



Etude du rôle du récepteur LPA1 dans l'ostéogénèse au cours de la croissance du squelette : implication dans l'acquisition de masse osseuse

Adebayo Candide Alioli

► To cite this version:

Adebayo Candide Alioli. Etude du rôle du récepteur LPA1 dans l'ostéogénèse au cours de la croissance du squelette : implication dans l'acquisition de masse osseuse. Physiologie [q-bio.TO]. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2020. Français. NNT : 2020TOU30254 . tel-03231864

HAL Id: tel-03231864

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-03231864>

Submitted on 21 May 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE

En vue de l'obtention du DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par
Adebayo Candide ALIOLI

Le 4 décembre 2020

**Etude du rôle du récepteur LPA1 dans l'ostéogénèse au cours
de la croissance du squelette: implication dans l'acquisition de
masse osseuse**

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **PHYSIOPATHOLOGIE**

Unité de recherche :

CPTP - Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan

Thèse dirigée par

Jean-Pierre SALLES et Isabelle GENNERO

Jury

Mme Agnès LINGLART, Rapporteuse

Mme Martine COHEN-SOLAL, Rapporteuse

Mme Elvire GOUZE, Examinatrice

M. Bernard PAYRASTRE, Examineur

M. Jean-Pierre SALLES, Directeur de thèse

Mme Isabelle GENNERO, Co-directrice de thèse

REMERCIEMENTS

Madame la professeure **Martine Cohen-Solal**

J'ai été honoré de votre participation à l'évaluation de ce travail en tant que rapporteur. Veuillez accepter mes sincères remerciements pour votre disponibilité, et pour la richesse de la discussion que nous avons pu avoir sur l'intérêt de l'ensemble de mes travaux dans le champ du métabolisme phosphocalcique.

Madame la professeure **Agnès Linglart**

Veuillez accepter mes sincères remerciements pour avoir accepté de juger ce travail. En tant qu'experte des pathologies rares de l'os, du calcium et du cartilage, j'ai été très honoré de votre intérêt pour mon sujet de thèse, et j'ai particulièrement apprécié votre analyse sur les hypothèses dont nous avons discutées.

Madame la Docteur **Elvire Gouze**

J'ai particulièrement apprécié votre vision de la recherche de par votre analyse qui permet une ouverture de mes travaux sur de potentielles pistes de recherche transrationnelle. Soyez assurée de toute ma reconnaissance et de mon profond respect.

Monsieur le Professeur **Bernard Payraastre**

Vous étiez déjà là en tant que membre de mon comité de thèse, pour me conseiller et pour veiller au bon déroulement de ma thèse. Je vous suis chaleureusement reconnaissant non seulement pour avoir aussi accepté de participer à mon jury de thèse, mais aussi pour votre enthousiasme, votre esprit critique et votre disponibilité pour toutes les fois où j'ai pu vous solliciter pendant mon cursus.

Monsieur le Professeur **Jean-Pierre salles**

Vous m'avez non seulement accueilli dans votre équipe dans les meilleures conditions, mais vous avez aussi participé à la direction de ma thèse. Veuillez trouver ici l'expression de mes vifs remerciements pour la confiance accordée, pour votre excellent recul scientifique et pour votre sens des priorités qui ont en partie permis l'aboutissement de mon travail.

Madame la Docteur **Isabelle Gennero**

Quelques lignes ne suffiront absolument pas à retranscrire toute ma gratitude à ton égard pour m'avoir encadré et accompagné pendant toute ma thèse, partageant des moments de doute, d'incertitude mais surtout la joie et l'enthousiasme face à nos

REMERCIEMENTS

hypothèses et résultats. Un grand MERCI pour la confiance accordée durant ces trois années, dont j'espère l'aboutissement en avoir été à la hauteur.

Je tiens à remercier chaleureusement toute l'équipe Jean-Pierre Salles pour la bonne ambiance et la bienveillance de tous, et plus particulièrement **Nicolas Beton**, **Sara Laurencin-Dalieux** et **Saber Amri** pour l'aide précieuse que vous avez pu m'apporter à la paillasse au cours de mes travaux. Je tiens également à remercier tous les membres du CPTP que j'ai pu côtoyer et avec qui j'ai pu collaborer durant ces années.

J'adresse mes sincères remerciements aux Docteurs **Olivier Peyruchaud** et **Irma Machuca-Gayet** de l'unité Inserm 1033, ainsi qu'à tout leur groupe pour avoir participé à mon travail. Un grand Merci à vous pour vos apports et la qualité des discussions scientifiques que nous avons pu avoir. Je remercie également le Docteur **Daniel Bouvard** pour son implication dans ce projet.

Pour finir, je remercie ma compagne, mes parents et amis pour leur soutien indéfectible.

TABLE DES MATIERES

RESUME	5
ABSTRACT.....	6
LISTE des ABREVIATIONS.....	7
LISTE des TABLEAUX.....	9
LISTE des FIGURES.....	10
INTRODUCTION GENERALE.....	12
 CHAPITRE I : REVUE DE LITTERATURE SUR LE DEVELOPPEMENT OSSEUX et l'OSTEOGENESE	 15
1. Le développement osseux et l'ostéogenèse	16
1.1 Morphologie du tissu osseux	18
1.2 Structure et Composition de l'os.....	20
1.2.1 La matrice extracellulaire	20
1.2.2 Les cellules osseuses	20
1.3 Les mécanismes cellulaires de l'ostéogenèse	39
1.3.1 L'ossification membranaire.....	40
1.3.2 L'ossification endochondrale	40
1.3.3 Le modelage osseux	43
1.3.4 Le remodelage osseux.....	44
1.3.5 L'Acquisition du pic de masse osseuse	46
1.4 Les facteurs influençant l'ostéogenèse et la masse osseuse.....	48
1.4.1 La Voie Wnt Bêta-caténine.....	48
1.4.2 Les protéines morphogénétiques osseuses (BMPs).....	51
1.4.3 Les facteurs de croissance des fibroblastes (FGFs).....	52
2. Régulation endocrine et paracrine de l'ostéogenèse par les Récepteurs couplés aux protéines G: importance des voies Gi et Gs	 56
2.1. Importance de la PTH et de la signalisation PTH/PTHR1/AMPC.....	58
2.2. Rôle de la sérotonine	62
2.3. Rôle de la ghréline	63
2.4. Rôle de la mélatonine.....	65

TABLE DES MATIERES

CHAPITRE II: REVUE DE LITTERATURE SUR L'ACIDE LYSOPHOSPHATIDIQUE, UN MEDIATEUR POTENTIEL DANS LE CONTROLE DE L'OSTEOGENESE	69
1. L'Acide lysophosphatidique : médiateur potentiel dans le contrôle de l'ostéogenèse.....	70
1.1 Structure et Origine du LPA.....	70
1.2 Localisation du LPA.....	71
1.3 Métabolisme du LPA	71
1.4 Les récepteurs du LPA.....	73
1.5 Rôles Physiologiques du LPA	82
2. Rôle du LPA en physiopathologie osseuse.....	84
2.1 LPA et plaque de croissance	84
2.2 LPA et résorption osseuse	85
2.3 Le LPA dans les métastases osseuses et la résorption osseuse associée.....	86
2.4 LPA et ostéoblastogenèse.....	87
2.5 LPA et ostéocytogenèse	89
CHAPITRE III: RESULTATS EXPERIMENTAUX	92
DISCUSSION et PERSPECTIVES.....	96

RESUME

L'os est un organe dynamique qui se renouvelle constamment grâce à une activité coordonnée des ostéoblastes et des ostéocytes qui forment la matrice osseuse nouvelle, et des ostéoclastes qui la dégradent. De la naissance à la fin de l'adolescence, le squelette subit une croissance rapide, médiée par une activité de formation osseuse intense, encore appelée modelage osseux. Cette acquisition de masse osseuse est finement régulée grâce à l'action de nombreux facteurs systémiques et locaux. L'acide lysophosphatidique (LPA) est un médiateur lipidique naturel dont les fonctions biologiques affectent de nombreux organes et de nombreux types cellulaires, y compris les cellules osseuses, ostéoblastes, ostéocytes et ostéoclastes. L'action du LPA sur le tissu osseux a été mise en évidence pour la première fois dans notre laboratoire, dans un modèle murin dans lequel l'expression de son récepteur LPA1 a été désactivée de façon globale (*Lpar1*^{-/-}). Ces animaux présentent un défaut de croissance ainsi que des anomalies osseuses sévères. Cependant, en raison de l'expression ubiquitaire du récepteur LPA1, ce modèle ne permet pas de déterminer l'effet spécifique du LPA dans les cellules ostéoblastiques dont l'action est majoritaire au cours de la croissance.

L'objectif de mon travail de thèse a été d'étudier le rôle spécifique du LPA et de son récepteur LPA1 dans la lignée ostéoblastique, afin de déterminer son importance pendant le modelage de l'os. Pour ce faire, j'ai étudié des souris *Lpar1*^{-ΔOb}, générées au laboratoire, et dont l'expression du récepteur LPA1 a été spécifiquement supprimée dans la lignée ostéoblastique. Ces souris ont présenté une baisse de la minéralisation osseuse et une réduction de l'épaisseur de l'os corticale, ainsi qu'une augmentation de la porosité osseuse. *In vitro*, les ostéoblastes primaires *Lpar1*^{-ΔOb} et cl1-Ob-*Lpar1*^{-/-} immortalisés ont révélé une prolifération cellulaire réduite, une altération de la différenciation et une activité de minéralisation réduite. De plus, j'ai mis en évidence chez les souris *Lpar1*^{-ΔOb} une nette altération de la fonction des ostéocytes. Enfin, j'ai pu montrer *in vitro*, à la fois dans les ostéoblastes primaires *Lpar1*^{-ΔOb} et immortalisés cl1-Ob-*Lpar1*^{-/-}, que l'absence du récepteur LPA1 induit une altération importante de la formation des dendrites, processus précoce et déterminant dans leur différenciation en ostéocyte (ostéocytogenèse).

Ces résultats suggèrent un nouveau rôle pour le LPA dans le contrôle de la masse osseuse via la minéralisation osseuse et la fonction des ostéocytes. Ils représentent une piste intéressante à explorer en physiopathologies pour résoudre des problématiques de minéralisation. Ils pourraient également ouvrir des perspectives dans l'exploration de certaines anomalies d'acquisition de masse osseuse comme la scoliose idiopathique de l'adolescent, qui est une pathologie rare dans laquelle des défauts de fonction ostéocytaire similaires à ceux des souris *Lpar1*^{-ΔOb} ont été rapportés.

