Cependant la mutation de la nSMase2 induit une protection des fibroblastes *fro/fro* contre l'apoptose générée par la privation en nutriments. Cette résistance à l'apoptose dépend de la surexpression de HAS2 et la sécrétion d'HA anti-apoptotique. L'effet protecteur antiapoptotique de HA s'exerce uniquement dans les conditions de privation, *via* l'expression de HSP-72, mais des effets antiapoptotiques directs de HA pourraient également être impliqués. A l'inverse, HA ne protège pas du tout contre l'apoptose induite par les agents de stress. Ces résultats montrent que l'implication de la nSMase2 dans l'apoptose est indirecte car le "silencing" de HAS2 dans les cellules *fro/fro* restaure l'apoptose dans ces conditions, bien que la nSMase2 ne soit pas active dans ces cellules.

Des résultats comparables sont observés dans les chondrocytes de souris *fro/fro* en culture, et confirment par ailleurs l'effet anti apoptotique de HA, déjà rapporté dans les chondrocytes et le liquide synovial et dans le traitement de pathologies ostéoarthritiques (Campo 2010; Temiz 2010; Waller 2012; Mongkhon 2014). Ces résultats indiquent que la surexpression de HAS2 et la sécrétion d'HA consécutives à la mutation de nSMase2 sont retrouvées dans les différents tissus et types cellulaires de cette souris, où il pourrait avoir localement un effet antiapoptotique.

- La deuxième partie de nos travaux expérimentaux montre que la sécrétion de HA pourrait intervenir dans le retard d'apoptose des chondrocytes hypertrophiques dans la plaque de croissance de la souris *fro/fro*.

En effet, les images en immunofluorescence montrent une expression très élevée de HAS2 et de HA dans la zone métaphysaire de la plaque de croissance chez la souris *fro/fro*, qui pourrait interférer avec la différenciation terminale des chondrocytes hypertrophiques. HA pourrait également inhiber l'apoptose, la vascularisation et la minéralisation de l'os. Cette hypothèse est étayée par les résultats observés *in vitro* au cours de la différenciation des cellules C3H10T1/2. En effet, en présence d'HA seul, on observe une diminution de l'expression des ARN messagers et protéines VEGF et Runx2, suggérant un effet inhibiteur de HA sur la

différenciation des chondrocytes hypertrophiques dans la plaque de croissance, comme observé dans les cellules provenant de souris mutantes surexprimant HAS2 (Matsumoto 2009). Cet effet inhibiteur de HA sur l'expression de VEGF et Runx2, est potentialisé par l'addition d'acide okadaïque, inhibiteur de PP2A. Or la mutation de *smpd3* et donc de la nSMase2 se traduit par une inactivation constitutive de PP2A dans certains tissus, dont les chondrocytes et les fibroblastes, à l'origine de l'activation d'Akt et de la surexpression d'HAS2 (Qin 2012). Le fait que l'inhibiteur de nSMase GW4869 reproduise des réponses similaires sur le VEGF et Runx2, et que le C2-céramide restaure partiellement les paramètres de différenciation, montre que la mutation de nSMase2 est à l'origine des dysfonctions observées (Qin 2012).

L'acide hyaluronique (HA) est un composant majeur des cartilages qu'il protège et favorise leur résistance à la compression. C'est un lubrifiant, présent dans le liquide synovial. Il favorise l'adhésion et la prolifération cellulaire médiée par son interaction avec son récepteur CD44. HA est impliqué dans l'invasion tumorale, car il favorise la formation de métastases et les fragments d'HA seraient angiogéniques, ce qui est en contradiction avec les résultats que nous observons sur l'expression du VEGF. Une hypothèse est que la surexpression d'HAS2 et la sécrétion d'HA à un stade précoce de la chondrogenèse, pourrait jouer un rôle protecteur contre les effets délétères résultant de l'inactivation de PP2A.

Il est à noter que l'accumulation des chondrocytes hypertrophiques associée à un défaut de différenciation, de vascularisation et d'apoptose, se retrouve dans d'autres chondrodysplasies telles que la chondrodysplasie de Schmid, due à la mutation de *COL10A1*, ou l'anadysplasie métaphysaire due à des mutations des *MMP9* et *MMP13* (Lausch 2009). Les souris mutantes pour ces gènes présentent un nanisme et des déformations osseuses, cependant leur phénotype est différent en particulier en ce qui concerne la minéralisation de l'os endochondral qui n'est pas déficiente, à l'inverse de la souris *fro/fro*. On n'observe pas d'accumulation d'HA dans ces chondrodysplasies.

- Un point important du phénotype de la souris *fro/fro* (nanisme, mortalité néo- et périnatale, déformation osseuse), est l'angulation caractéristique observée au niveau du tibia, comparable à celle observée dans la dysplasie campomélique qui dépend de la mutation de *SOX9*. Les résultats en immunofluorescence montrent une expression très faible de Sox9 dans la plaque de croissance, quel que soit le stade embryonnaire ou néonatal, avec en conséquence une diminution d'expression de *Col2A1* et de formation de la matrice, qui sont une des caractéristiques de la dysplasie campomélique. Nous n'avons pas étudié le fait que Sox9 puisse être muté chez la souris *fro/fro*, mais l'angulation se retrouve également chez la souris

smpd3 KO, ce qui suggère fortement une implication de la mutation (ou de l'absence) de nSMase2 dans le développement de l'angulation.

L'hypothèse que nous avons développée est que cette angulation pourrait résulter d'un défaut de condensation des cellules mésenchymateuses, dont Sox9 est un élément essentiel. Or ce mécanisme fait également intervenir l'expression de HAS2 et HA, déjà impliqués dans le délai de maturation des chondrocytes hypertrophiques (Li 2007 et cf. §4.2.). Cependant l'addition de HA sur les MSC en cours de différenciation, n'a pas d'effet sur l'expression des ARN messagers de Col2A1 ni sur l'expression de Sox9. Une hypothèse est que l'inhibition de PP2A pourrait être à l'origine de la dysfonction de Sox9. Or le rôle de PP2A dans la chondrogenèse est peu connu, à part les travaux du groupe de Zakany (Zakany 2002; Juhasz 2014) qui rapporte une activation de la différenciation chondrocytaire par l'acide okadaïque sur les cellules mésenchymateuses d'embryons de poulet, *via* l'activation de la PKA, et suggère une régulation négative de la chondrogenèse par PP2A (Zakany 2002; Matta 2014). Les souris KO pour PP2A meurent très tôt dès le 10ème jour de vie embryonnaire, et montrent une absence de formation du mésoderme (Götz 1999). Le KO conditionnel de PP2A pour le squelette n'a pas été généré, cependant les études de tératogenèse faites chez les larves de *Xenopus Laevis*, avec l'acide okadaïque, montrent une réduction de taille et des malformations au niveau de la queue avec une courbure du cartilage. Cependant aucune étude en immunofluorescence ni en transcriptomique n'a été réalisée sur l'effet de l'acide okadaïque chez ces animaux, et la malformation caudale reste pour l'instant non expliquée.

Nos résultats montrent que l'acide okadaïque bloque fortement l'expression de Col2A1 et Acan dans les cellules mésenchymateuses et dans les ATDC5, et inhibe partiellement l'expression de Sox9, ce qui suggère une implication de PP2A dans l'activation précoce de Sox9, qui devra être vérifiée par une approche d'inhibition plus moléculaire ("silencing" de PP2A par siRNA et expression de Sox9).

Par ailleurs l'acide okadaïque seul n'inhibe pas l'expression des ARN messagers de VEGF et de Runx2, contrairement à HA, cependant la co-incubation des C3H10T1/2 avec les deux agents, HA et acide okadaïque, inhibe totalement l'expression du VEGF et très fortement Runx2, MMP13, Col2A1 et Acan, ce qui mime *in vitro* le phénotype de la souris *fro/fro*. De même, le GW4869 qui inhibe la nSMase2 et inactive PP2A, a les mêmes effets que l'acide okadaïque sur l'expression du VEGF et Runx2, lorsqu'il est associé à HA.

L'ensemble de ces résultats montre que PP2A pourrait réguler l'expression et l'activité de Sox9 *via* la nSMase2 dans les cellules mésenchymateuses en cours de différenciation. Son inactivation due à l'absence de céramide (PP2A n'est pas mutée et peut être réactivée dans les

cellules et souris *fro/fro*), pourrait avoir au moins deux conséquences sur le développement des os longs, d'une part la dysfonction et expression de Sox9 d'où une faible expression de Col2A1, Acan et de la formation de matrice cartilagineuse, et d'autre part la surexpression de HAS2 et la sécrétion d'HA dans la plaque de croissance, qui empêcherait la maturation normale des chondrocytes hypertrophiques, leur vascularisation et leur minéralisation, et bloquerait l'apoptose. Cette hypothèse placerait PP2A très en amont dans le processus de la chondrogenèse avec une implication dans l'expression et la fonction de Sox9 qui n'a pas été rapportée jusqu'à présent. La nSMase2 pourrait intervenir comme un régulateur positif précoce de l'activité de cette phosphatase, et donc de l'activité de Sox9 au cours du développement osseux. Cette régulation ne semble pas être généralisée puisque la souris *fro/fro* n'a apparemment pas d'anomalies phénotypiques autres que le développement endochondral et la dentinogenèse anormale. On peut noter cependant que l'inversion de sexe, décrite dans la dysplasie campomélique, est très rare chez la souris *fro/fro*, mais pas absente. On ne note pas d'anomalie majeure du comportement, ce qui suggère une activité normale de PP2A lors de la neurulation dans laquelle la phosphatase jouerait un rôle très important (le cerveau est également le tissu dans lequel l'expression de la nSMase2 est la plus élevée) (Rao 1976). Des expériences complémentaires (co-immunoprécipitation) pourront être faites afin de démontrer s'il existe éventuellement des liens entre la nSMase2 et PP2A dans les tissus d'intérêt chez la souris *fro/fro* (cartilage, os, cerveau), au stade néonatal ou embryonnaire.

Par ailleurs, des études complémentaires seront nécessaires pour valider ces hypothèses, en particulier l'étude de l'expression de la β -caténine au cours du développement des chondrocytes, qui est également régulée négativement par PP2A (Stamos 2013). Les résultats préliminaires obtenus en immunofluorescence montrent en effet que la β -caténine active (non phosphorylée) est très faiblement exprimée chez le souriceau *fro/fro* nouveau-né, en accord avec la faible expression de Runx2 et l'absence de minéralisation des tibias (Fig 66). Or l'inactivation de PP2A devrait générer une activation constitutive de la β -caténine chez la souris *fro/fro*. Les résultats observés dans les fibroblastes montrent effectivement une activation de la β -caténine dans ces cellules. On retrouve également une expression de β -caténine active chez l'embryon de 12 à 14 jours, mais l'expression diminue dans les stades plus avancés, jusqu'à être presque absente chez le souriceau nouveau-né, ce qui suggère une régulation négative de la β -caténine dans la plaque de croissance, peut-être due à l'accumulation d'HA et la faible expression de Runx2.

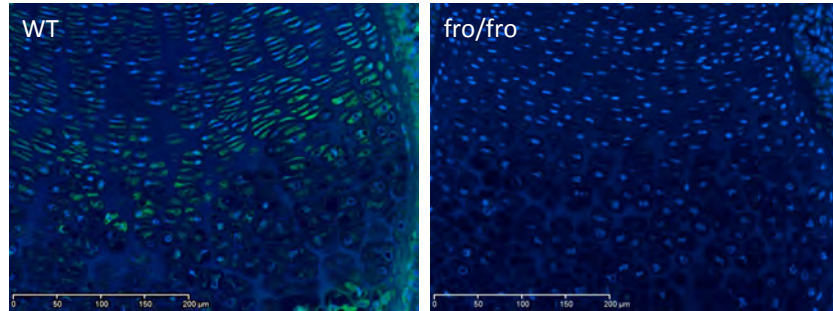


Figure 66 : Expression de β -caténine dans les plaques de croissance de souriceaux nouveaux-nés (wt et fro/fro). L'expression de β -caténine dans les embryons est plus importante chez les souris wt.