ABSTRACT

Bone is a complex and dynamic organ that is constantly renewing by the coordinated activity of osteoblasts and osteocytes which form the new bone matrix, and osteoclasts responsible for bone resorption. During normal childhood and adolescence, the skeleton undergoes rapid growth, mediated by intense bone-forming activity, also called bone modeling. This acquisition of bone mass requires the proper interaction of numerous systemic and local factors. Lysophosphatidic acid (LPA) is a natural lipid mediator whose biological functions affect multiple organs and multiple cell types, including bone cells. The action of LPA on bone tissue was demonstrated for the first time in our laboratory, in a global *Lpar1*-knockout mice. These animals present a growth defect as well as severe bone abnormalities. However, due to the large expression of LPA1 in the cells, including bone cells, the *Lpar1*^{-/-} mice are not suitable to understand the specific effect of LPA in osteoblastic cells, that have the predominant action during growth.

The objective of my thesis work was to study the specific role of LPA and its receptor LPA1 in the osteoblastic lineage, in order to determine its importance during bone modeling. Thus, I studied the osteoblast-specific *Lpar1* knockout mice (*Lpar1*-ΔOb) that we generated in the laboratory. These mice revealed reduced bone mineralization and decreased cortical thickness, as well as increased bone cortical porosity. *In vitro*, primary *Lpar1*-ΔOb and immortalized cl1-Ob-*Lpar1*^{-/-} osteoblasts revealed a reduced cell proliferation associated with alterations in differentiation markers, and reduced mineralization activity. Furthermore, I highlighted in *Lpar1*-ΔOb mice a markedly impaired osteocyte specification. Finally, I was able to show *in vitro*, both in primary *Lpar1*-ΔOb and immortalized cl1-Ob-*Lpar1*^{-/-} osteoblasts that the absence of LPA1 receptor leads to a significant alteration in the dendrites formation, an early and decisive process in their differentiation into osteocytes (Osteocytogenesis).

These results suggest a new role for LPA in the control of bone mass via bone mineralization and osteocyte function. They will certainly be helpful in pathophysiology to solve mineralization problems. They could also open perspectives in the exploration of certain abnormalities in bone mass acquisition such as adolescent's idiopathic scoliosis, which is a rare pathology in which defects in osteocyte function similar to those in *Lpar1*-ΔOb mice have been reported.

LISTE DES ABREVIATIONS

AMPc: AMP cyclique
ATX: autotaxine
BMP : *Bone Morphogenetic Protein*
BMPR: *Bone Morphogenetic Receptor*
mBMSC: *murine Bone Marrow Stromal Cells*
BSP: *Bone Sialoprotein*
Coll: collagène de type I
CRE: *cyclic AMP response element*
DMEM : *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
FGF: *Fibroblast Growth Factor*
FGFR: *Fibroblast Growth Factor Receptor*
GMPc: GMP cyclique
GPCR: *G Coupled receptor Protein*
IGF1: *Insulin-like Growth Factor1*
IL: Interleukine
IP: Inositol-phosphate
LPA: Lysophosphatidic Acid
LPA1: Lysophosphatidic Acid receptor 1
LPA2: *Lysophosphatidic Acid receptor 2*
LPA3 : *Lysophosphatidic Acid receptor 3*
LPA4 : *Lysophosphatidic Acid receptor 4*
LPA5 : *Lysophosphatidic Acid receptor 5*
LPA6 : *Lysophosphatidic Acid receptor 6*
LPC: Lysophosphatidyl Choline
Lrp5: *lipoprotein related peptide 5*
MAPK: *Mitogen Activated Protein Kinase*
M-CSF: *Macrophage-Colony Stimulating Factor*
OM: *Osteogenic Medium*
OPG: Ostéoprotégérine
OPN: Ostéopontine
Osx: Ostérix
PA: *Phosphatidic acid*
PG: Prostaglandine
PI3K: Phosphatidyl Inositol 3 Kinase

LISTE DES ABREVIATIONS

PKA: Protéine Kinase A

PLA: Phospholipase A

sPLA: Phospholipase A sécrétoire

PLC: Phospholipase C

PLC: Phospholipase C

PLD: Phospholipase D

PTH: Parathyroid Hormone

PTHrP: *Parathyroid Hormone-related Peptide*

PTHR1: *Parathyroid Hormone-related Peptide receptor 1*

RANK: *Receptor Activator of Nuclear Factor κ B*

RANK-L: *Receptor Activator of Nuclear Factor κ B- Ligand*

RCPG: Récepteur Couplé aux Protéines G

ROCK: *Rho associated kinase*

RT-PCR: *Reverse Transcriptase–Polymerase Chain Reaction*

Runx2: *Runt-related transcription factor 2*

Shh: *Sonic hedgehog*

Smad: apparentés aux protéines SMA (*small body size*) et MAD (*mother against dpp*)

Sox9: *SRY (sex determining region Y)-box 9*

TGF β : *Transforming growth factors β*

TRAP: *Tartrate Resistant Acide Phosphatase*

Wnt: *Wg (wingless,) et Int (integration site)*

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Rôles physiologiques du LPA

Tableau 2: Implications des récepteurs du LPA en pathologies humaines

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Classification des os selon leur forme, adaptée de Anatomie et Physiologie humaine, chapitre 6, 5^{ème} édition.

Figure 2 : Schéma montrant une vue d'ensemble des différentes fonctions du squelette humain

Figure 3 : Structure d'un os long (Humérus)

Figure 4 : Schéma représentatif de la morphologie des différents types de cellules osseuses.

Figure 5: représentation de la différenciation ostéoclastique jusqu'à l'obtention d'un ostéoclaste mature capable de résorber la matrice osseuse.

Figure 6 : Schéma montrant les lignages cellulaires possibles à partir de la différenciation des CMSs de la moelle osseuse.

Figure 7 : Schéma représentatif des étapes de la différenciation des ostéoblastes.

Figure 8 : Schéma montrant le devenir des cellules ostéoblastiques au terme de leur différenciation

Figure 9 : Morphologie des ostéocytes in vitro et in vivo.

Figure 10 : Signature moléculaire des ostéocytes.

Figure 11 : Effets de la sclérostine dans le microenvironnement osseux.

Figure 12 : Le FGF23 d'origine osseuse régule le métabolisme du phosphate.

Figure 13 : Ossification endochondrale dans un os long.

Figure 14 : Structure de la plaque de croissance.

Figure 15 : Représentation schématique des quatre étapes du processus de remodelage osseux

Figure 16 : Acquisition multifactorielle du pic de masse osseuse.

Figure 17 : Activation et inactivation de la voie canonique Wnt/ β -caténine dans l'ostéoblaste.

Figure 18 : Schéma montrant les effets de la signalisation Wnt/ β -caténine sur les l'ostéoblastogenèse et l'ostéoclastogenèse

Figure 19 : Signaux extracellulaires régulant la différenciation des ostéoblastes

Figure 20. Signalisation intracellulaire suivant l'activation du récepteur PTH1R.

Figure 21. Structure du LPA

Figure 22 : Les voies enzymatiques de synthèse et de dégradation de l'acide lysophosphatidique

Figure 23 : Les voies de signalisation du LPA et les effets cellulaires physiologiques et pathologiques associés.

Figure 24 : Augmentation de la formation des dendrites dans les cellules ostéocytaires MLOY-4 sous l'effet du LPA.

LISTE DES FIGURES

Figure 25 : Résultats complémentaires sur le phénotype osseux des souris *Lpar1* Δ Ob

Figure 26 : Altérations du réseau d'ostéocytes chez les souris invalidées pour l'autophagie dans les cellules de la lignée des ostéoblastes

Figure 27 : Altérations de l'os cortical et du réseau d'ostéocytes chez les souris Hyp, déficientes pour le gène Phex

Figure 28 : Aperçu des voies de signalisation du LPA dans les ostéoblastes

Figure 29 : Exploration de l'activité Gi/AMPC/ERK en absence du récepteur LPA1 dans les ostéoblastes in vitro

Figure 30 : Expression relative par RT-qPCR des récepteurs LPA2, 3, et 4 au cours de la différenciation ostéoblastique in vitro

Figure 31 : Exploration de l'implication des récepteurs au LPA associés au couplage Gi au cours de l'ostéocytogenèse in vitro

Figure 32 : Structures d'un analogue monofluoré du LPA

Figure 33 : L'analogue du LPA permet une régénération osseuse chez la souris ostéotomisée contrairement au LPA

Figure 34 : Altérations ostéocytaires chez les patients AIS

INTRODUCTION GENERALE

L'équipe du Pr Jean-Pierre Salles, au sein de laquelle j'ai effectué ma thèse, étudie les mécanismes moléculaires impliqués dans la croissance et l'ostéogenèse. Elle a entre autres développé des modèles d'étude ayant contribué à une meilleure compréhension de la physiopathologie du syndrome de Noonan, notamment concernant l'activation de la voie Ras/MAPK, la production de l'IGF1 ou encore la présence de mutations impactant la croissance osseuse. Certains travaux y sont menés sur la sensibilité aux facteurs de croissance, dont l'hormone de croissance, l'IGF1, l'ocytocine et la ghréline dans le syndrome de Prader-Willi et la scoliose idiopathique de l'adolescent (AIS). D'autres études ont conduit à l'identification de l'acide lysophosphatidique (LPA) comme étant un régulateur paracrine impliqué dans la différenciation des ostéoblastes, et potentiellement impliqué de façon plus fondamentale dans le développement osseux.

Le LPA est un facteur de croissance régulant de nombreux processus physiologiques. Son activité passe par des récepteurs de la famille des RCPGs, parmi lesquels le récepteur LPA1 a particulièrement montré des effets intéressants dans plusieurs types cellulaires. Dans le tissu osseux, le rôle du LPA est resté très peu étudié jusque dans les années 2000. Des travaux ont cependant pu montrer qu'il était impliqué à la fois dans la différenciation des cellules ostéoblastiques, et dans l'ostéoclastogenèse. Dans un modèle avec invalidation globale du récepteur LPA1, l'équipe du Pr Jean-Pierre Salles a révélé en 2011, la présence d'anomalies osseuses ainsi qu'une ostéoporose et une activité altérée de la plaque de croissance chez des souris à 4 semaines de vie. Cette étude a corroboré la plupart des données *in vitro*, et posé pour la première fois dans un contexte *in vivo*, les bases de la biologie du LPA dans la croissance et l'acquisition de masse osseuse. Depuis, la connaissance du tissu osseux a évolué. De nouveaux mécanismes cellulaires ont été trouvés, et ce dans des modèles de plus en plus fidèles et représentatifs du tissu. Pour étudier le rôle du LPA1 pendant la formation osseuse, l'équipe a initié un nouveau projet visant à poursuivre l'exploration de la régulation de l'ostéogenèse par le LPA1 et à décrypter spécifiquement son rôle dans les cellules de la lignée ostéoblastique, grâce à un modèle de souris où le récepteur a cette fois été invalidé dans cette lignée cellulaire. Ce projet a obtenu une subvention de l'Agence Nationale de la Recherche (projet LYSBONE).

Mon travail de thèse a donc été réalisé dans le cadre de ce projet ANR, en étroite collaboration avec l'équipe du Dr Olivier Peyruchaud de l'unité Lyos (INSERM U1033) de Lyon, qui travaille sur le rôle des lysophospholipides, en particulier du LPA dans le développement des métastases osseuses ainsi que de la résorption osseuse associée. J'ai

pu réaliser une exploration histologique du tissu osseux des souris, et j'ai pu étudier *in vitro* l'impact de l'absence du récepteur sur la prolifération, la différenciation et la minéralisation osseuse. L'ensemble de mes résultats associé à l'exploration de la microarchitecture osseuse réalisée par l'équipe du Pr Peyruchaud, ont montré une diminution importante de la minéralisation corticale, et un impact majeur sur l'homéostasie des ostéocytes, cellules prépondérantes dans l'os et correspondant au stade ultime de la maturation ostéoblastique.

Dans un premier chapitre, je vais développer les connaissances de la littérature sur le développement osseux et l'ostéogenèse. Dans un deuxième chapitre, je vais détailler les données relatives à la biologie du LPA et en particulier de son récepteur LPA1. Enfin, je présenterai dans un dernier chapitre, les résultats expérimentaux que j'ai obtenus sur le rôle du récepteur LPA1 dans le processus d'ostéogenèse au cours de la croissance. Ces résultats seront suivis par une discussion et des perspectives, notamment sur la potentielle implication du LPA dans la physiopathologie de l'AIS.

CHAPITRE I : REVUE DE LITTERATURE SUR LE DEVELOPPEMENT OSSEUX et l'OSTEOGENESE

1. Le développement osseux et l'ostéogénèse

Le squelette est la charpente du corps humain. Il est constitué de 3 types d'os : les os longs (tibia, fémur par exemple), les os courts (os du carpe, vertèbres) et les os plats (sternum, côtes, calvaria). Grâce à ces os, le squelette permet de maintenir la posture du corps, et sert de moyen de protection des organes internes (figure 1). Le développement des tissus osseux composant le squelette se fait de façon évolutive. A 6 mois de gestation, le squelette du fœtus est entièrement composé de membranes fibreuses et de cartilage hyalin. A partir de cette période, le tissu osseux commence à se développer et à remplacer ces structures existantes. Ce phénomène est appelé ostéogénèse. L'ostéogénèse peut se dérouler de 2 manières différentes : l'ostéogénèse membranaire qui aboutit à la formation des os plats du squelette, et l'ostéogénèse endochondrale qui aboutit à la formation des os longs. L'ostéogénèse membranaire se fait directement par condensation des tissus mésenchymateux environnants, tandis que l'ostéogénèse endochondrale débute par une ébauche cartilagineuse qui se calcifie et qui est progressivement remplacée par du tissu osseux. Le tissu osseux est donc un tissu conjonctif spécialisé, dont la particularité réside dans la nature solide minéralisée de sa matrice extracellulaire (MEC). A la naissance, les bébés ont environ 350 os, dont une grande partie va se souder au cours de la croissance. A l'âge adulte, le squelette est composé de 206 os.

Le tissu osseux revêt une importance capitale pour l'organisme tant sur le plan biomécanique que métabolique dans le maintien de l'homéostasie notamment grâce à 3 fonctions principales :

- Une **fonction mécanique** : qui permet au squelette d'une façon générale de soutenir le corps et de protéger les organes. En effet, le tissu osseux supporte un ensemble de forces telles que la pesanteur et les contraintes physiques externes, ainsi que des forces générées par les contractions musculaires (figure 2).
- Une **fonction hématopoïétique** : Grâce à la moelle osseuse contenue dans son espace médullaire, l'os représente un réservoir de cellules souches, à l'origine des 3

lignées cellulaires du sang. De plus, la moelle contient Les cellules mésenchymateuses stromales, capables de se différencier en lignée de cellules spécialisées à savoir les adipocytes, les fibroblastes, les myoblastes, les chondrocytes et les ostéoblastes. Les CMS servent également de support structural et fonctionnel aux cellules souches hématopoïétiques (figure 2).

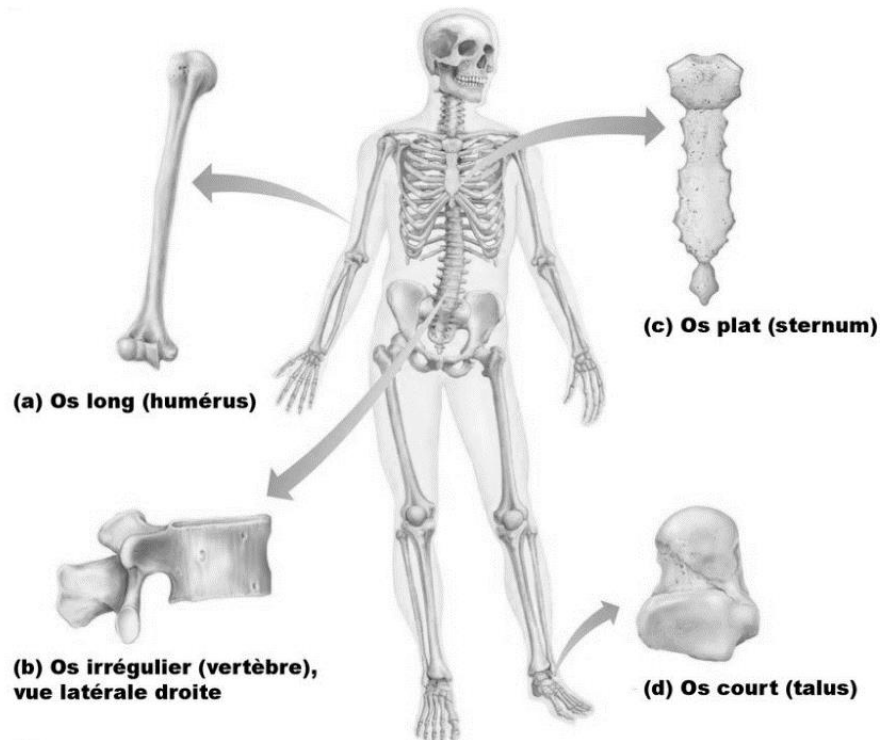


Figure 1 : Classification des os selon leur forme, adaptée de Anatomie et Physiologie humaine, chapitre 6, 5^{ème} édition.

- Une **fonction métabolique et endocrine** : La structure minéralisée de l'os représente le principal réservoir du calcium (99%) et du phosphore (90%) de l'organisme. Sous l'effet de contraintes mécaniques et hormonales, ces minéraux sont relargués ou stockés par le biais du remodelage osseux, participant ainsi au maintien de l'homéostasie phosphocalcique. L'os libère également dans la circulation sanguine au moins trois molécules impliquées dans l'homéostasie physiologique du corps: l'ostéocalcine, qui stimule la prolifération des cellules Béta du pancréas et donc la

CHAPITRE I : REVUE DE LITTÉRATURE SUR LE DEVELOPPEMENT OSSEUX ET L'OSTEOGENESE

production d'insuline (1) ; le FGF23 (*Fibroblast growth factor 23*), qui agit sur les reins, afin de diminuer la réabsorption du phosphate; et la lipocaline 2, produite par les ostéoblastes, qui participe à la régulation de la balance énergétique par l'hypothalamus (figure 2) (1). L'os est ainsi considéré depuis quelques années comme un organe endocrine.

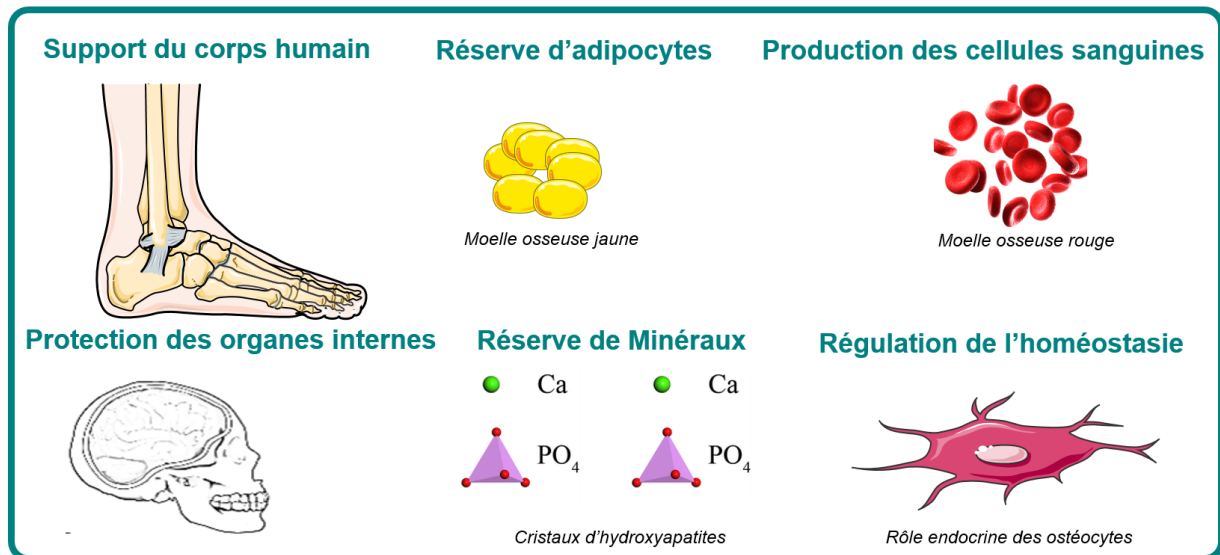


Figure 2 : Schéma montrant une vue d'ensemble des différentes fonctions du squelette humain

1.1 Morphologie du tissu osseux

Histologiquement, on distingue l'os cortical et l'os trabéculaire. La différence est basée sur le degré de porosité qui est de 5 à 30% pour l'os cortical et de 30 à 90% pour l'os trabéculaire. L'os cortical, aussi appelé os compact ou os haversien, constitue 90% du squelette. 80 à 90 % de son volume est occupé par la matrice osseuse d'où le terme « compact ». Il est l'élément essentiel dont est composé la partie médiane appelée diaphyse des os longs (figure 3). Il est principalement constitué d'ostéones ou systèmes de Havers fait de lamelles osseuses cylindriques disposées concentriquement autour du canal de Havers. Entre les lamelles se situent les ostéoplastes contenant le corps cellulaire des ostéocytes, cellules les plus abondantes du tissu osseux, surtout au niveau cortical. L'os trabéculaire ou

os spongieux quant à lui est formé par un réseau de trabécules de tissu osseux, ramifiés et anastomosés, délimitant un labyrinthe d'espaces intercommunicants occupés par de la moelle osseuse et des vaisseaux. La matrice osseuse ne représente que 15 à 20 % du tissu. Il siège essentiellement dans les os courts, les os plats ainsi que dans les épiphyses (extrémités) des os longs (figure 3). Il est le composant essentiel des vertèbres. Les os longs, courts et plats sont entourés par le périoste, constitué par une couche externe de tissu conjonctif fibreux et par une couche interne contenant les cellules ostéoprogénitrices. La face interne des os longs est bordée par l'endoste, constitué d'une fine couche de tissu conjonctif contenant des cellules ostéoprogénitrices et des cellules bordantes. Les cellules ostéoprogénitrices sont localisées dans la moelle osseuse contenue dans la cavité centrale de l'os.