Les perspectives de ce travail sont très larges, en partie du fait des hypothèses proposées, non étayées par des approches sur animal permettant de reproduire le phénotype de souris *fro/fro* (par exemple en injectant l'acide okadaïque à des souris sauvages), ou au contraire des traitements pharmacologiques permettant de restaurer un phénotype normal chez la souris *fro/fro*.

- Un premier objectif sera de valider l'hypothèse impliquant PP2A dans le mécanisme physiopathologique de la souris *fro/fro*. Les résultats *in vitro* sont probant avec l'acide okadaïque et HA, mais des approches de biologie moléculaire seront nécessaires pour confirmer le rôle de PP2A et HAS2 (ainsi qu'Akt).

Ces études pourront être complétées par le ciblage *in vivo* de ces voies. Les approches pharmacologiques chez l'animal sont restées sans résultat jusqu'à présent. L'acide okadaïque est toxique pour les souris gestantes, à des doses ne permettant pas d'observer des effets tératogènes chez la souris (même si cet agent passe la barrière placentaire, Matias 1996). L'injection en intra-péritonéal (IP) de GW4869 à des souris sauvages, ne génère aucune malformation ou nanisme chez les souriceaux, mais ce composé ne passe peut-être pas la barrière placentaire. Chez la souris *fro/fro*, l'injection de C2-céramide dans diverses formulations n'a pas permis de réverser le phénotype de la souris, probablement parce que le céramide très hydrophobe, n'atteint pas sa cible et se répartit dans l'environnement immédiat de l'injection. Les essais actuels se concentrent sur la réactivation de PP2A par des agents tels que la perphénazine, un antipsychotique connu pour activer PP2A dans les cellules cancéreuses (Gutierrez 2014), ou le FTY720 qui est un immunomodulateur analogue structural de la S1P, et activateur de PP2A (Oaks 2015). Par ailleurs, nous projetons d'étudier l'effet d'inhibiteurs de HAS2 (methylumbelliférone), ou de HA (anticorps dirigés contre CD44), qui seront utilisés soit seuls, soit en association avec les agents ciblant PP2A.

- Un autre objectif est d'étudier le mécanisme de compensation qui permet la minéralisation et la vascularisation de l'os chez la souris *fro/fro* dans les jours suivant la naissance. En effet l'étude de la minéralisation osseuse chez ces animaux, montre que celle-ci est très retardée au cours de la vie embryonnaire et néonatale, mais se développe rapidement dans les semaines suivant la naissance, et les souris *fro/fro* adultes, bien que présentant des membres difformes, n'ont pas de problème de minéralisation. Il semble que la souris *fro/fro* présente à la fois un problème de chondrogenèse et d'ostéogenèse endochondrale, compensée après la naissance par une invasion d'ostéoblastes à partir du périoste et la constitution rapide d'un os normalement minéralisé et vascularisé.

- Un objectif important est d'étudier la mise en place des bourgeons dentaires chez les embryons de souris *fro/fro*, en particulier les différentes voies impliquées dans la dentinogenèse.

Enfin en conclusion, un objectif majeur sera d'étudier la mutation de *smpd3* dans certaines chondrodysplasies "orphelines", en particulier les dysplasies campoméliques sans mutation de *COL1A1*, ou les kyphomélies dont l'origine génétique n'est pas connue.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adams CS, Shapiro IM. The fate of the terminally differentiated chondrocyte: evidence for microenvironmental regulation of chondrocyte apoptosis. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002;13(6):465-73

Akiyama H., Chaboissier, M.C., Martin, J.F., Schedl, A., and de Crombrughe, B. 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.* 2002;16: 2813-2828

Akiyama H, Lyons JP, Mori-Akiyama Y, Yang X, Zhang R, Zhang Z, Deng JM, Taketo MM, Nakamura T, Behringer RR, McCrea PD, de Crombrughe B. Interactions between Sox9 and beta-catenin control chondrocyte differentiation. *Genes Dev.* 2004 May 1;18(9):1072-87

Alebrahim S, Khavandgar Z, Marulanda J, Murshed M. Inducible transient expression of *Smpd3* prevents early lethality in fro/fro mice. *Genesis.* 2014 May;52(5):408-16

Allende ML, Sasaki T, Kawai H, Olivera A, Mi Y, van Echten-Deckert G, Hajdu R, Rosenbach M, Keohane CA, Mandala S, Spiegel S, Proia RL. Mice deficient in sphingosine kinase 1 are rendered lymphopenic by FTY720. *J Biol Chem.* 2004 Dec 10;279(50):52487-92

Andersen PE Jr, Hauge M. Congenital generalised bone dysplasias: a clinical, radiological, and epidemiological survey. *J Med Genet.* 1989 jan;26(1):37-44

Arana L, Gangoiti P, Ouro A, Trueba M, Gómez-Muñoz A. Ceramide and ceramide 1-phosphate in health and disease. *Lipids Health Dis.* 2010 Feb 5;9:15

Arana-Chavez, V.E. and L.F. Massa, Odontoblasts: the cells forming and maintaining dentine. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004. 36(8): p. 1367-73

Aubin I, Adams CP, Opsahl S, Septier D, Bishop CE, Auge N, Salvayre R, Negre-Salvayre A, Goldberg M, Guénet JL, Poirier C. A deletion in the gene encoding sphingomyelin phosphodiesterase 3 (*Smpd3*) results in osteogenesis and dentinogenesis imperfecta in the mouse. *Nat Genet.* 2005 Aug;37(8):803-5

Aubin I, Guénet JL. Sphingomyélinases et ostéogénèse imparfaite. *M/S.* 2005 dec;12 (21):1034-1035

Augé N, Maupas-Schwalm F, Elbaz M, Thiers JC, Waysbort A, Itohara S, Krell HW, Salvayre R, Nègre-Salvayre A. Role for matrix metalloproteinase-2 in oxidized low-density lipoprotein-induced activation of the sphingomyelin/ceramide pathway and smooth muscle cell proliferation. *Circulation.* 2004 Aug 3;110(5):571-8

Baker J, Liu JP, Robertson EJ, Efstratiadis A. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell.* 1993 Oct 8;75(1):73-82

Ballock RT, O'Keefe RJ. Physiology and pathophysiology of the growth plate. *Birth Defects Res Part C Embryo Today.* 2003 ; 69:123–143

Bao X. The effect on proliferation and differentiation of cementoblast by using sclerostin as inhibitor. *Int J Mol Sci*, 2013. 14(10): p. 21140-52

Barbosa-Buck CO, Orioli IM, da Graça Dutra M, Lopez-Camelo J, Castilla EE, Cavalcanti DP. Clinical epidemiology of skeletal dysplasias in South America. *Am J Med Genet A.* 2012 may;158A(5):1038-45

Bartlett JD. Dental enamel development: proteinases and their enamel matrix substrates. *ISRN Dentistry*, 2013: p. 24

Bartke N, Hannun YA. Bioactive sphingolipids: metabolism and function. *J Lipid Res.* 2009 Apr;50 Suppl:S91-6

Bashyam MD, Chaudhary AK, Kiran M, Reddy V, Nagarajaram HA, Dalal A, Bashyam L, Suri D, Gupta A, Gupta N, Kabra M, Puri RD, RamaDevi R, Kapoor S, Danda S. Molecular analyses of novel ASAH1 mutations causing Farber lipogranulomatosis: analyses of exonic splicing enhancer inactivating mutation. Clin Genet. 2014 Dec;86(6):530-8

Bastepe M, Weinstein LS, Ogata N, Kawaguchi H, Jüppner H, Kronenberg HM, Chung UI. Stimulatory G protein directly regulates hypertrophic differentiation of growth plate cartilage *in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Oct 12;101(41):14794-9

Bedia C, Levade T, Codogno P, Regulation of autophagy by sphingolipids. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry. 2011;11(9):844-853

Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T, Tailor P, Morimoto RI, Cohen GM, Green DR. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. Nat Cell Biol. 2000 Aug;2(8):469-75

Begam MA, Alsafi W, Bekdache GN, Chedid F, Al-Gazali L, Mirghani HM. Stüve-Wiedemann syndrome: a skeletal dysplasia characterized by bowed long bones. Ultrasound Obstet Gynecol. 2011 Nov; 38(5):553-8

Bei M. Molecular genetics of tooth development. Curr Opin Genet Dev. 2009 oct;19(5):504-10

Bénazet JD, Zeller R. Vertebrate limb development: moving from classical morphogen gradients to an integrated 4-dimensional patterning system. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2009 oct;1(4):a001339

Bell DM, Leung KK, Wheatley SC, et al. SOX9 directly regulates the type-II collagen gene. Nat Genet. jun.1997;16:174–178

Berendsen AD, Olsen BR. How vascular endothelial growth factor-A (VEGF) regulates differentiation of mesenchymal stem cells. J Histochem Cytochem. 2014 feb;62(2):103-8

Bi W, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, de Crombrughe B. Sox9 is required for cartilage formation. Nat Genet. 1999 May;22(1):85-9

Bi W, Huang W, Whitworth DJ, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, de Crombrughe B. Haploinsufficiency of Sox9 results in defective cartilage primordia and premature skeletal mineralization. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 jun;98(12):6698-703

Biria M, Abbas FM, Mozaffar S, Ahmadi S. Dentinogenesis Imperfecta Associated with Osteogenesis Imperfecta. Dental Research Journal. 2012; 9:489–494

Bitgood MJ, McMahon AP. Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo. Dev Biol. 1995 Nov;172(1):126-38

Bohensky J, Shapiro IM, Leshinsky S, Terkhorn SP, Adams CS, Srinivas V. HIF-1 regulation of chondrocyte apoptosis: induction of the autophagic pathway. Autophagy. 2007 may-jun;3(3):207-14

Bourbon NA, Sandirasegarane L, Kester M. Ceramide-induced inhibition of Akt is mediated through protein kinase C ζ : implications for growth arrest. J Biol Chem. 2002 Feb 1;277(5):3286-92

Boyan BD, Schwartz Z, Swain LD, Carnes DL Jr, Zisli T. Differential expression of phenotype by resting zone and growth region costochondral chondrocytes *in vitro*. Bone. 1988; 9(3):185-94

Brown DA, London E. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. J Biol Chem. 2000 Jun 9;275(23):17221-4

Bursch W, Karwan A, Mayer M, Dornetshuber J, Fröhwein U, Schulte-Hermann R, Fazi B, Di Sano F, Piredda L, Piacentini M, Petrovski G, Fésüs L, Gerner C. Cell death and autophagy: cytokines, drugs, and nutritional factors. *Toxicology*. 2008 Dec 30;254(3):147-57

Camenisch TD, Spicer AP, Brehm-Gibson T, Biesterfeldt J, Augustine ML, Calabro A Jr, Kubalak S, Klewer SE, McDonald JA. Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme. *J Clin Invest*. 2000 Aug;106(3):349-60

Calderón RO, DeVries GH. Lipid composition and phospholipid asymmetry of membranes from a Schwann cell line. *J Neurosci Res*. 1997 Aug 1;49(3):372-80

Camilleri S, McDonald F. Runx2 and dental development. *Eur J Oral Sci*. 2006 Oct;114(5):361-73