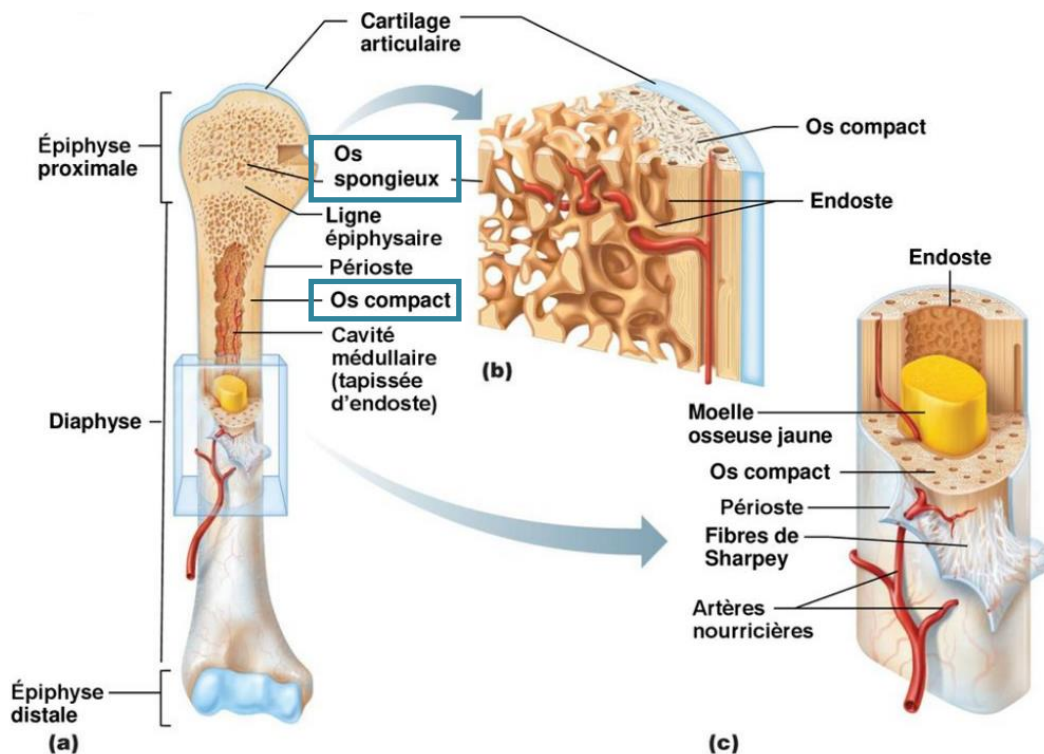


Figure 3 : Structure d'un os long (Humérus). (a) vue antérieure avec une coupe frontale où l'on voit l'intérieur de l'extrémité proximale. (b), vue tridimensionnelle grossie de l'os trabéculaire/spongieux et de l'os cortical/compact de l'épiphyse de la coupe a. (c), coupe transversale grossie de la diaphyse de la coupe a. la diaphyse est recouverte du périoste. Figure adaptée de Anatomie et Physiologie humaine, chapitre 6, 5^{ème} édition.

1.2 Structure et Composition de l'os

Le tissu osseux est composé de cellules (ostéoblastes, ostéocytes, ostéoclastes) et d'une matrice extracellulaire.

1.2.1 La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire est sécrétée par les ostéoblastes. Elle est constituée de 2 composantes : une fraction organique, et une fraction inorganique ou minérale.

- La fraction organique

Elle est majoritairement composée de collagène de type I (90%), protéine assurant la résistance et l'élasticité de l'os. Le collagène est organisé sous forme de réseau de fibres associées à des protéines non collagéniques (PNC). Ces PNC représentent 10% du tissu organique. Elles sont composées de glycosaminoglycanes, et de protéoglycanes participant à l'organisation du tissu osseux, ainsi que de petites protéines (Ostéonectine, Sialoprotéines osseuses, ostéocalcine, ostéopontine) plus impliquées dans la régulation de processus physiologiques comme la minéralisation ou encore la résorption osseuse.

- La fraction inorganique

Elle est constituée principalement de cristaux d'hydroxyapatites ou phosphate tricalcique qui se fixent sur les fibres de collagène. Ces cristaux représentent environ 70 % du poids de l'os. On retrouve aussi des carbonates de calcium, des phosphates de magnésium.

1.2.2 Les cellules osseuses

Le remaniement perpétuel du tissu osseux est assuré par un ensemble de cellules progénitrices et de cellules spécialisées à savoir : les ostéoclastes, les cellules mésenchymateuses stromales (CMSs), les ostéoblastes et les ostéocytes (figure 4).

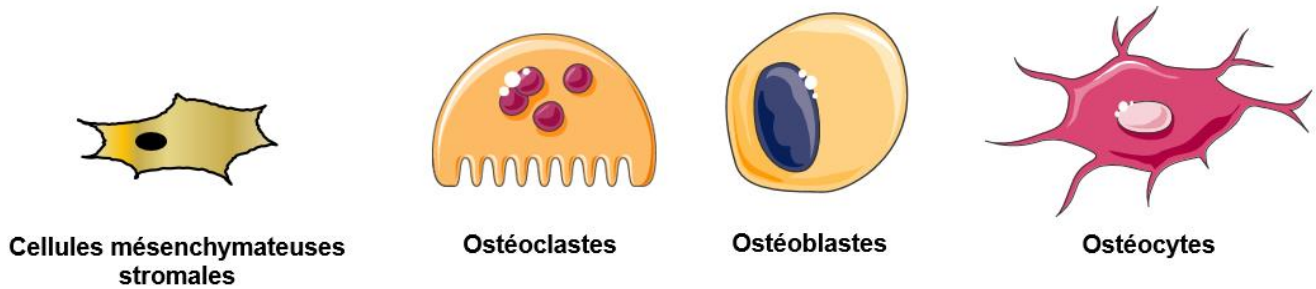


Figure 4 : Schéma représentatif de la morphologie des différents types de cellules osseuses.

1.2.2.1 Les ostéoclastes

Les ostéoclastes sont les cellules responsables de la résorption osseuse. Elles sont plurinucléées avec 4 à 20 noyaux environ situés au centre de la cellule et donc volumineuses (20 à 100 μm de diamètre). Elles proviennent des cellules souches hématopoïétiques, et plus précisément de précurseurs mononucléaires circulants de la lignée monocyte-macrophage comme démontré dans de nombreux modèles *in vitro*: moelle osseuse totale (2), macrophages péritonéaux et monocytes de sang circulant différenciés en ostéoclastes (3). Plusieurs facteurs sont nécessaires à la différenciation de ces précurseurs en ostéoclastes. Il est bien connu aujourd'hui, que les interactions avec les cellules stromales ainsi que des signaux moléculaires particuliers issus de leur microenvironnement sont déterminants dans cette différenciation. Trois acteurs moléculaires jouent un rôle majeur : le M-CSF (macrophage-colonystimulating factor) ou CSF-1, le RANKL, ligand du récepteur RANK (récepteur pour l'activation du facteur de transcription NF κ B), et l'ostéoprotégérine (OPG) qui est un antagoniste soluble du RANKL produit par les ostéoblastes.

La différenciation commence par l'engagement des premiers précurseurs des macrophages /ostéoclastes grâce au facteur de transcription PU.1. Une fois, l'engagement effectif, le M-CSF stimule leur prolifération et leur survie. Il est produit de façon constitutive dans le microenvironnement osseux par plusieurs types cellulaires, les cellules stromales, les ostéoblastes et les lymphocytes T. Il peut être aussi induit dans certains contextes

inflammatoires par l'action des cytokines telles que le TNF et l'IL 10, ou en réponse à l'action de la vitamine D (4). Les premières études montrant le rôle du M-CSF ont été réalisées avec des expériences de différenciation de cellules hématopoïétiques de rate de souris normales en co-cultures avec des ostéoblastes primaires provenant de souris op/op déficientes en M-CSF et ostéopétrotiques (5). En absence du M-CSF, ces cellules hématopoïétiques étaient incapables de se différencier en ostéoclastes matures, et mourraient à l'état de préostéoclastes au bout de 18h (6). Les précurseurs ostéoclastiques mononucléés expriment à leur surface un facteur protéique transmembranaire appartenant à la famille des récepteurs au TNF qui est le RANK. Ce récepteur est très important pour l'ostéoclastogenèse. Les souris déficiente pour le gène RANK développent une ostéopétrose sévère due à une inhibition totale de l'ostéoclastogenèse, comme rapporté par Dougall WC et al en 1999 (7). L'activation de RANK se fait par fixation de RANKL, un récepteur de la même famille, exprimé à la surface des ostéoblastes ou des cellules stromales de la moelle, et aussi par les lymphocytes T activés dans certaines maladies inflammatoires (8,9). Cette activation aboutit à la différenciation ostéoclastique. L'interaction RANK/RANKL induit le recrutement de TRAF-6, un membre de la famille des TRAF (TNFR-associated factor). TRAF-6 se lie à un ou plusieurs des quatre sites de liaison du domaine intracellulaire du récepteur RANK puis active plusieurs cascades de signalisation, notamment celles impliquant le facteur de transcription NF- κ B, les MAP kinase (ERK, Janus N-terminal kinase, et p38), et Akt-2 (10). Il a par exemple été montré que les souris déficientes pour les gènes des deux sous-unités de NF- κ B présentent une ostéopétrose sévère (11) de même que les souris *traf6*^{-/-} (12). L'ensemble de ces voies, additionné à des facteurs autocrines produits par les précurseurs ostéoclastiques tels que le facteur chimiotactique des éosinophiles-L (ECFL), aboutit à la production de molécules d'adhésion telles que ICAM-1 et LFA-1 (13). Les ostéoclastes expriment également l'intégrine $\alpha\beta$ 3, ce qui leur permet d'établir une forte interaction avec des composants de la MEC, et par conséquent une forte capacité à pouvoir migrer à la surface des travées osseuses. L'interaction de l'ensemble des molécules de surface aboutit à la fusion des précurseurs mononucléés pour former des ostéoclastes matures multinucléés. Les ostéoclastes sont dotés d'un appareil lysosomal puissant capable de résorber la matrice osseuse, et contenant notamment une phosphatase acide tartrate résistante (TRAP5b), un des principaux marqueurs ostéoclastiques. L'activité enzymatique de TRAP5b est représentative du nombre et de l'activité des ostéoclastes. Les ostéoclastes expriment aussi des récepteurs essentiels pour leur fonction, notamment le récepteur de la

calcitonine (CTR) (14). Le CTR, lorsqu'il est activé par la calcitonine, induit une rétraction de la membrane ostéoclastique polarisée, et donc un blocage de l'activité de résorption.

Lorsque les ostéoclastes sont activés, ils changent leur morphologie relativement étalée, sans polarité membranaire, pour se polariser verticalement avec la formation d'une membrane spécialisée qui se met au contact de l'os pour l'activité de résorption (figure 5). Elle débute par la dissolution de la partie minérale par libération de protons par l'anydase carbonique II, qui est une pompe à proton. Les protons s'associent avec le chlore pour donner de l'acide chloridrique. L'acidification et donc la diminution du pH conduit à la dissolution des cristaux de minéraux. La matrice collagénique déminéralisée est ensuite digérée sous l'effet d'enzymes lysosomiales telles que la cathepsine K, les collagénases et d'autres métalloprotéinases matricielles libérées par exocytose (15). Les lacunes laissées après l'action des ostéoclastes sont appelées lacunes de Howship. Une fois ces lacunes creusées, les ostéoclastes meurent par apoptose et sont remplacés par des macrophages qui lissent le fond de la lacune.

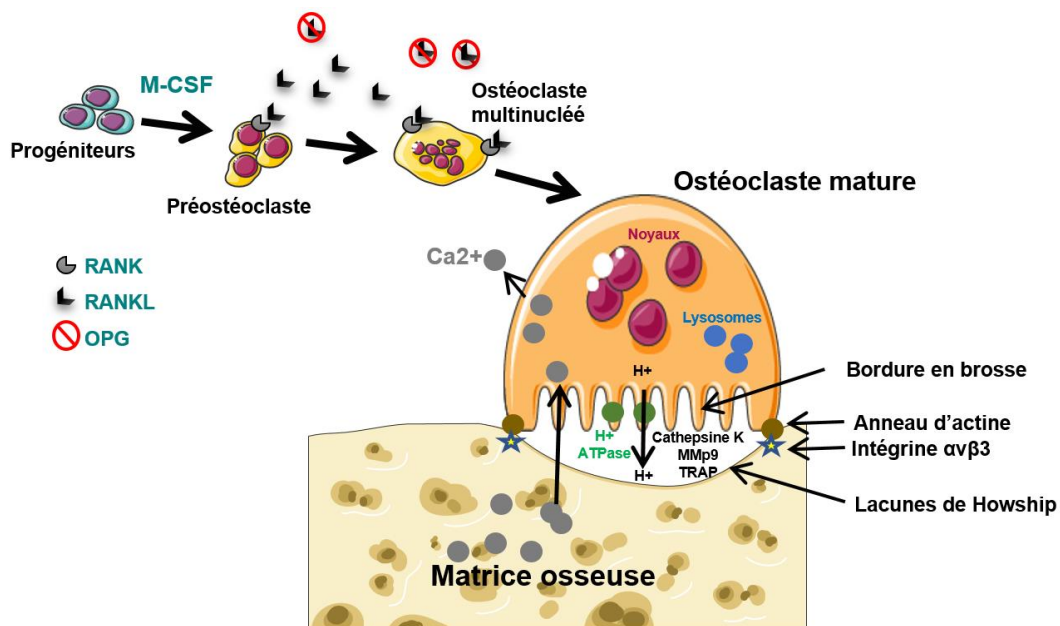


Figure 5: Représentation de la différenciation ostéoclastique jusqu'à l'obtention d'un ostéoclaste mature capable de résorber la matrice osseuse. Les ostéoclastes sont issus de progéniteurs de la lignée monocyte-macrophage. Deux facteurs sont essentiels à l'ostéoclastogenèse : M-CSF induisant l'apparition des préostéoclastes et RANKL permettant leur fusion pour donner des ostéoclastes multinucléés qui se polarisent au contact de l'os. L'OPG produit par les ostéoblastes joue un rôle de régulateur négatif dans la formation des ostéoclastes. L'ostéoclaste

CHAPITRE I : REVUE DE LITTÉRATURE SUR LE DÉVELOPPEMENT OSSEUX ET L'OSTÉOGENÈSE

mature s'attache sur les protéines de la matrice osseuse via l'intégrine $\alpha\text{v}\beta3$. Il se forme une zone scellée, la lacune de Howship dans laquelle la cellule libère des protons (H^+) qui acidifient le compartiment et induisent une déminéralisation de la matrice osseuse. Les ostéoclastes libèrent des enzymes spécifiques (cathepsine K, MMP9...) qui dégradent la trame collagénique de l'os.

L'OPG, troisième régulateur clé de l'ostéoclastogénèse mentionné plus haut, est une glycoprotéine produite par les ostéoblastes et aussi par d'autres cellules médullaires. Elle agit en se fixant sur RANKL. Cette fixation crée une compétition d'action pour la fixation à RANK, ce qui aboutit à une inhibition de la différenciation ostéoclastique (16,17). L'OPG appartient également à la famille des récepteurs au TNF, avec la particularité de ne pas comporter de domaine transmembranaire et par conséquent de n'induire aucun signal. Le ratio RANKL/OPG a donc une importance déterminante dans la résorption osseuse. Par ailleurs, la délétion du gène de l'OPG provoque une ostéoporose sévère caractérisée par une résorption exacerbée (18), tandis qu'une sur-expression de ce gène induit une ostéopétrose, soulignant ainsi l'importance du système RANKL/OPG dans la détermination de la masse osseuse (19).

1.2.2.2 Les cellules mésenchymateuses stromales

Aujourd'hui, la nature des progéniteurs mésenchymateux aux propriétés de différenciation multiples, est mieux connue. Après le développement embryonnaire, il persiste des niches de cellules souches où les progéniteurs cellulaires sont maintenus dans un état quiescent indifférencié et servent au renouvellement des tissus (20). Ces sites sont très variés, incluant notamment la moelle osseuse, ou le stroma du tissu adipeux. Les CMSs de la moelle osseuse sont capables de se différencier en adipocytes, chondrocytes, ostéoblastes, ou en myoblastes. Les deux lignages cellulaires impliqués dans l'ossification endochondrale sont la chondrogenèse ou différenciation en chondrocyte et l'ostéogenèse ou différenciation en ostéoblaste (21,22).

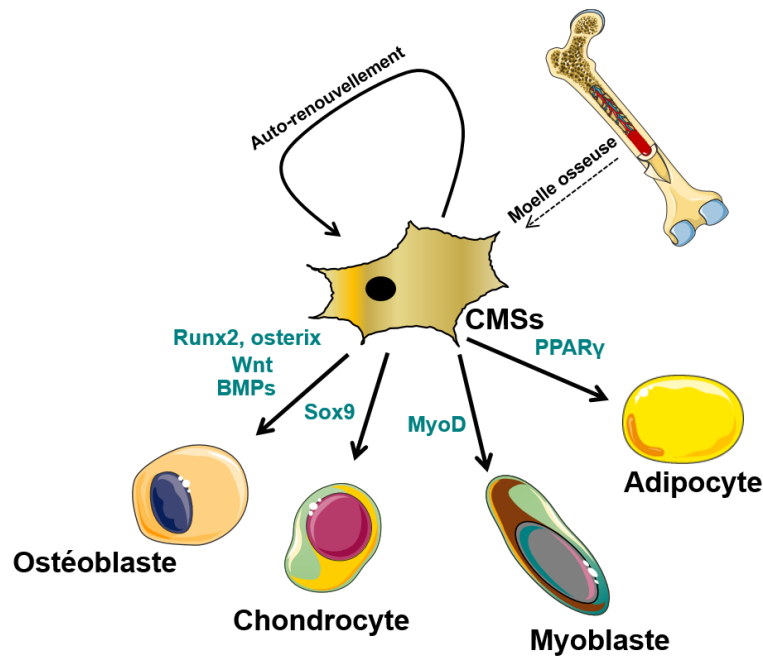


Figure 6 : Schéma montrant les lignages cellulaires possibles à partir de la différenciation des CMSs de la moelle osseuse. Différents acteurs moléculaires sont impliqués dans la stimulation de ces lignages (Runx2, Wnt, BMPs, Sox9, MyoD, PPARγ)

1.2.2.3 Les ostéoblastes

Les ostéoblastes sont des cellules spécialisées dans la formation de la matrice minéralisée. Ils sont issus de CMS soit d'origine mésodermique pour les os longs, soit provenant des crêtes neurales dans les os du crâne et de la face. Chez l'adulte, ces CMS sont principalement présentes dans le périoste et le stroma de la moelle osseuse (23). Morphologiquement, les ostéoblastes matures présentent une forme cuboïdale (24). Les différents mécanismes cellulaires et moléculaires qui aboutissent à la différenciation des CMS en ostéoblastes sont bien connus aujourd'hui. Plusieurs étapes peuvent ainsi être soulignées, notamment les phases précoces regroupant l'obtention et la prolifération des préostéoblastes, et les phases tardives pendant lesquelles les ostéoblastes deviennent matures et actifs. L'engagement vers la lignée ostéoblastique est induit par l'expression de deux facteurs de transcription majeurs qui sont Runx2/Cbfa1 et Osterix (Osx) (figure 7). Ces deux facteurs de transcription sont stimulés dans les CMS par les protéines

morphogénétiques osseuses (Bone Morphogenetic Proteins ou BMPs) (25,26). Ce sont des membres de la superfamille du TGF-beta, signalant par l'intermédiaire de récepteurs sérine-thréonine kinases, les récepteurs des BMP (BMPR) qui par phosphorylation des protéines transductrices de la famille SMAD, stimulent la formation osseuse. Tout d'abord, Runx2 est exprimé à un stade tardif dans les condensations mésenchymateuses. Il est aussi fortement exprimé au niveau des ostéoblastes en différenciation. Les souris mutantes sur le gène de Runx2 présentent une absence totale de formation osseuse en raison de l'arrêt de la maturation des ostéoblastes, avec un tissu cartilagineux immature à la place du squelette (27,28). Inversement, la surexpression de Runx2 dans d'autres types cellulaires, est capable de rediriger leur différenciation vers un phénotype ostéoblastique (25). En effet, Runx2 stimule l'activité des promoteurs d'effecteurs ostéoblastiques majeurs tels que l'ostéocalcine, l'ostéopontine et le collagène de type I suggérant son importance aussi durant la vie de l'ostéoblaste (29,30).