Campo GM, Avenoso A, Campo S, D'Ascola A, Traina P, Rugolo CA, Calatroni A. Differential effect of molecular mass hyaluronan on lipopolysaccharide-induced damage in chondrocytes. *Innate Immunity*. 2010;16(1):48-63

Campeau P, Schlesinger AE. Skeletal Dysplasias. 2013 Sep 3. In: De Groot LJ, Beck-Peccoz P, Chrousos G, Dungan K, Grossman A, Hershman JM, Koch C, McLachlan R, New M, Rebar R, Singer F, Vinik A, Weickert MO, editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/books/NBK279130/>

Casarini L, Franchini A, Malagoli D, Ottaviani E. Evaluation of the effects of the marine toxin okadaic acid by using FETAX assay. *Toxicol Lett*. 2007; 145–151

Castillo SS, Levy M, Thaikootathil JV, Goldkorn T. Reactive nitrogen and oxygen species activate different sphingomyelinases to induce apoptosis in airway epithelial cells. *Exp Cell Res*. 2007 Jul 15;313(12):2680-6

Celil AB, Campbell PG. BMP-2 and insulin-like growth factor-I mediate Osterix (Osx) expression in human mesenchymal stem cells via the MAPK and protein kinase D signaling pathways. *J Biol Chem*. 2005 Sep 9;280(36):31353-9

Chalfant CE, Kishikawa K, Mumby MC, Kamibayashi C, Bielawska A, Hannun YA. Long chain ceramides activate protein phosphatase-1 and protein phosphatase-2A. Activation is stereospecific and regulated by phosphatidic acid. *J Biol Chem*. 1999 Jul 16;274(29):20313-7

Chae YM, Heo SH, Kim JY, Lee JM, Ryoo HM, Cho JY. Upregulation of *smpd3* via BMP2 stimulation and Runx2. *BMB Rep*. 2009 Feb 28; 42(2):86-90

Chan H, Pitson SM. Post-translational regulation of sphingosine kinases. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Jan;1831(1):147-56

Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*. 2004 Dec;22(4):233-41

Chen J1, Martin BL, Brautigan DL. Regulation of protein serine-threonine phosphatase type-2A by tyrosine phosphorylation. *Science*. 1992 Aug 28;257(5074):1261-4

Chen L, Deng CX. Roles of FGF signaling in skeletal development and human genetic diseases. *Front Biosci*. 2005 May 1;10:1961-76

Chipuk JE, McStay GP, Bharti A, Kuwana T, Clarke CJ, Siskind LJ, Obeid LM, Green DR. Sphingolipid metabolism cooperates with BAK and BAX to promote the mitochondrial pathway of apoptosis. *Cell*. 2012 Mar 2;148(5):988-1000

Clarke CJ, Snook CF, Tani M, Matmati N, Marchesini N, Hannun YA. The extended family of neutral sphingomyelinases. *Biochemistry*. 2006 ;45 (38) :11247-11256

Clarke CJ, Truong TG, Hannun YA. Role for neutral sphingomyelinase-2 in tumor necrosis factor alpha-stimulated expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM) in lung epithelial cells: p38 MAPK is an upstream regulator of nSMase2. *J Biol Chem*. 2007 Jan 12;282(2):1384-96

Clarke CJ, Guthrie JM, Hannun YA. Regulation of neutral sphingomyelinase-2(nSMase2) by tumor necrosis factor-alpha involves protein kinase C-delta in lung epithelial cells. *Mol Pharmacol*. 2008 Oct;74(4):1022-32

Clarke CJ, Mediwalla K, Jenkins RW, Sutton CA, Tholanikunnel BG, Hannun YA. Neutral sphingomyelinase-2 mediates growth arrest by retinoic acid through modulation of ribosomal S6 kinase. *J Biol Chem*. 2011 Jun 17; 286(24):21565-76

Cinq-Frais C, Coatrieux C, Grazide MH, Hannun YA, Negre-Salvayre A, Salvayre R, Augé N. A signalling cascade mediated by ceramide, src and PDGFR β coordinates the activation of the redox-sensitive neutral sphingomyelinase-2 and sphingosine kinase-1. *Biochimica and Biophysica Acta*. 2013;1831 (8) :1344-1356

Corcoran CA, He Q, Ponnusamy S, Ogretmen B, Huang Y, Sheikh MS. Neutral sphingomyelinase-3 is a DNA damage and nongenotoxic stress-regulated gene that is deregulated in human malignancies. *Mol Cancer Res*. 2008 May;6(5):795-807

Cormier-Daire V, Superti-Furga A, Munnich A, Lyonnet S, Rustin P, Delezoide AL, De Lonlay P, Giedion A, Maroteaux P, Le Merrer M. Clinical homogeneity of the Stüve-Wiedemann syndrome and overlap with the Schwartz-Jampel syndrome type 2. *Am J Med Genet*. 1998 Jun 30;78(2):146-9

Cormier-Daire V, Geneviève D, Munnich A, Le Merrer M. New insights in congenital bowing of the femora. *Clin Genet*. 2004 Sep;66(3):169-76

Cornell TT1, Hinkovska-Galcheva V, Sun L, Cai Q, Hershenson MB, Vanway S, Shanley TP. Ceramide-dependent PP2A regulation of TNF α -induced IL-8 production in respiratory epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2009 May;296(5):L849-56.

Cremesti AE, Goni FM, Kolesnick R. Role of sphingomyelinase and ceramide in modulating rafts : do biophysical properties determine biologic outcomes ? *FEBS Letters* 2002 ;531 (1) :47-53

Cuvillier O, Pirianov G, Kleuser B, Vanek PG, Coso OA, Gutkind S, Spiegel S. Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature*. 1996 ;381 (6585) :800-803

Dawson JF, Holmes CF. Molecular mechanisms underlying inhibition of protein phosphatases by marine toxins. *Front Biosci*. 1999 Oct 1;4:D646-58

DeChiara TM, Robertson EJ, Efstratiadis A. Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell*. 1991 Feb 22;64(4):849-59

Dean DD, Schwartz ZV, Muniz OE, Gomez R, Swain LD, Howell DS, Boyan BD. Matrix vesicles contain metalloproteinases that degrade proteoglycans. *Bone Miner*. 1992 May;17(2):172-6

de Crombrughe B, Lefebvre V, Behringer RR, Bi W, Murakami S, Huang W. Transcriptional mechanisms of chondrocyte differentiation. *Matrix Biol*. 2000 Sep; 19(5):389-94

Degnin CR, Laederich MB, Horton WA. FGFs in endochondral skeletal development. *J Cell Biochem*. 2010 Aug 1;110(5):1046-57

Devillard R, Galvani S, Thiers JC, Guenet JL, Hannun Y, Bielawski J, Nègre-Salvayre A, Salvayre R, Augé N. Stress-induced sphingolipid signaling: role of type-2 neutral sphingomyelinase in murine cell apoptosis and proliferation. *PLoS One*. 2010 Mar 23;5(3):e9826

Dobrowsky RT, Kamibayashi C, Mumby MC, Hannun YA. Ceramide activates heterotrimeric protein phosphatase 2A. *J Biol Chem*. 1993 Jul 25;268(21):15523-30

Dotson PP 2nd, Karakashian AA, Nikolova-Karakashian MN. Neutral sphingomyelinase-2 is a redox sensitive enzyme : role of catalytic cysteine residues in regulation of enzyme activity through changes in oligomeric state. *Biochemical Journal*. 2015 ; 465(3) :371-82

Duan RD. Alkaline sphingomyelinase: an old enzyme with novel implications. *Biochim Biophys Acta*. 2006 Mar;1761(3):281-91

Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*. 1997 May 30;89(5):747-54

Eames BF, de la Fuente L, Helms JA. Molecular ontogeny of the skeleton. *Birth Defects Res Part C Embryo To- day*. 2003. 69:93–101

Encha-Ravazi F, Escudier E. Embryologie. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Obstétrique 2010 ; 5-001-A-50

Enomoto-Iwamoto M, Kitagaki J, Koyama E, Tamamura Y, Wu C, Kanatani N, Koike T, Okada H, Komori T, Yoneda T, Church V, Francis-West PH, Kurisu K, Nohno T, Pacifici M, Iwamoto M. The Wnt antagonist Frzb-1 regulates chondrocyte maturation and long bone development during limb skeletogenesis. *Dev Biol*. 2002 Nov 1;251(1):142-56

Egan DF, Shackelford DB, Mihaylova MM, Gelino S, Kohnz RA, Mair W, Vasquez DS, Joshi A, Gwinn DM, Taylor R, Asara JM, Fitzpatrick J, Dillin A, Viollet B, Kundu M, Hansen M, Shaw RJ. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science*. 2011 Jan 28;331(6016):456-61

Erlebacher A, Filvaroff EH, Gitelman SE, Derynck R. Toward a molecular understanding of skeletal development. *Cell*. 1995; 80:371–378

Ersek A, Karadimitris A, Horwood NJ. Effect of glycosphingolipids on osteoclastogenesis and osteolytic bone diseases. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2012 Aug 23;3:106

Filosto S, Fry W, Knowlton AA, Goldkorn T. Neutral sphingomyelinase 2(nSMase2) is a phosphoprotein regulated by calcineurin (PP2B). *J Biol Chem*. 2010 Apr 2;285(14):10213-22

Filosto S, Castillo S, Danielson A, Franzi L, Khan E, Kenyon N, Last J, Pinkerton K, Tudor R, Goldkorn T. Neutral sphingomyelinase 2 : a novel target in cigarette smoke-induced apoptosis and lung injury. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2011 ;44 (3) :350-360

Foster JW, Dominguez-Steglich MA, Guioli S, Kwok C, Weller PA, Stevanović M, Weissenbach J, Mansour S, Young ID, Goodfellow PN, et al. Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature*. 1994 Dec 8;372(6506):525-30

Franchini A, Malagoli D, Ottaviani E. Targets and effects of yessotoxin, okadaic acid and palytoxin: a differential review. *Mar Drugs*. 2010 Mar 16;8(3):658-77

Fraser JR, Laurent TC, Laurent UB. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med*. 1997 Jul;242(1):27-33

Fraser GJ, Hulsey CD, Bloomquist RF, Uyesugi K, Manley NR, Streelman JT. An ancient gene network is co-opted for teeth on old and new jaws. *PLoS Biol.* 2009 Feb 10;7(2):e31

Fucho R, Martínez L, Baulies A, Torres S, Tarrats N, Fernandez A, Ribas V, Astudillo AM, Balsinde J, Garcia-Rovés P, Elena M, Bergheim I, Lotersztajn S, Trautwein C, Appelqvist H, Paton AW, Paton JC, Czaja MJ, Kaplowitz N, Fernandez-Checa JC, García-Ruiz C. ASMase regulates autophagy and lysosomal membrane permeabilization and its inhibition prevents early stage non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol.* 2014 nov ;61(5):1126-34

Fukuhara S, Simmons S, Kawamura S, Inoue A, Orba Y, Tokudome T, Sunden Y, Arai Y, Moriwaki K, Ishida J, Uemura A, Kiyonari H, Abe T, Fukamizu A, Hirashima M, Sawa H, Aoki J, Ishii M, Mochizuki N. The sphingosine-1-phosphate transporter Spns2 expressed on endothelial cells regulates lymphocyte trafficking in mice. *J Clin Invest.* 2012 Apr;122(4):1416-26

Garoby-Salom S, Rouahi M, Mucher E, Auge N, Salvayre R, Negre-Salvayre A. Hyaluronan synthase-2 upregulation protects *smpd3*-deficient fibroblasts against cell death induced by nutrient deprivation, but not against apoptosis evoked by oxidized LDL. *Redox Biol.* 2015;4:118-26

Gao Y, Liu S, Huang J, Guo W, Chen J, Zhang L, Zhao B, Peng J, Wang A, Wang Y, Xu W, Lu S, Yuan M, Guo Q. The ECM-cell interaction of cartilage extracellular matrix on chondrocytes. *Biomed Res Int.* 2014;2014:648459

Gault CR, Obeid LM, Hannun YA. An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown. *Adv Exp Med Biol.* 2010;688:1-23

Ge C, Xiao G, Jiang D, Franceschi RT. Critical role of the extracellular signal-regulated kinase-MAPK pathway in osteoblast differentiation and skeletal development. *J Cell Biol.* 2007 Feb 26;176(5):709-18

Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med.* 1999 Jun;5(6):623-8

Gibson G. Active role of chondrocyte apoptosis in endochondral ossification. *Microsc Res Tech.* 1998 Oct 15;43(2):191-204

Goldberg M, Boskey AL. Lipids and biomineralizations. *Prog Histochem Cytochem.* 1996;31(2):1-187

Goldberg M, Opsahl S, Aubin I, Septier D, Chaussain-Miller C, Boskey A, Guenet JL. Sphingomyelin degradation is a key factor in dentin and bone mineralization: lessons from the *fro/fro* mouse. The chemistry and histochemistry of dentin lipids. *J Dent Res.* 2008 Jan;87(1):9-13

Goldberg M, Kulkarni AB, Young M, Boskey A. Dentin: structure, composition and mineralization. *Front Biosci (Elite Ed).* 2011 Jan 1;3:711-35

Goldberg M, Gaucher C. Embryologie de la dent. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Stomatologie 2013; 22-001-A-22

Goldring MB, Tsuchimochi K, Ijiri K. The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem.* 2006 Jan 1;97(1):33-44

Golub EE. Role of matrix vesicles in biomineralization. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Dec;1790(12):1592-8

Götz J, Probst A, Ehler E, Hemmings B, Kues W. Delayed embryonic lethality in mice lacking protein phosphatase 2A catalytic subunit Calpha. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95:12370-12375

Götz J, Kues W. The role of protein phosphatase 2A catalytic subunit Calpha in embryogenesis: evidence from sequence analysis and localization studies. *Biol Chem.* 1999 Sep;380(9):1117-20

Grey A, Xu X, Hill B, Watson M, Callon K, Reid IR, Cornish J. Osteoblastic cells express phospholipid receptors and phosphatases and proliferate in response to sphingosine-1-phosphate. *Calcif Tissue Int.* 2004 Jun;74(6):542-50

Grimsrud CD, Romano PR, D'Souza M, Puzas JE, Reynolds PR, Rosier RN, O'Keefe RJ. BMP-6 is an autocrine stimulator of chondrocyte differentiation. *J Bone Miner Res.* 1999 Apr;14(4):475-82

Grimsrud CD, Romano PR, D'Souza M, Puzas JE, Schwarz EM, Reynolds PR, Roiser RN, O'Keefe RJ. BMP signaling stimulates chondrocyte maturation and the expression of Indian hedgehog. *J Orthop Res.* 2001 Jan;19(1):18-25

Guénet JL, and Mercier-Balaz M: Private communication. *Mouse News Letter* 53: 57-58, 1975

Guenet JL, Stanescu R, Maroteaux P, Stanescu V. Fragilitas ossium: a new autosomal recessive mutation in the mouse. *J Hered.* 1981 Nov-Dec;72(6):440-1

Guenther GG, Peralta ER, Rosales KR, Wong SY, Siskind LJ, Edinger AL. Ceramide starves cells to death by downregulating nutrient transporter proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Nov 11;105(45):17402-7

Gutierrez A, Pan L, Groen RW, Baleyrier F, Kentsis A, Marineau J, Grebliunaite R, Kozakewich E, Reed C, Pflumio F, Poglio S, Uzan B, Clemons P, VerPlank L, An F, Burbank J, Norton S, Tolliday N, Steen H, Weng AP, Yuan H, Bradner JE, Mitsiades C, Look AT, Aster JC. Phenothiazines induce PP2A-mediated apoptosis in T cell acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest.* 2014 Feb;124(2):644-55

Hall BK, Miyake T. Divide, accumulate, differentiate: cell condensation in skeletal development revisited. *Int J Dev Biol.* 1995 Dec;39(6):881-93

Hall BK, Miyake T. All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. *Bioessays.* 2000 Feb;22(2):138-47

Hall RK, Manière MC, Palamara J, Hemmerlé J. Odontoblast dysfunction in osteogenesis imperfecta: an LM, SEM, and ultrastructural study. *Connect Tissue Res.* 2002;43(2-3):401-5

Han X, Zhou J, Zhang P, Song F, Jiang R, Li M, Xia F, Guo FJ. IRE1 α dissociates with BiP and inhibits ER stress-mediated apoptosis in cartilage development. *Cell Signal.* 2013 Nov;25(11):2136-46

Hanada K. Intracellular trafficking of ceramide by ceramide transfer protein. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2010;86(4):426-37

Hannun YA, Obeid LM. Principles of bioactive lipids signalling : lessons from sphingolipids. *Nature Reviews Molecular Medicine Cell Biology.* 2008 ; 9 (2) :139-150

Hannun YA, Obeid LM. Many ceramides. *J Biol Chem.* 2011 Aug 12;286(32):27855-62

Harmey D, Hesse L, Narisawa S, Johnson KA, Terkeltaub R, Millán JL. Concerted regulation of inorganic pyrophosphate and osteopontin by akp2, enpp1, and ank: an integrated model of the pathogenesis of mineralization disorders. *Am J Pathol.* 2004 Apr;164(4):1199-209

Hattori T, Muller C, Gebhard S, et al. SOX9 is a major negative regulator of cartilage vascularization, bone marrow formation and endochondral ossification. *Development.* Mar.2010 137:901–911

Heinrich M, Neumeyer J, Jakob M, Hallas C, Tchikov V, Winoto-Morbach S, Wickel M, Schneider-

Brachert W, Trauzold A, Hethke A, Schütze S. Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and -3 activation. *Cell Death Differ.* 2004 May;11(5):550-63

Hetz CA, Hunn M, Rojas P, Torres V, Leyton L, Quest AF. Caspase-dependent initiation of apoptosis and necrosis by the Fas receptor in lymphoid cells: onset of necrosis is associated with delayed ceramide increase. *J Cell Sci.* 2002 Dec 1;115(Pt 23):4671-83

Herr I, Debatin KM (2001) Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood* 98(9):2603–2614

Hill PA, Tumber A. Ceramide-induced cell death/survival in murine osteoblasts. *J Endocrinol.* 2010 Aug;206(2):225-33

Hla T. Physiological and pathological actions of sphingosine 1-phosphate. *Semin Cell Dev Biol.* 2004 Oct;15(5):513-20

Hofmann K1, Tomiuk S, Wolff G, Stoffel W. Cloning and characterization of the mammalian brain-specific, Mg²⁺-dependent neutral sphingomyelinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 May 23;97(11):5895-900

Hu W, Xu R, Sun W, Szulc ZM, Bielawski J, Obeid LM, Mao C. Alkaline ceramidase 3 (ACER3) hydrolyzes unsaturated long-chain ceramides, and its down-regulation inhibits both cell proliferation and apoptosis. *J Biol Chem.* 2010 Mar 12;285(11):7964-76

Ishii M, Kikuta J. Sphingosine-1-phosphate signaling controlling osteoclasts and bone homeostasis. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Jan;1831(1):223-7

Iwamoto M, Enomoto-Iwamoto M, Kurisu K. Actions of hedgehog proteins on skeletal cells. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1999; 10(4):477-86

Jemtland R, Divieti P, Lee K, Segre GV. Hedgehog promotes primary osteoblast differentiation and increases PTHrP mRNA expression and iPTHrP secretion. *Bone.* 2003 Jun;32(6):611-20

Janssens V, Goris J, Van Hoof C. PP2A: The expected tumor suppressor. *Curr Opin Genet Dev.* 2005; 15:34–41

Jarvis WD, Grant S, Kolesnick RN. Ceramide and the induction of apoptosis. *Clinical Cancer Research.* 1996; 2:1-6

Jernvall J, Thesleff I. Tooth shape formation and tooth renewal: evolving with the same signals. *Development.* 2012 Oct;139(19):3487-97

Jouve JL, Bollini G, Launay F, Glard Y, Craviari T, Guillaume JM, Panuel M. Cartilage de croissance et croissance en orthopédie. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Appareil Locomoteur 2009; 14-009-A-10

Juhász T, Matta C1, Somogyi C1, Katona É1, Takács R1, Soha RF2, Szabó IA2, Cserhádi C2, Szödy R3, Karácsonyi Z4, Bakó E5, Gergely P5, Zákány R. Mechanical loading stimulates chondrogenesis *via* the PKA/CREB-Sox9 and PP2A pathways in chicken micromass cultures. *Cell Signal.* 2014 Mar;26(3):468-82

Kamoun-Goldrat AS, Le Merrer MF. Animal models of osteogenesis imperfecta and related syndromes. *J Bone Miner Metab.* 2007;25(4):211-8

Karsenty G, Wagner EF. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev Cell.* 2002 Apr;2(4):389-406

Kato K, Adachi S, Matsushima-Nishiwaki R, Minamitani C, Natsume H, Katagiri Y, Hirose Y, Mizutani J, Tokuda H, Kozawa O, Otsuka T. Regulation by heat shock protein 27 of osteocalcin synthesis in osteoblasts. *Endocrinology*. 2011 May;152(5):1872-82

Kawashima, N., Characterisation of dental pulp stem cells: A new horizon for tissue regeneration? *Archives of Oral Biology*, 2012. 57(11): p. 1439-1458

Keller J, Catala-Lehnen P, Huebner AK, Jeschke A, Heckt T, Lueth A, Krause M, Koehne T, Albers J, Schulze J, Schilling S, Haberland M, Denninger H, Neven M, Hermans-Borgmeyer I, Streichert T, Breer S, Barvencik F, Levkau B, Rathkolb B, Wolf E, Calzada-Wack J, Neff F, Gailus-Durner V, Fuchs H, de Angelis MH, Klutmann S, Tsourdi E, Hofbauer LC, Kleuser B, Chun J, Schinke T, Amling M. Calcitonin controls bone formation by inhibiting the release of sphingosine 1-phosphate from osteoclasts. *Nat Commun*. 2014 Oct 21;5:5215

Kern B, Shen J, Starbuck M, Karsenty G. Cbfa1 contributes to the osteoblast-specific expression of type I collagen genes. *J Biol Chem*. 2001 Mar 9;276(10):7101-7

Khavandgar Z, Poirier C, Clarke CJ, Li J, Wang N, McKee MD, Hannun YA, Murshed M. A cell-autonomous requirement for neutral sphingomyelinase 2 in bone mineralization. *Journal of Cell Biology*. 2011 ; 194 (2) :277-289

Khavandgar Z, Alebrahim S, Eimar H, Tamimi F, McKee MD, Murshed M. Local regulation of tooth mineralization by sphingomyelin phosphodiesterase 3. *J Dent Res*. 2013 apr; 92(4):358-64

Khavandgar Z, Murshed M. Sphingolipid metabolism and its role in the skeletal tissues. *Cell Mol Life Sci*. 2015 Mar;72(5):959-69

Kim MK, Lee HY, Kwak JY, Park JI, Yun J, Bae YS. Sphingosine-1-phosphate stimulates rat primary chondrocyte proliferation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Jun 23;345(1):67-73