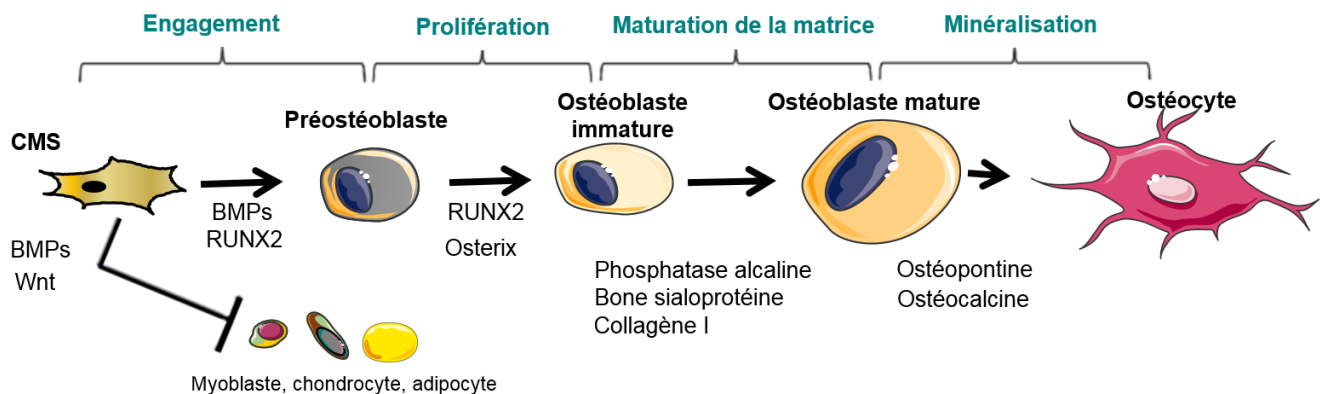


Figure 7 : Schéma représentatif des étapes de la différenciation des ostéoblastes. L'action conjointe de différents facteurs comme les BMPs, la β -caténine par la voie Wnt, Runx-2 et Osterix sur les cellules ostéoprogénitrices induit leur prolifération et leur différenciation en ostéoblastes matures, puis en ostéocyte, tout en supprimant les autres lignages cellulaires possibles. Les ostéoblastes produisent les constituants de la matrice osseuse comme le collagène de type I, et permettent sa maturation en exprimant de façon accrue la phosphatase alcaline, l'ostéocalcine, l'ostéopontine et la sialoprotéine osseuse. Figure adaptée à partir de la référence (31)

Vient ensuite le facteur de transcription *Osx*, qui en aval de *Runx2* exerce un effet spécifique sur le lignage ostéoblastique comme démontré avec les souris *Osx* KO qui développent un squelette cartilagineux, dépourvus d'ostéoblastes et de matrice osseuse (32,33). Une fois les premiers progéniteurs préostéoblastiques apparus, ils prolifèrent rapidement et se spécialisent grâce à l'activité d'autres facteurs de transcription, qui stimulent à la fois la prolifération et l'expression massive du collagène de type I et de la phosphatase alcaline osseuse (PAL osseuse). Ainsi, peut-on soulever l'importance de *c-Fos* et *c-Jun*, membre du complexe AP-1 dont l'activité est très intense dans les préostéoblastes. *Msx2* (*Msh* homeobox homologue 2) et *Dlx5* (*Distal-less* homeobox 5), deux facteurs de transcription à homéobox, dont l'expression est également stimulée par les BMP semblent aussi jouer un rôle important (34,35). *Msx2* est fortement exprimé par les préostéoblastes, stimulant leur prolifération, tandis que son expression disparaît chez les ostéoblastes matures (35). Sa surexpression accélère l'ossification membranaire tandis que son inactivation retarde la différenciation ostéoblastique (36). L'invalidation du gène *Dlx-5* dans un modèle murin induit un retard d'ossification, sans altération de la morphogenèse, suggérant son implication dans le contrôle de l'ostéogenèse (37). L'action coordonnée de ces facteurs de transcription est essentielle pour les phases précoces de la différenciation ostéoblastique. On peut enfin évoquer l'importance du récepteur LRP5, membre de la famille des low-density lipoprotein receptors. Il a été rapporté comme stimulant la formation osseuse (38). Les ostéoblastes acquièrent au fur et à mesure une forme cellulaire cuboïdale et des caractéristiques fonctionnelles spécifiques. Ils sont dotés d'une intense activité de synthèse de par leur richesse en composants intracellulaires (réticulum endoplasmique, mitochondries, et appareil de Golgi ultra développés), leur permettant de produire le tissu ostéoïde et d'assurer sa calcification au cours de la croissance du squelette, de son renouvellement continu chez l'adulte et de sa réparation tout au long de la vie. Certaines protéines effectrices de l'ostéoblaste jouent un rôle clé dans cette activité. C'est le cas de la sialoprotéine osseuse (BSP), de la phosphatase alcaline, de l'ostéocalcine et de l'ostéopontine. La BSP fait partie des marqueurs tardifs ostéoblastiques. Elle est impliquée dans les processus de minéralisation osseuse et dentaire, et ce probablement en favorisant la liaison des minéraux à la matrice, du fait des sites de liaison au calcium qu'elle présente (39). L'ostéopontine est une phosphoprotéine non collagénique non spécifique du tissu osseux, impliquée dans l'adhérence de l'ostéoclaste à la MEC lors de la résorption osseuse (40). Son invalidation induit une augmentation de la masse osseuse (41). L'ostéocalcine ou Gla-protéine osseuse (BGLAP) est un marqueur de maturation, le plus tardif de la

différenciation ostéoblastique, représentant 20 % des protéines non collagéniques (42,43), et dotée d'une forte affinité pour les minéraux. Elle se lie à la matrice osseuse minéralisée. Son relargage et sa disponibilité sérique indiquent une activité de formation osseuse. Les souris KO pour l'ostéocalcine ne présente aucune variation de leur masse osseuse suggère que l'ostéocalcine n'a pas d'implication directe dans la minéralisation. Il a depuis été établi que son rôle serait de stimuler la production par les adipocytes, d'adiponectine (44,45), de favoriser la sécrétion d'insuline (44), le tout aboutissant à l'utilisation du glucose et à une stimulation du métabolisme énergétique. La PAL osseuse est une enzyme ectocellulaire membranaire. Elle dégrade les pyrophosphates inorganiques, inhibiteurs de la calcification, ce qui augmente le taux de phosphate inorganiques nécessaires pour la minéralisation (46). Son expression débute depuis les stades précoces et évolue de façon croissante au cours de la différenciation. Elle faciliterait également le transport du phosphore par son activité phosphotransférase. Le dosage sérique de la PAL est donc un bon reflet de l'activité ostéoblastique et du processus de formation osseuse, d'autant plus que les souris KO pour son gène présentent une anomalie de la minéralisation osseuse (47).

Tout au long de leur vie, les ostéoblastes jouent un rôle majeur dans l'ostéoclastogénèse. En effet, hormis l'importance cruciale de l'interaction RANK/RANKL et du M-CSF susmentionnés, les ostéoblastes produisent des facteurs solubles activateurs tels que l'IL-1, le TNF alpha, l'IL-6 et l'IL-11 pour induire des mécanismes dépendant de RANK/RANKL ou non. L'IL-1, produite majoritairement par les monocytes et aussi par les CMS, stimule le recrutement et la survie des préostéoclastes et donc leur fusion (6). Il a par ailleurs été rapporté comme induisant l'expression de facteurs intermédiaires comme l'IL-6 ou l'IL-11. L'IL-6, également produite par les monocytes et les CSM active la résorption osseuse par stimulation de RANKL, après fracture, ce qui favorise la réparation tissulaire osseuse (48). Par ailleurs, L'injection d'anticorps anti-IL-6 inhibe la perte osseuse chez la souris ovariectomisée, suggérant ainsi son importance dans l'ostéoporose post-ménopausique.

A la fin de la période de formation osseuse, les ostéoblastes peuvent suivre 3 voies. La plupart (65%) vont mourir par apoptose (49,50). Certains ostéoblastes deviennent des cellules bordantes sur les surfaces osseuses et elles ne présentent plus aucune activité de synthèse osseuse. Lorsque nécessaire, elles peuvent être réactivées ultérieurement en ostéoblastes matures pour former de l'os (49). Le reste des ostéoblastes (15%) va se retrouver piégé dans la matrice minéralisée et va se transformer en ostéocytes (figure 8).

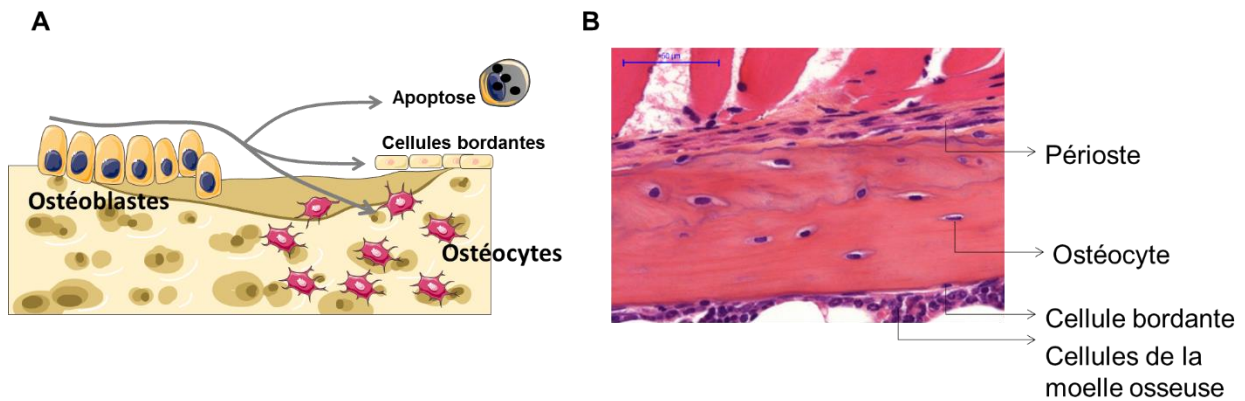


Figure 8 : A) Schéma montrant le devenir des cellules ostéoblastiques au terme de leur différenciation, où elles deviennent des ostéocytes emmurés dans la matrice, meurent par apoptose ou stagnent au bord de la matrice comme cellules bordantes capables d'être réactivées. B) Coupe d'os cortical de fémur de souris coloré à l'hématoxyline éosine.