Kim YS, Ahn KH, Kim SY, Jeong JW. Okadaic acid promotes angiogenesis via activation of hypoxia-inducible factor-1. *Cancer Lett*. 2009 Apr 8;276(1):102-8

Kirsch T, Nah HD, Demuth DR, Harrison G, Golub EE, Adams SL, Pacifici M. Annexin V-mediated calcium flux across membranes is dependent on the lipid composition : implications for cartilage mineralization. *Biochemistry*. 1997 ; 36 :3359-3367

Kirsh T, Harrison G, Golub EE, Nah HD. The roles of annexins and types II and X collagen in matrix vesicle-mediated mineralization of growth plate cartilage. *The Journal of Biochemical Chemistry*.2000 ;275 :35577-35583

Kobayashi T, Chung UI, Schipani E, Starbuck M, Karsenty G, Katagiri T, Goad DL, Lanske B, Kronenberg HM. PTHrP and Indian hedgehog control differentiation of growth plate chondrocytes at multiple steps. *Development*. 2002 Jun;129(12):2977-86

Kolesnick R, Fuks Z. Ceramide : a signal for apoptosis or mitogenesis ? *Journal of Experimental Medecine* 181 (6) (1995) 1949-1952

Kolter T, Sandhoff K. Principles of lysosomal membrane digestion: stimulation of sphingolipid degradation by sphingolipid activator proteins and anionic lysosomal lipids. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2005;21:81-103

Kono M, Dreier JL, Ellis JM, Allende ML, Kalkofen DN, Sanders KM, Bielawski J, Bielawska A, Hannun YA, Proia RL. Neutral ceramidase encoded by the Asah2 gene is essential for the intestinal degradation of sphingolipids. *J Biol Chem*. 2006 Mar 17;281(11):7324-31

Kozawa O, Niwa M, Matsuno H, Tokuda H, Miwa M, Ito H, Kato K, Uematsu T. Sphingosine 1-phosphate induces heat shock protein 27 via p38 mitogen-activated protein kinase activation in osteoblasts. *J Bone Miner Res*. 1999 Oct;14(10):1761-7

Krakow D. Skeletal Dysplasias. *Clin Perinatol*. 2015 Jun;42(2):301-319

Krakow D, Rimoin DL. The skeletal dysplasias. *Genet Med*. 2010 Jun;12(6):327-41

Kronenberg H. Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 2003. 423: 332–336

Krut O, Wiegmann K, Kashkar H, Yazdanpanah B, Krönke M. Novel tumor necrosis factor-responsive mammalian neutral sphingomyelinase-3 is a C-tail-anchored protein. *J Biol Chem*. 2006 May 12;281(19):13784-93

Kwan KM, Pang MK, Zhou S, Cowan SK, Kong RY, Pfordte T, Olsen BR, Silience DO, Tam PP, Cheah KS. Abnormal compartmentalization of cartilage matrix components in mice lacking collagen X: implications for function. *J Cell Biol*. 1997 Jan 27;136(2):459-71

Kwon TG, Zhao X, Yang Q, Li Y, Ge C, Zhao G, Franceschi RT. Physical and functional interactions between Runx2 and HIF-1 α induce vascular endothelial growth factor gene expression. *J Cell Biochem*. 2011 Dec;112(12):3582-93

Lausch E, Keppler R, Hilbert K, Cormier-Daire V, Nikkel S, Nishimura G, Unger S, Spranger J, Superti-Furga A, Zabel B. Mutations in MMP9 and MMP13 determine the mode of inheritance and the clinical spectrum of metaphyseal anadysplasia. *Am J Hum Genet*. 2009 Aug;85(2):168-78

Law B, Rossie S. The dimeric and catalytic subunit forms of protein phosphatase 2A from rat brain are stimulated by C2-ceramide. *J Biol Chem*. 1995 May 26;270(21):12808-13

Leclercq TM, Pitson SM. Cellular signalling by sphingosine kinase and sphingosine 1-phosphate. *IUBMB Life*. 2006 Aug;58(8):467-72

Lee DH, Kim SH, Ahn KH, Kim SK, Choi JM, Ji JE, Won JH, Park YH, Lim C, Kim S, Kim DK. Identification and evaluation of neutral sphingomyelinase 2 inhibitors. *Arch Pharm Res*. 2011 Feb;34(2):229-36

Lee SH, Che X, Jeong JH, Choi JY, Lee YJ, Lee YH, Bae SC, Lee YM. Runx2 protein stabilizes hypoxia-inducible factor-1 α through competition with von Hippel-Lindau protein (pVHL) and stimulates angiogenesis in growth plate hypertrophic chondrocytes. *J Biol Chem*. 2012 Apr 27;287(18):14760-71

Lee JK, Jin HK, Park MH, Kim BR, Lee PH, Nakauchi H, Carter JE, He X, Schuchman EH, Bae JS. Acid sphingomyelinase modulates the autophagic process by controlling lysosomal biogenesis in Alzheimer's disease. *J Exp Med*. 2014 Jul 28; 211(8):1551-70

Lefebvre V, Huang W, Harley VR, Goodfellow PN, de Crombrughe B. SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro α 1(II) collagen gene. *Mol Cell Biol*. Apr.1997 17:2336–2346

Lefebvre V, Smits P. Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2005 Sep; 75(3):200-12

Le Stunff H, Galve-Roperh I, Peterson C, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase in regulation of sphingolipid metabolism and apoptosis. *J Cell Biol*. 2002 Sep 16;158(6):1039-49

Leung VY, Gao B, Leung KK, et al. SOX9 governs differentiation stage-specific gene expression in growth plate chondrocytes via direct concomitant transactivation and repression. *PLoS Genet*. Nov.2011 7:e1002356

- Levade T, Jaffrézou JP. Signalling sphingomyelinases: which, where, how and why? *Biochim Biophys Acta*. 1999 Apr 19;1438(1):1-17
- Levy M, Castillo SS, Goldkorn T. nSMase2 activation and trafficking are modulated by oxidative stress to induce apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Jun 9; 344(3):900-5
- Levy M, Futerman AH. Mammalian ceramide synthases. *IUBMB Life*. 2010 May;62(5):347-56
- Li Y, Toole BP, Dealy CN, Kosher RA. Hyaluronan in limb morphogenesis. *Dev Biol*. 2007, 305:411-20
- Lin L1, Shen Q, Leng H, Duan X, Fu X, Yu C. Synergistic inhibition of endochondral bone formation by silencing Hif1 α and Runx2 in trauma-induced heterotopic ossification. *Mol Ther*. 2011 Aug;19(8):1426-32. doi: 10.1038/mt.2011.101. Epub 2011 May 31
- Lindau B, Dietz W, Lundgren T, Storhaug K, Norén JG. Discrimination of morphological findings in dentine from osteogenesis imperfecta patients using combinations of polarized light microscopy, microradiography and scanning electron microscopy. *Int J Paediatr Dent*. 1999 Dec;9(4):253-61
- Liu R, Farach-Carson MC, Karin NJ. Effects of sphingosine derivatives on MC3T3-E1 pre-osteoblasts: psychosine elicits release of calcium from intracellular stores. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995 Sep 14;214(2):676-84
- Long F, Zhang XM, Karp S, Yang Y, McMahon AP. Genetic manipulation of hedgehog signaling in the endochondral skeleton reveals a direct role in the regulation of chondrocyte proliferation. *Development*. 2001 Dec;128(24):5099-108
- Lotinun S, Kiviranta R, Matsubara T, Alzate JA, Neff L, Lüth A, Koskivirta I, Kleuser B, Vacher J, Vuorio E, Horne WC, Baron R. Osteoclast-specific cathepsin K deletion stimulates S1P-dependent bone formation. *J Clin Invest*. 2013 Feb;123(2):666-81
- Luft FC. Acid sphingomyelinase, autophagy, and atherosclerosis. *Journal of Molecular Medicine (Berlin)*. 2014 ; 92 (5) :429-431
- Lyons JM, Karin NJ. A role for G protein-coupled lysophospholipid receptors in sphingolipid-induced Ca²⁺ signaling in MC3T3-E1 osteoblastic cells. *J Bone Miner Res*. 2001 Nov;16(11):2035-42
- Maceyka M, Sankala H, Hait NC, Le Stunff H, Liu H, Toman R, Collier C, Zhang M, Satin LS, Merrill AH Jr, Milstien S, Spiegel S. SphK1 and SphK2, sphingosine kinase isoenzymes with opposing functions in sphingolipid metabolism. *J Biol Chem*. 2005 Nov 4;280(44):37118-29
- Maceyka M, Harikumar KB, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate signalling and its role in disease. *Trends in Cell Biology*. 2012;22 (1) :50-60
- Mackie EJ, Ahmed YA, Tatarczuch L, Chen KS, Mirams M. Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40(1):46-62
- Mackie EJ, Tatarczuch L, Mirams M. The skeleton: a multi-functional complex organ: the growth plate chondrocyte and endochondral ossification. *J Endocrinol*. 2011 Nov;211(2):109-21
- MacLean HE, Kronenberg HM. Localization of Indian hedgehog and PTH/PTHrP receptor expression in relation to chondrocyte proliferation during mouse bone development. *Dev Growth Differ*. 2005 Feb;47(2):59-63
- MacRae VE, Burdon T, Ahmed SF, Farquharson C. Ceramide inhibition of chondrocyte proliferation and bone growth is IGF-I independent. *J Endocrinol*. 2006 Nov;191(2):369-77

Maeda S, Dean DD, Gomez R, Schwartz Z, Boyan BD. The first stage of transforming growth factor beta1 activation is release of the large latent complex from the extracellular matrix of growth plate chondrocytes by matrix vesicle stromelysin-1 (MMP-3). *Calcif Tissue Int.* 2002 Jan;70(1):54-65

Maes C. Role and regulation of vascularization processes in endochondral bones. *Calcif Tissue Int.* 2013 Apr;92(4):307-23

Majorana A, Bardellini E, Brunelli PC, Lacaita M, Cazzolla AP, Favia G. Dentinogenesis imperfecta in children with osteogenesis imperfecta: a clinical and ultrastructural study. *Int J Paediatr Dent.* 2010 Mar;20(2):112-8

Mak KK, Chen MH, Day TF, Chuang PT, Yang Y. Wnt/beta-catenin signaling interacts differentially with Ihh signaling in controlling endochondral bone and synovial joint formation. *Development.* 2006 Sep;133(18):3695-707

Mansour S., C. Hall, M. Pembrey and I. D. Young. A clinical and genetic study of campomelic dysplasia. *J Med Genet.* 1995; 32 (6): 415–420

Mao C, Obeid LM. Ceramidases: regulators of cellular responses mediated by ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate. *Biochim Biophys Acta.* 2008 Sep;1781(9):424-34

Marchesini N, Osta W, Bielawski J, Luberto C, Obeid LM, Hannun YA. Role for mammalian neutral sphingomyelinase 2 in confluence-induced growth arrest of MCF7 cells. *J Biol Chem.* 2004 Jun 11;279(24):25101-11

Marchesini N, Luberto C, Hannun YA. Biochemical properties of mammalian neutral sphingomyelinase 2 and its role in sphingolipid metabolism. *J Biol Chem.* 2003 Apr 18; 278(16):13775-83

Marchesini N, Hannun YA. Acid and neutral sphingomyelinases: roles and mechanisms of regulation. *Biochem Cell Biol.* 2004 Feb;82(1):27-44

Marciniak SJ, Ron D. Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. *Physiol Rev.* 2006 Oct;86(4):1133-49

Maroteaux P, Spranger J, Opitz JM, Kucera J, Lowry RB, Schimke RN, et al. Le syndrome campomélisque. *Presse Med.* 1971 ;79 :1157-62

Maroteaux P, Le Merrer M. Les maladies osseuses de l'enfant. Paris : Flammarion Médecine-Sciences. 2002

Masuko K, Murata M, Nakamura H, Yudoh K, Nishioka K, Kato T. Sphingosine-1-phosphate attenuates proteoglycan aggrecan expression via production of prostaglandin E2 from human articular chondrocytes. *BMC Musculoskelet Disord.* 2007 Mar 20;8:29

Masuko K, Murata M, Beppu M, Nakamura H, Kato T, Yudoh K. Sphingosine-1-phosphate modulates expression of vascular endothelial growth factor in human articular chondrocytes: a possible new role in arthritis. *Int J Rheum Dis.* 2012 Aug;15(4):366-73

Matsumoto K, Li Y, Jakuba C, Sugiyama Y, Sayo T, Okuno M, Dealy CN, Toole BP, Takeda J, Yamaguchi Y, Kosher RA. Conditional inactivation of Has2 reveals a crucial role for hyaluronan in skeletal growth, patterning, chondrocyte maturation and joint formation in the developing limb. *Development.* 2009 Aug;136(16):2825-35

Matta C, Mobasheri A, Gergely P, Zákány R. Ser/Thr-phosphoprotein phosphatases in chondrogenesis: neglected components of a two-player game. *Cell Signal.* 2014 Oct;26(10):2175-85

Maleski MP, Knudson CB. Hyaluronan-mediated aggregation of limb bud mesenchyme and mesenchymal condensation during chondrogenesis. *Exp Cell Res*. 1996 May 25;225(1):55-66

Merrill AH Jr. Sphingolipid and glycosphingolipid metabolic pathways in the era of sphingolipidomics. *Chem Rev*. 2011 Oct 12;111(10):6387-422

Meyer zu Heringdorf D, Liliom K, Schaefer M, Danneberg K, Jaggar JH, Tigyi G, Jakobs KH. Photolysis of intracellular caged sphingosine-1-phosphate causes Ca^{2+} mobilization independently of G-protein-coupled receptors. *FEBS Lett*. 2003 Nov 20;554(3):443-9

Meyers-Needham M, Lewis JA, Gencer S, Sentelle RD, Saddoughi SA, Clarke CJ, Hannun YA, Norell H, da Palma TM, Nishimura M, Kraveka JM, Khavandgar Z, Murshed M, Cevik MO, Ogretmen B. Off-target function of the sonic hedgehog inhibitor cyclopamine in mediating apoptosis *via* nitric oxide-dependant neutral sphingomyelinase 2/ceramide induction. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2012;11 (5):1092-1102

Michigami T. Regulatory mechanisms for the development of growth plate cartilage. *Cell Mol Life Sci*. 2013 Nov;70(22):4213-21

Milhas D, Clarke CJ, Hannun YA. Sphingomyelin metabolism at the plasma membrane: implications for bioactive sphingolipids. *FEBS Lett*. 2010 May 3;584(9):1887-94

Miletich I, Sharpe PT. Normal and abnormal dental development. *Hum Mol Genet*. 2003 Apr 1;12 Spec No 1:R69-73

Minina E, Wenzel HM, Kreschel C, Karp S, Gaffield W, McMahon AP, Vortkamp A. BMP and *Ihh*/PTHrP signaling interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation. *Development*. 2001 Nov;128(22):4523-34

Minina E, Schneider S, Rosowski M, Lauster R, Vortkamp A. Expression of *Fgf* and *Tgfbeta* signaling related genes during embryonic endochondral ossification. *Gene Expr Patterns*. 2005 Dec;6(1):102-9

Mitra P, Oskeritzian CA, Payne SG, Beaven MA, Milstien S, Spiegel S. Role of ABCC1 in export of sphingosine-1-phosphate from mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Oct 31;103(44):16394-9

Mizugishi K, Yamashita T, Olivera A, Miller GF, Spiegel S, Proia RL. Essential role for sphingosine kinases in neural and vascular development. *Mol Cell Biol*. 2005 Dec;25(24):11113-21

Mongkhon JM, Thach M, Shi Q, Fernandes JC, Fahmi H, Benderdour M. Sorbitol-modified hyaluronic acid reduces oxidative stress, apoptosis and mediators of inflammation and catabolism in human osteoarthritic chondrocytes. *Inflamm Res*. 2014 Aug;63(8):691-701

Muriel MP, Bonaventure J, Stanescu R, Maroteaux P, Guénet JL, Stanescu V. Morphological and biochemical studies of a mouse mutant (*fro/fro*) with bone fragility. *Bone*. 1991;12(4):241-8

Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*. 2002 Jan 11;108(1):17-29

Negre-Salvayre A, Lopez M, Levade T, Pieraggi MT, Dousset N, Douste-Blazy L, Salvayre R. Ultraviolet-treated lipoproteins as a model system for the study of the biological effects of lipid peroxides on cultured cells. II. Uptake and cytotoxicity of ultraviolet-treated LDL on lymphoid cell lines. *Biochim Biophys Acta*. 1990 Aug 6;1045(3):224-32

Nesbitt T, Fujiwara I, Thomas R, Xiao ZS, Quarles LD, Drezner MK. Coordinated maturational regulation of PHEX and renal phosphate transport inhibitory activity: evidence for the pathophysiological role of PHEX in X-linked hypophosphatemia. *J Bone Miner Res*. 1999 Dec;14(12):2027-35

Newrzella D, Stoffel W. Molecular cloning of the acid sphingomyelinase of the mouse and the organization and complete nucleotide sequence of the gene. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 1992 Dec;373(12):1233-8

Nyberg L, Duan RD, Axelson J, Nilsson A. Identification of an alkaline sphingomyelinase activity in human bile. *Biochim Biophys Acta*. 1996 Mar 29;1300(1):42-8

Oaks J1, Ogretmen B1. Regulation of PP2A by Sphingolipid Metabolism and Signaling. *Front Oncol*. 2015 Jan 15;4:388

Offiah AC, Mansour S, McDowall S, Tolmie J, Sim P, Hall CM. Surviving campomelic dysplasia has the radiological features of the previously reported ischio-pubic-patella syndrome. *J Med Genet*. 2002 Sep;39(9):e50

Olivera A, Kohama T, Edsall L, Nava V, Cuvillier O, Poulton S, Spiegel S. Sphingosine kinase expression increases intracellular sphingosine-1-phosphate and promotes cell growth and survival. *J Cell Biol*. 1999 Nov 1;147(3):545-58

Ornitz DM. FGF signaling in the developing endochondral skeleton. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005 Apr;16(2):205-13

Orimo H. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J Nippon Med Sch*. 2010 Feb;77(1):4-12

Orioli IM, Castilla EE, Barbosa-Neto JG. The birth prevalence rates for the skeletal dysplasias. *J Med Genet*. 1986. 23(4): p. 328-32

Opsahl S, Septier D, Aubin I, Guenet JL, Sreenath T, Kulkarni A, Vermelin L, Goldberg M. Is the lingual forming part of the incisor a structural entity? Evidences from the fragilitas ossium (*fro/fro*) mouse mutation and the TGFbeta1 overexpressing transgenic strain. *Arch Oral Biol*. 2005 Feb;50(2):279-86

Opsahl Vital S, Gaucher C, Bardet C, Rowe PS, George A, Linglart A, Chaussain C. Tooth dentin defects reflect genetic disorders affecting bone mineralization. *Bone*. 2012 Apr;50(4):989-97

Otterbach B, Stoffel W. Acid sphingomyelinase-deficient mice mimic the neurovisceral form of human lysosomal storage disease (Niemann-Pick disease). *Cell*. 1995 Jun 30;81(7):1053-61

Panda A, Gamanagatti S, Jana M, Gupta AK. Skeletal dysplasias: A radiographic approach and review of common non-lethal skeletal dysplasias. *World J Radiol*. 2014 Oct 28;6(10):808-25

Pattingre S, Bauvy C, Levade T, Levine B, Codogno P. Ceramide-induced autophagy : to junk or to protect cells ? *Autophagy*. 2009 ;5 (4) :558-560

Pauloin T, Dutot M, Warnet JM, Rat P. *In vitro* modulation of preventive toxicity : high molecular weight hyaluronan decreases apoptosis and oxidative stress induced by benzalkonium chloride. *European Journal of Pharmaceutical Science*. 2008 ;34 (4-5) : 263-273

Pavoine C, Pecker F. Sphingomyelinases: their regulation and roles in cardiovascular pathophysiology. *Cardiovasc Res*. 2009 May 1;82(2):175-83

Pitson SM, Moretti PA, Zebol JR, Lynn HE, Xia P, Vadas MA, Wattenberg BW. Activation of sphingosine kinase 1 by ERK1/2-mediated phosphorylation. *EMBO J*. 2003 Oct 15;22(20):5491-500

Pratap J, Galindo M, Zaidi SK, Vradii D, Bhat BM, Robinson JA, Choi JY, Komori T, Stein JL, Lian JB, Stein GS, van Wijnen AJ. Cell growth regulatory role of Runx2 during proliferative expansion of preosteoblasts. *Cancer Res*. 2003 Sep 1;63(17):5357-62

Pruett ST, Bushnev A, Hagedorn K, Adiga M, Haynes CA, Sullards MC, Liotta DC, merrill AH. Biodiversity of sphingoid bases (« sphingosines ») and related amino alcohols. *J Lipid Res*. 2008 ; 49 :1621-1639

Pucci B, Adams CS, Fertala J, Snyder BC, Mansfield KD, Tafani M, Freeman T, Shapiro IM. Development of the terminally differentiated state sensitizes epiphyseal chondrocytes to apoptosis through caspase-3 activation. *J Cell Physiol.* 2007 Mar;210(3):609-15

Qin J, Berdyshev E, Poirier C, Schwartz NB, Dawson G. Neutral sphingomyelinase 2 deficiency increases hyaluronan synthesis by up-regulation of hyaluronan synthase 2 through decreased ceramide production and activation of Akt. *Journal of Biological Chemistry.* 2012 ;287 (17) : 13620-13632

Quint P, Ruan M, Pederson L, Kassem M, Westendorf JJ, Khosla S, Oursler MJ. Sphingosine 1-phosphate (S1P) receptors 1 and 2 coordinately induce mesenchymal cell migration through S1P activation of complementary kinase pathways. *J Biol Chem.* 2013 Feb 22;288(8):5398-406

Rajpar MH, McDermott B, Kung L, Eardley R, Knowles L, Heeran M, Thornton DJ, Wilson R, Bateman JF, Poulson R, Arvan P, Kadler KE, Briggs MD, Boot-Handford RP. Targeted induction of endoplasmic reticulum stress induces cartilage pathology. *PLoS Genet.* 2009 Oct;5(10):e1000691

Rao BG, Spence MW. Sphingomyelinase activity at pH 7.4 in human brain and a comparison to activity at pH 5.0. *J Lipid Res.* 1976 Sep;17(5):506-15

Rasmussen SA, Bieber FR, Benacerraf BR, Lachman RS, Rimoin DL, Holmes LB. Epidemiology of osteochondrodysplasias: changing trends due to advances in prenatal diagnosis. *Am J Med Genet.* 1996 Jan 2;61(1):49-58

Recklies AD, White C, Melching L, Roughley PJ. Differential regulation and expression of hyaluronan synthases in human articular chondrocytes, synovial cells and osteosarcoma cells. *Biochem J.* 2001 Feb 15;354(Pt 1):17-24