1.2.2.4 Les ostéocytes

L'ostéocytogenèse est l'étape finale de la différenciation ostéogénique. Les ostéocytes représentent plus de 90% à 95% du nombre total de cellules osseuses formant le squelette chez l'adulte. Ce sont des ostéoblastes ultra différenciés, entièrement emmurés dans la MEC osseuse minéralisée. Le corps cellulaire des ostéocytes est de plus petite taille que celui des ostéoblastes. Il est fusiforme, et possèdent moins d'organites que les ostéoblastes. Le corps cellulaire est enfermé dans une lacune de 15 à 20 μm de diamètre appelées ostéoplastes. Ils sont caractérisés par leurs prolongements cytoplasmiques, fins et reliés entre eux par des jonctions communicantes. Ces prolongements ou encore dendrites se localisent dans des canalicules anastomosées d'environ 250 à 300 nm de diamètre. L'ensemble des lacunes et des canalicules ostéocytaires forment un réseau complexe appelé réseau/système lacuno-canaliculaire des ostéocytes (figure 9). Ils ont des capacités de synthèse et de résorption limitées, mais jouent un rôle central dans le maintien l'homéostasie osseuse.

La caractérisation et la compréhension des mécanismes cellulaires, moléculaires et génétiques qui se produisent au cours de la différenciation des ostéoblastes en ostéocytes ont présenté des contraintes majeures et ce pendant des années, en raison du manque de modèles cellulaires ostéocytaires appropriés, et des difficultés à non seulement isoler un

nombre suffisant d'ostéocytes primaires mais aussi à pouvoir les manipuler *in vitro* dans un environnement similaire à celui du tissu osseux. Cependant, au cours des dernières années, la plupart de ces mécanismes ont été largement élucidés.

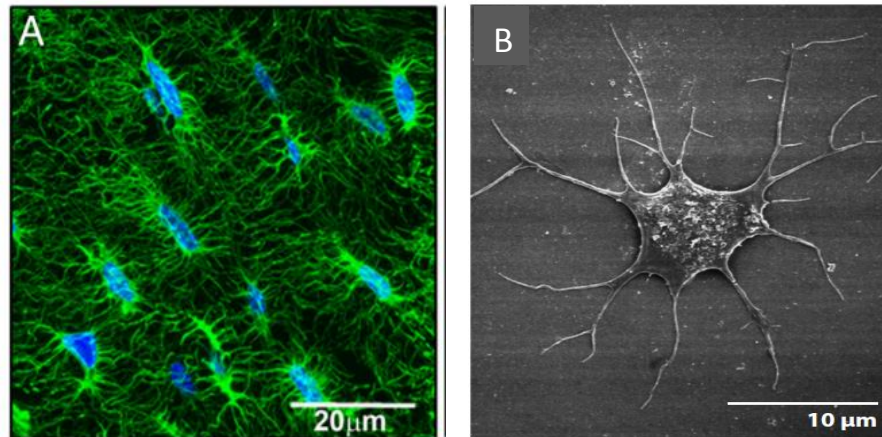


Figure 9 : Morphologie des ostéocytes *in vitro* et *in vivo*. (A) Image de microscopie confocale d'une coupe de fémur de souris adulte, marqué à la phalloïdine Alexa fluor 488 (vert) et au Dapi (bleu), où on aperçoit les ostéocytes dans leur réseau lacuno-canaliculaire (51). (B) Ostéocyte primaire en 2D visualisé par microscopie électronique à balayage (52).

- **Mécanismes cellulaires de l'ostéocytogenèse**

Au cours de la transition ostéoblastes-ostéocytes, plusieurs observations dans le changement morphologique des ostéoblastes ont été décrites dans la littérature. La morphologie des ostéoblastes passe d'une forme cuboïdale à une forme plus étoilée avec la formation et l'allongement de nombreuses projections cellulaires vers la matrice extracellulaire. Ces projections sont désignées sous le terme de dendrites. Au fur et à mesure que l'ostéocyte s'intègre et se différencie, il présente un volume cellulaire moins important c'est-à-dire jusqu'à 70% en moins (51). L'ostéocyte subit également des changements ultrastructuraux, au niveau du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi qui sont réduits (53). Cependant, ils acquièrent un réseau de mitochondries très développé par rapport à celui des ostéoblastes, suggérant déjà des changements radicaux dans le métabolisme intracellulaire (52). La transition ostéoblastes-ostéocytes implique par ailleurs une vaste réorganisation des protéines du cytosquelette (54). La formation des

dendrites dépendant d'ailleurs en partie de ces changements. Les dendrites s'étendent à la fois vers la surface osseuse et vers l'intérieur de l'os et développent des interconnexions. Cette morphologie caractéristique forme ainsi, grâce aux canalicules, un réseau fonctionnel puissant, assurant le transport d'un fluide circulant d'un ostéocyte à l'autre. De façon plus globale, les dendrites relient le cytoplasme des ostéocytes adjacents et permettent le passage de ce fluide canaliculaire. Il contient des nutriments et des signaux biochimiques essentiels à la communication, au maintien de la viabilité cellulaire et par conséquent au fonctionnement normale de l'ostéocyte (55–57). Il permet d'échanger des molécules de moins de 1 kDa (62). Des anomalies dans le réseau lacuno-canaliculaire ont été rapportées comme pouvant avoir des conséquences négatives sur la qualité des os. Il a été rapporté que le nombre de canalicules augmente avec l'âge (58,59), et qu'au contraire, on observe une diminution significative du nombre de dendrites ostéocytaires avec une corrélation directe avec la qualité de l'os qui se dégrade au cours du vieillissement (60,61). Une fois encore cela témoigne de l'importance des ostéocytes dans l'homéostasie du tissu osseux et les place comme cible prioritaire dans les problématiques liés aux pathologies osseuses du vieillissement.

- **Mécanismes moléculaires et principaux marqueurs de l'ostéocyte**

L'une des premières étapes clés dans l'ostéocytogenèse est incontestablement la formation des dendrites. La caractérisation de cette étape a conduit à l'identification du premier marqueur de la différenciation ostéocytaire à savoir la protéine E11 (62,63). D'autres marqueurs précoces tels que Dmp1, Dkk1, MEPE, PHEX, seront exprimés tout au long de la maturation, avant d'aboutir à un ostéocyte ultra différenciés avec des marqueurs plus tardifs tels que la sclérostine et le FGF23.

E11/Gp38 ou podoplanine, est une glycoprotéine membranaire exprimée par les préostéocytes. Elle est connue pour se lier au CD44 et aux complexes ezrine-radixine-moesine (64). Cette liaison permet de déclencher la formation du processus dendritique dans les ostéocytes. Il a été démontré que la surexpression de E11 induit la formation de dendrites dans une lignée cellulaire ostéoblastique (52). L'inhibition de l'expression de E11 par interférence à l'ARN provoque un blocage du processus dendritique dans des lignées cellulaires de type ostéocytes MLO-Y4 (65). D'autres études rapportent que E11 active la petite GTPase RhoA, entraînant ainsi un réarrangement du cytosquelette et une

augmentation de la motilité cellulaire (66). La régulation de E11 est loin d'être entièrement comprise. Cependant, l'action de certains facteurs de transcription capables de moduler son expression a été évoquée. C'est le cas de SP1 / 3 (77) et AP1 (67). In vivo, l'expression de E11 s'est avérée augmentée dans les ostéocytes après stimulation mécanique (65). Cette expression est plus élevée dans les préostéocytes, mais persiste dans les ostéocytes matures.

DMP1 (dentin matrix protein 1) est une protéine de la MEC sécrétée, et impliquée dans la minéralisation. Il a été décrit dans les chondrocytes hypertrophiques et les ostéoblastes pendant la formation osseuse embryonnaire (68). Son expression débute dans les préostéocytes et perdure dans les ostéocytes matures. Les souris KO pour Dmp1 présentent une hypophosphatémie et des niveaux très élevés de FGF23, un marqueur terminal de l'ostéocyte, ceci conduisant à une grave altération de la minéralisation et entraînant un phénotype ostéomalacique (69). Une autre protéine, PHEX, fortement exprimée dans les ostéocytes joue un rôle dans la minéralisation. D'ailleurs, la souris Hyp, mutée pour le gène PHEX présente une déminéralisation osseuse et est largement utilisée comme modèle de rachitisme hypophosphatémique lié à l'X (70). Les ostéocytes expriment également MEPE (matrix extracellular phosphoglycoprotein) (71). MEPE augmente les niveaux de FGF23 via l'inhibition de l'activité enzymatique de PHEX (72).

L'ostéocyte lors de sa maturation ultime exprime deux molécules fonctionnelles majeures à savoir le FGF23 et la sclérostine (codée par le gène SOST) (73–78). La sclérostine est une glycoprotéine sécrétée, qui agit comme un inhibiteur de la formation osseuse [81,82 rev PTH]. Elle inhibe la signalisation Wnt / Bêta-caténine au niveau des ostéoblastes. Un autre marqueur ostéocytaire, plutôt précoce, Dickkopf1 (Dkk1), protéine sécrétée, agit d'ailleurs par le même mécanisme (79,80). Cette inhibition de la voie Wnt, sur laquelle nous reviendrons un peu plus loin, conduit à une diminution de l'ostéogenèse. La réduction de la concentration et/ou de l'activité de la sclérostine chez les sujets humains conduit à deux maladies génétiques appelées la maladie de van Buchem et la sclérostéose, caractérisées par une prolifération osseuse généralisée et une sclérose progressive du squelette (73,81).

Le FGF23 quant à lui est une hormone peptidique sécrétée principalement par les ostéocytes mais également les ostéoblastes matures. Il intervient dans la régulation de la phosphatémie. Je reviendrai de façon plus détaillée sur l'implication du FGF23 et de la sclérostine dans la partie relative à la fonction endocrine de l'ostéocyte.

CHAPITRE I : REVUE DE LITTÉRATURE SUR LE DEVELOPPEMENT OSSEUX ET L'OSTEOGENESE

En somme, au cours de leur différenciation, les ostéocytes présentent un profil d'expression génique unique et assez complexe (figure 10).