Roach HI1, Aigner T, Kouri JB. Chondroptosis: a variant of apoptotic cell death in chondrocytes? *Apoptosis.* 2004 May;9(3):265-77

Roelofsen T, Akkers R, Beumer W, Apotheker M, Steeghs I, van de Ven J, Gelderblom C, Garritsen A, Dechering K. Sphingosine-1-phosphate acts as a developmental stage specific inhibitor of platelet-derived growth factor-induced chemotaxis of osteoblasts. *J Cell Biochem.* 2008 Nov 1;105(4):1128-38

Roberts S, Narisawa S, Harmey D, Millán JL, Farquharson C. Functional involvement of PHOSPHO1 in matrix vesicle-mediated skeletal mineralization. *J Bone Miner Res.* 2007 Apr;22(4):617-27

Rosen H, Goetzl EJ. Sphingosine 1-phosphate and its receptors: an autocrine and paracrine network. *Nat Rev Immunol.* 2005 Jul;5(7):560-70

Rotolo JA, Zhang J, Donepudi M, Lee H, Fuks Z, Kolesnick R. Caspase-dependent and -independent activation of acid sphingomyelinase signaling. *J Biol Chem.* 2005 Jul 15;280(28):26425-34

Saito T1, Fukai A, Mabuchi A, Ikeda T, Yano F, Ohba S, Nishida N, Akune T, Yoshimura N, Nakagawa T, Nakamura K, Tokunaga K, Chung UI, Kawaguchi H. Transcriptional regulation of endochondral ossification by HIF-2 α during skeletal growth and osteoarthritis development. *Nat Med.* 2010 Jun;16(6):678-86

Sano R, Reed JC. ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Dec;1833(12):3460-70

Sanson M, Ingueneau C, Vindis C, Thiers JC, Glock Y, Rousseau H, Sawa Y, Bando Y, Mallat Z, Salvayre R, Nègre-Salvayre A. Oxygen-regulated protein-150 prevents calcium homeostasis deregulation and apoptosis induced by oxidized LDL in vascular cells. *Cell Death Differ.* 2008 Aug;15(8):1255-65

Savariarayan R. Schmid Metaphyseal Chondrodysplasia. In: *The NORD Guide to Rare Disorders.* Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins; 2003:248

Savarirayan R, Robertson SP, Bankier A, Rogers JG. Variable expression of campomelic dysplasia in a father and his 46, XY daughter. *Pediatr Pathol Mol Med*. 2003 Jan Feb;22(1):37-46

Schissel SL, Schuchman EH, Williams KJ, Tabas I. Zn²⁺-stimulated sphingomyelinase is secreted by many cell types and is a product of the acid sphingomyelinase gene. *J Biol Chem*. 1996 Aug 2;271(31):18431-6

Schissel SL, Keesler GA, Schuchman EH, Williams KJ, Tabas I. The cellular trafficking and zinc dependence of secretory and lysosomal sphingomyelinase, two products of the acid sphingomyelinase gene. *J Biol Chem*. 1998 Jul 17;273(29):18250-9

Schmid F. Beitrag zur Dysostosis enchondralis metaphysarea. *Msschr. Kinderheilk*. 1949; 97: 393-397

Sedel F. Niemann-Pick diseases in adults. *Rev Med Interne*. 2007 Dec;28 Suppl 4:S292-3

Serra M, Saba JD. Sphingosine 1-phosphate lyase, a key regulator of sphingosine 1-phosphate signaling and function. *Adv Enzyme Regul*. 2010;50(1):349-62

Seshacharyulu P, Pandey P, Datta K, Batra SK. Phosphatase PP2A structural importance, regulation and its aberrant expression in cancer. *Cancer Lett*. 2013 Jul 10;335(1):9-18

Shapiro IM, Adams CS, Freeman T, Srinivas V. Fate of the hypertrophic chondrocyte : microenvironmental perspectives on apoptosis and survival in the epiphyseal growth plate. *Birth Defects Research Part C : Embryo Today*. 2005 ; 75 (4) :330-339

Shapiro IM, Layfield R, Lotz M, Settembre C, Whitehouse C. Boning up on autophagy: the role of autophagy in skeletal biology. *Autophagy*. 2014 Jan;10(1):7-19

Schipani E, Provot S. PTHrP, PTH, and the PTH/PTHrP receptor in endochondral bone development. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2003 Nov;69(4):352-62

Sillence DO, Ritchie HE, Dibbayawan T, Eteson D, Brown K. Fragilitas ossium (*fro/fro*) in the mouse: a model for a recessively inherited type of osteogenesis imperfecta. *Am J Med Genet*. 1993 Jan 15;45(2):276-83

Siow DL, Anderson CD, Berdyshev EV, Skobeleva A, Natarajan V, Pitson SM, Wattenberg BW. Sphingosine kinase localization in the control of sphingolipid metabolism. *Adv Enzyme Regul*. 2011;51(1):229-44

Siow D, Wattenberg B. The compartmentalization and translocation of the sphingosine kinases: mechanisms and functions in cell signaling and sphingolipid metabolism. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2011 Oct;46(5):365-75

Smith ER, Merrill AH, Obeid LM, Hannun YA. Effects of sphingosine and other sphingolipids on protein kinase C. *Methods Enzymol*. 2000;312:361-73

Smits P, Li P, Mandel J, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B, Lefebvre V. The transcription factors L-Sox5 and Sox6 are essential for cartilage formation. *Dev Cell*. 2001 Aug;1(2):277-90

Soukup V, Epperlein HH, Horacek I, Cerny R. Dual epithelial origin of vertebrate oral teeth. *Nature*. 2008 oct 9 ; 455(7214) :795-8

Spicer AP, McDonald JA. Characterization and molecular evolution of a vertebrate hyaluronan synthase gene family. *J Biol Chem*. 1998 Jan 23;273(4):1923-32

Spiegel S, Milstien S. Exogenous and intracellularly generated sphingosine1-phosphate can regulate cellular processes by divergent pathways. *Biochem Soc Trans.* 2003 Dec;31(Pt 6):1216-9

Spiegel S, Milstein S. Sphingosine-1-phosphate : an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Physiol.* 1998 ;60 :643-665

Stamos JL, Weis WI. The β -catenin destruction complex. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013 Jan 1;5(1):a007898

Stevenson DA. Analysis of skeletal dysplasias in the Utah population. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 2012. 158A(5): p. 1046-1054.

St-Jacques B, Hammerschmidt M, McMahon AP. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev.* 1999 Aug15;13(16):2072-86

Stöffel W, Jenke B, Blöck B, Zumbansen M, Koebke J. Neutral sphingomyelinase 2 (*smpd3*) in the control of postnatal growth and development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2005;102(12):4554-4559

Stöffel W, Jenke B, Holz B, Binczek E, Günter RH, Knifka J, Koebke J, Niehoff A. Neutral sphingomyelinase (SMPD3) deficiency causes a novel form of chondrodysplasia and dwarfism that is rescued by Col2A1-driven *smpd3* transgene expression. *Am J Pathol.* 2007 Jul; 171(1):153-61

Studer D1, Millan C, Öztürk E, Maniura-Weber K, Zenobi-Wong M. Molecular and biophysical mechanisms regulating hypertrophic differentiation in chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Eur Cell Mater.* 2012 Jul 24;24:118-35

Sun W, Xu R, Hu W, Jin J, Crellin HA, Bielawski J, Szulc ZM, Thiers BH, Obeid LM, Mao C. Upregulation of the human alkaline ceramidase 1 and acid ceramidase mediates calcium-induced differentiation of epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2008 Feb;128(2):389-97

Suomalainen L, Pentikäinen V, Dunkel L. Sphingosine-1-phosphate inhibits nuclear factor kappaB activation and germ cell apoptosis in the human testis independently of its receptors. *Am J Pathol.* 2005 Mar;166(3):773-81

Sutter NB, Bustamante CD, Chase K, Gray MM, Zhao K, Zhu L, Padhukasahasram B, Karlins E, Davis S, Jones PG, Quignon P, Johnson GS, Parker HG, Fretwell N, Mosher DS, Lawler DF, Satyaraj E, Nordborg M, Lark KG, Wayne RK, Ostrander EA. A single IGF1 allele is a major determinant of small size in dogs. *Science.* 2007 Apr 6;316(5821):112-5. Erratum in: *Science.* 2007 Jun 1;316(5829):1284

Tamamura Y, Otani T, Kanatani N, Koyama E, Kitagaki J, Komori T, Yamada Y, Costantini F, Wakisaka S, Pacifici M, Iwamoto M, Enomoto-Iwamoto M. Developmental regulation of Wnt/beta-catenin signals is required for growth plate assembly, cartilage integrity, and endochondral ossification. *J Biol Chem.* 2005 May 13;280(19):19185-95

Tan JX, Wang XY, Su XL, Li HY, Shi Y, Wang L, Ren GS. Upregulation of HYAL1 expression in breast cancer promoted tumor cell proliferation, migration, invasion and angiogenesis. *PLoS One.* 2011;6(7):e22836

Tanne Y, Tanimoto K, Tanaka N, Ueki M, Lin YY, Ohkuma S, Kamiya T, Tanaka E, Tanne K. Expression and activity of Runx2 mediated by hyaluronan during chondrocyte differentiation. *Arch Oral Biol.* 2008 May;53(5):478-87

Tani M, Hannun YA. Analysis of membrane topology of neutral sphingomyelinase 2. *FEBS Lett.* 2007 Apr 3;581(7):1323-8

- Takeda H, Ozaki K, Yasuda H, Ishida M, Kitano S, Hanazawa S. Sphingomyelinase and ceramide inhibit formation of F-actin ring in and bone resorption by rabbit mature osteoclasts. *FEBS Lett.* 1998 Jan 30;422(2):255-8
- Tellier E, Nègre-Salvayre A, Bocquet B, Itohara S, Hannun YA, Salvayre R, Augé N. Role for furin in tumor necrosis factor alpha-induced activation of the matrix metalloproteinase/sphingolipid mitogenic pathway. *Mol Cell Biol.* 2007Apr;27(8):2997-3007
- Tepper AD, Ruurs P, Borst J, van Blitterswijk WJ. Effect of overexpression of a neutral sphingomyelinase on CD95-induced ceramide production and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Jan 26;280(3):634-9
- Temiz A, Kazikdas KC, Ergur B, Tugyan K, Bozok S, Kaya D, Guneli E. Esterified hyaluronic acid improves cartilage viability in experimental tracheal reconstruction with an auricular graft. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2010 Dec;143(6):772-8
- Thesleff I. The genetic basis of tooth development and dental defects. *Am J Med Genet A.* 2006 Dec 1;140(23):2530-5
- Tian Q, Wang J. Role of serine/threonine protein phosphatase in Alzheimer's disease. *Neurosignals.* 2002;11:262-269
- Timothy F, Yingzi Y. Wnt and hedgehog signaling pathways in bone development. *J Bone Joint Surg Am.* 2008 Feb ; 90 (supplement 1) :19-24
- Toledo C, Navarro-Barros R, Alba L, Muñoz E. Kyphomelic dysplasia: a report of a family with an autosomal dominant pattern. *Ann Genet.* 1999; 42(3):170-3
- Tu BP, Weissman JS. Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences. *J Cell Biol.* 2004 Feb 2;164(3):341-6
- Tucker A, Sharpe P. The cutting-edge of mammalian development; how the embryo makes teeth. *Nat Rev Genet.* 2004 Jul;5(7):499-508
- Van den Heuvel M, Ingham PW. Smoothed encodes a receptor-like serpentine protein required for hedgehog signalling. *Nature.* 1996 Aug 8;382(6591):547-51
- Van der Eerden BC, Karperien M, Wit JM. Systemic and local regulation of the growth plate. *Endocr Rev.* 2003 Dec;24(6):782-801
- Vanier MT. Niemann-Pick diseases. *Handb Clin Neurol.* 2013;113:1717-21
- Van Vlasselaer P, Falla N, Snoeck H, Mathieu E. Characterization and purification of osteogenic cells from murine bone marrow by two-color cell sorting using anti-Sca-1 monoclonal antibody and wheat germ agglutinin. *Blood.* 1994 ; 84, 753-763
- Vortkamp A, Lee K, Lanske B, Segre GV, Kronenberg HM, Tabin CJ. Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science.* 1996 ; 273 (5275): 613-22
- Wagner T, Wirth J, Meyer J, Zabel B, Held M, Zimmer J, Pasantes J, Bricarelli FD, Keutel J, Hustert E, Wolf U, Tommerup N, Schempp W, Scherer G. Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell.* 1994 Dec 16;79(6):1111-20
- Wakiya K, Shibuya M. Okadaic acid stimulates the expression of vascular endothelial growth factor gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 Nov 19;265(2):584-8
- Waller KA, Zhang LX, Fleming BC, Jay GD. Preventing friction-induced chondrocyte apoptosis: comparison of human synovial fluid and hylan G-F 20. *J Rheumatol.* 2012 Jul;39(7):1473-80

Wang G, Silva J, Krishnamurthy K, Tran E, Condie BG, Bieberich E. Direct binding to ceramide activates protein kinase C ζ before the formation of a pro-apoptotic complex with PAR-4 in differentiating stem cells. *J Biol Chem*. 2005 Jul 15;280(28):26415-24

Wang RC, Wei Y, An Z, Zou Z, Xiao G, Bhagat G, White M, Reichelt J, Levine B. Akt-mediated regulation of autophagy and tumorigenesis through Beclin 1 phosphorylation. *Science*. 2012 Nov 16;338(6109):956-9

Wang Y, Lauer ME, Anand S, Mack JA, Maytin EV. Hyaluronan synthase 2 protects skin fibroblasts against apoptosis induced by environmental stress. *Journal of Biological Chemistry*. 2014 ;289 (46) :32253-32265

Warman ML, Cormier-Daire V, Hall C, Krakow D, Lachman R, LeMerrer M, Mortier G, Mundlos S, Nishimura G, Rimoin DL, Robertson S, Savarirayan R, Sillence D, Spranger J, Unger S, Zabel B, Superti-Furga A. Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2010 revision. *Am J Med Genet A*. 2011 May;155A(5):943-68

Wattenberg BW, Pitson SM, Raben DM. The sphingosine and diacylglycerol kinase superfamily of signaling kinases: localization as a key to signaling function. *J Lipid Res*. 2006 Jun;47(6):1128-39

Whyte MP. Hypophosphatasia and the role of alkaline phosphatase in skeletal mineralization. *Endocr Rev*. 1994 Aug;15(4):439-61

Wu LN, Genge BR, Kang MW, Arsenault AL, Wuthier RE. Changes in phospholipid extractability and composition accompany mineralization of chicken growth plate cartilage matrix vesicles. *J Biol Chem*. 2002 Feb 15;277(7):5126-33

Wu BX, Rajagopalan V, Roddy PL, Clarke CJ, Hannun YA. Identification and characterization of murine mitochondria-associated neutral sphingomyelinase(MA-nSMase), the mammalian sphingomyelin phosphodiesterase 5. *J Biol Chem*. 2010 Jun 4;285(23):17993-8002

Wu BX, Clarke CJ, Hannun YA. Mammalian neutral sphingomyelinases: regulation and roles in cell signaling responses. *Neuromolecular Med*. 2010 Dec;12(4):320-30

Wuelling M, Vortkamp A. Transcriptional networks controlling chondrocyte proliferation and differentiation during endochondral ossification. *Pediatr Nephrol*. 2010 Apr;25(4):625-31

Xu H, Ito T, Tawada A, Maeda H, Yamanokuchi H, Isahara K, Yoshida K, Uchiyama Y, Asari A. Effect of hyaluronan oligosaccharides on the expression of heat shock protein 72. *Journal of Biochemical*. 2002 ; 277 (19) :17308-17314

Xu Y, Xing Y, Chen Y, Chao Y, Lin Z, Fan E, Yu JW, Strack S, Jeffrey PD, Shi Y. Structure of the protein phosphatase 2A holoenzyme. *Cell*. 2006 dec; 127 (6): 1239–51

Yang Y, Topol L, Lee H, Wu J. Wnt5a and Wnt5b exhibit distinct activities in coordinating chondrocyte proliferation and differentiation. *Development*. 2003 Mar;130(5):1003-15

Yang J, Andre P, Ye L, Yang YZ. The Hedgehog signalling pathway in bone formation. *Int J Oral Sci*. 2015 May 29. doi: 10.1038/ijos.2015.14

Ye J, Wu H, Wu Y, Wang C, Zhang H, Shi X, Yang J. High molecular weight hyaluronan decreases oxidative DNA damage induced by EDTA in human corneal epithelial cells. *Eye (London)* 26 (7) (2012) 1012-1020

Yoon BS, Pogue R, Ovchinnikov DA, Yoshii I, Mishina Y, Behringer RR, Lyons KM. BMPs regulate multiple aspects of growth-plate chondrogenesis through opposing actions on FGF pathways. *Development*. 2006 Dec;133(23):4667-78

Yoshida M, Itano N, Yamada Y, Kimata K. *In vitro* synthesis of hyaluronan by a single protein derived from mouse HAS1 gene and characterization of amino acid residues essential for the activity. J Biol Chem. 2000 Jan 7;275(1):497-506

Yoshida CA, Yamamoto H, Fujita T, Furuichi T, Ito K, Inoue K, Yamana K, Zanma A, Takada K, Ito Y, Komori T. Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog. Genes Dev. 2004 Apr 15;18(8):952-63

Zákány R, Szucs K, Bakó E, Felszeghy S, Czifra G, Bíró T, Módis L, Gergely P. Protein phosphatase 2A is involved in the regulation of protein kinase A signaling pathway during *in vitro* chondrogenesis. Exp Cell Res. 2002 Apr 15;275(1):1-8

Zeller R. The temporal dynamics of vertebrate limb development, teratogenesis and evolution. Curr Opin Genet Dev. 2010 Aug;20(4):384-90

Zeller R, López-Ríos J, Zuniga A. Vertebrate limb bud development: moving towards integrative analysis of organogenesis. Nat Rev Genet. 2009 Dec;10(12):845-58

Zheng Q1, Zhou G, Morello R, Chen Y, Garcia-Rojas X, Lee B. Type X collagen gene regulation by Runx2 contributes directly to its hypertrophic chondrocyte-specific expression *in vivo*. J Cell Biol. 2003 Sep 1;162(5):833-42

Zhou H, Summers SA, Birnbaum MJ, Pittman RN. Inhibition of Akt kinase by cell-permeable ceramide and its implications for ceramide-induced apoptosis. J Biol Chem. 1998 Jun 26;273(26):16568-75

Zhu J, Nakamura E, Nguyen MT, Bao X, Akiyama H, Mackem S. Uncoupling Sonic hedgehog control of pattern and expansion of the developing limb bud. Dev Cell. 2008 Apr;14(4):624-32

Zolnierowicz S. Type 2A protein phosphatase, the complex regulator of numerous signaling pathways. Biochem Pharmacol. 2000 Oct 15;60(8):1225-35

Zumbansen M, Stoffel W. Neutral sphingomyelinase 1 deficiency in the mouse causes no lipid storage disease. Mol Cell Biol. 2002 Jun;22(11):3633-8

RESUME

Le phénotype *Fragilitas ossium* ("fro") chez la souris est caractérisé par un nanisme, une mortalité néonatale élevée, une malformation néonatale des os longs, et une hypominéralisation de type *Osteogenesis Imperfecta*. Ce phénotype est associé à une mutation du gène *smpd3* qui code pour la sphingomyélinase neutre de type 2 (nSMase2) qui dégrade la sphingomyéline et génère du céramide impliqué dans l'apoptose, la différenciation cellulaire, l'inflammation et l'autophagie. Le rôle des sphingolipides dans le développement osseux est peu connu. Le phénotype de la souris *fro/fro* suggère un rôle pour les sphingolipides dans le développement osseux dans la période fœtale et néonatale.

L'objectif de cette thèse a été d'étudier les mécanismes par lesquels la voie des sphingolipides (nSMase2 et céramide) intervient dans l'ostéochondrogenèse. Dans un premier temps, nous avons étudié les mécanismes impliqués dans l'apoptose des chondrocytes hypertrophiques (CH) nécessaire à la maturation de l'os endochondral et déficiente chez la souris *fro/fro*. Dans un second temps, nous avons caractérisé le fait que la mutation de la nSMase2 induit une chondrodysplasie de type campomélisque chez les souris *fro/fro*.

Dans la première partie de ce travail, nous montrons que la mutation de la nSMase2 ne protège pas les fibroblastes contre l'apoptose induite par les agents de stress, mais les protège de l'apoptose induite par la privation en nutriments. Cette résistance fait intervenir une surexpression de la hyaluronan synthase 2 (HAS2) et l'acide hyaluronique qui a un effet antiapoptotique. L'absence d'activation de la phosphatase PP2A (qui est activée par le céramide) et l'activation consécutive d'Akt seraient impliquées dans la surexpression de HAS2 et la résistance à l'apoptose dans un milieu pauvre en nutriments.

Dans la deuxième partie, nous avons étudié le rôle de la nSMase2 dans la maturation des CH au cours de l'ossification endochondrale, qui est retardée chez la souris *fro/fro*. Nos résultats montrent que le déficit de maturation des CH s'accompagne d'un déficit d'expression du VEGF et de MMP13, de même qu'un défaut d'apoptose, de vascularisation et de minéralisation. De plus, on note un déficit d'autophagie qui permet aux CH d'atteindre normalement leur stade de différenciation terminale. L'addition de C2-céramide à des cellules souches issues de souris *fro/fro* restaure partiellement l'expression du VEGF et des marqueurs d'autophagie, alors que l'utilisation d'un inhibiteur de sphingomyélinase neutre, le GW4869, induit une diminution d'expression du VEGF et de MMP13. Le mécanisme impliquerait l'activation d'Akt et la surexpression d'HAS2.

Dans la troisième partie de ce travail, nous montrons que le déficit en nSMase2 induit une déformation de type campomélisque dans les tibias des souris *fro/fro*, avec une diminution de l'expression de Col2A1 et d'Acan ainsi qu'un défaut d'expression de la protéine sox9 dans les pattes des souris *fro/fro* nouveau-nés, chez l'embryon âgé de 12 à 17 jours, et dans les chondrocytes en culture issus de souris *fro/fro*. L'addition de GW4869 à des cellules souches normales ou à des préchondrocytes de la lignée ATDC5, reproduit le déficit en Col2A1 et Acan lors de leur différenciation. L'ensemble de ces résultats confirme que la mutation de la nSMase2 génère une chondrodystrophie de type campomélisque chez la souris *fro/fro*.

Ces résultats mettent l'accent sur le rôle essentiel des sphingolipides dans le développement de l'os enchondral. Sur un plan médical, ce travail a permis de caractériser une nouvelle forme de chondrodysplasie par mutation de nSMase2, qui pourra être recherchée dans une perspective de diagnostic chez l'humain avec à moyen terme, le développement de nouveaux axes thérapeutiques pour le traitement de pathologies osseuses néonatales.