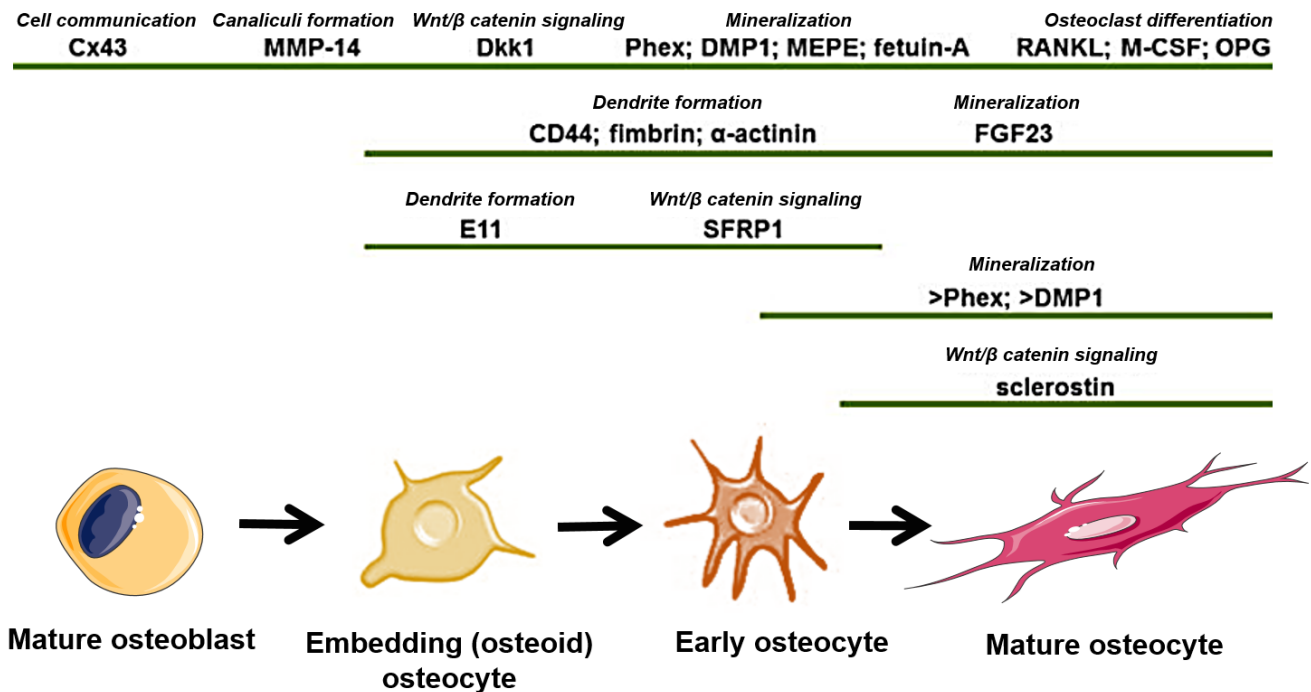


Figure 10 : Signature moléculaire des ostéocytes. Le profil d'expression des marqueurs évolue au fur et à mesure que l'ostéoblaste s'emmure dans la matrice jusqu'à atteindre le stade d'ostéocyte mature. Les processus dans lesquels sont impliqués les marqueurs sont indiqués, et montre l'importance de ces marqueurs comparativement au niveau d'expression des autres cellules de la lignée ostéoblastique. Figure adaptée à partir de la référence (82)

Les mécanismes moléculaires qui régissent le déclenchement et qui assurent le maintien de ce profil d'expression génique, aussi connu à nos jours sous le terme de « spécifications de l'ostéocyte », méritent encore d'être mieux étudiés, même si d'énormes progrès scientifiques ont été réalisés en ce sens. En effet, l'importance de l'ancrage même de l'ostéocyte dans la matrice minéralisée a été évoquée comme étant l'un des premiers facteurs déclencheurs, du fait des contraintes d'hypoxie cellulaire qui en découlent. La rigidité de la matrice fait d'elle un milieu très pauvre en oxygène. Cela pousse l'ostéocyte à s'adapter à cette restriction de l'accès à l'oxygène. Cette adaptation se traduit donc par des modifications de leur profil métabolique (83). Il a d'ailleurs été rapporté que tout en conservant leur statut oxydatif, les ostéocytes expriment fortement des protéines impliquées

dans la réponse hypoxique comme l'ORP150 (Oxygen-regulated protein 150 kD), et que ces conditions favorisent l'expression des marqueurs ostéocytaires (51,84,85). Comme l'oxygène, l'environnement ostéocyttaire est tout aussi pauvre en nutriments et ce malgré l'accès que peut garantir le réseau lacunocanaliculaire. Là encore, l'ostéocyte s'adapte au manque de nutriments. Cette adaptation a été minutieusement étudiée par Sánchez-de-Diego C et al qui ont démontré l'effet spécifique de la restriction en glucose (86). En effet, ils ont pu montrer que la privation en glucose déclenche dans l'ostéocyte l'activation de la voie AMPK/PGC-1. L'AMPK (Protéine kinase AMP dépendante) agit comme un capteur d'énergie cellulaire et joue un rôle essentiel dans la reprogrammation métabolique. Une fois activée, l'AMPK entraîne une absorption plus élevée du glucose, une induction des processus d'autophagie et une biogenèse mitochondriale en partie par les PGC-1 (Proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) coactivator-1) (87). Les PGC-1 sont des co-activateurs transcriptionnels qui répondent à un certain nombre de signaux environnementaux et qui régulent la biogenèse mitochondriale ainsi que l'expression de leurs gènes cibles (88). L'étude de Sánchez-de-Diego C et al., a permis d'établir clairement que les marqueurs ostéocytaires comme Dmp1, FGF23 et Sclérostine sont positivement régulés par cette voie (86).

- **Les fonctions de l'ostéocyte**

- **La fonction de mécanotransduction**

Les ostéocytes sont capables de détecter des stimuli mécaniques et capables de les convertir en réponse cellulaire. Ainsi, les premières fonctions connues des ostéocytes sont la mécanoréception et la mécanotransduction. La diminution de l'expression de la sclérostine est l'une des réponses ostéocyttaire découlant de cette mécanotransduction (89). La déformation physique de la matrice osseuse par les mouvements, l'activité physique ou le poids du corps humain font partie des stimuli mécaniques. Ils sont captés par certaines protéines dont la polycystine 1 (PC1), codée par le gène PKD1. Il est connu que les souris dont la fonction PC1 est altérée développent une ostéopénie (90). De façon plus intéressante, une délétion spécifique de PKD1 dans les ostéocytes réduit la masse osseuse des animaux, ainsi que leur sensibilité à la charge mécanique (91). D'autres acteurs participent à la fonction de mécanotransduction. Le CD44 par exemple qui est une molécule d'adhésion impliquée dans la communication cellulaire via la connexine 43 (Cx43) semble

jouer un rôle important. Il est fortement exprimé à la surface des ostéocytes (92). De même, il a été rapporté que l'intégrine 5-1 interagit avec Cx43 afin d'induire l'ouverture des canaux hémiculaires dans les cellules MLO-Y4, et ce en réponse à une stimulation mécanique (93). La Cx43 est un composant majeur des jonctions lacunaires ostéocytaires, également important pour la survie des ostéocytes si bien que sa suppression dans la lignée ostéoblastique entraîne une augmentation de l'apoptose des ostéocytes (94). De même, les ostéocytes de souris âgées, présentent un réseau dendritique moins développé, une expression réduite de Cx43, une sensibilité moindre aux charges mécaniques, et par conséquent une entrée en apoptose accrue aboutissant à une diminution progressive de la masse osseuse. Plusieurs marqueurs ostéocytaires sont induits et régulés par la stimulation mécanique comme E11 (65) ou les régulateurs de la minéralisation et de l'homéostasie du phosphate comme PHEX, MEPE et DMP1 (95–97).

- **La fonction de modulation de l'ostéoclastogenèse**

Les ostéocytes expriment et secrètent du RANKL soluble et ceci a largement été démontré *in vivo* (98–100) et *in vitro* dans des cellules MLO-Y4 (101–103), indiquant donc clairement leur capacité à stimuler l'ostéoclastogenèse. De même, les ostéocytes sont capables de sécréter à la fois le M-CSF et l'OPG (101,104). L'incidence du RANKL d'origine ostéocytaire est d'autant plus significative pour le remodelage osseux normal que l'abolition de son expression spécifiquement dans les ostéocytes, dans un modèle murin a révélé un phénotype ostéopétrotique chez les animaux adultes. Ces observations ont pu clairement montrer que le RANKL dérivé des ostéocytes est essentiel (105,106). Par ailleurs, Il a été rapporté que les corps apoptotiques dérivés des ostéocytes sont capables d'induire la formation d'ostéoclastes *in vitro* et *in vivo* contrairement à ceux dérivés d'ostéoblastes (107), suggérant ainsi un effet endocrine intrinsèque de l'ostéocyte dans l'initiation de l'ostéoclastogenèse suite aux fractures.

- **La fonction de modulation de l'ostéoblastogenèse**

L'ostéocyte contrôle l'ostéoblastogenèse notamment via la production et la sécrétion de la sclérostine. Au niveau osseux, la sclérostine agit comme un inhibiteur de l'ostéogenèse (figure 11). En effet, elle a une action antagoniste sur la signalisation Wnt / Bêta-caténine du

fait de sa capacité à se lier aux corécepteurs Wnt LRP5 et LRP6 (Lipoprotein related peptides) au niveau des ostéoblastes, provoquant ainsi leur rentrée en apoptose (112–115). Ainsi, plusieurs études sur des modèles murins ont démontré que l'invalidation de Sost induit une augmentation de la masse osseuse (116,117). Cette observation quasi révolutionnaire a d'ailleurs conduit à l'étude d'anticorps monoclonaux dirigés contre la sclérostine, dans des modèles de rongeurs et chez l'homme comme potentiel traitement de l'ostéoporose (118–122). C'est le cas par exemple du Romosozumab (118,123,124). De plus, cette inhibition de la signalisation Wnt / Bêta-caténine par la sclérostine, conduit à une diminution de l'expression de l'OPG qui est une des cibles de la voie Wnt au niveau des ostéoblastes (125). Ceci favorise de façon indirecte l'ostéoclastogenèse.

Par ailleurs, l'inhibition de la signalisation Wnt par la sclérostine sécrétée, semble se produire également au niveau des progéniteurs mésenchymateux, avec comme conséquence une diminution du lignage et de la différenciation ostéoblastique en faveur d'une augmentation de la différenciation adipogénique. Le rôle de la sclérostine au niveau des chondrocyte de la plaque de croissance n'est pas clairement identifié à ce jour (114).

○ La fonction propre de résorption

Comme vu précédemment, les ostéoclastes sont les cellules majoritairement responsables de la résorption osseuse, et cette activité peut être stimulée par les ostéocytes. Cependant, l'une des caractéristiques spécifiques de l'ostéocyte, est sa capacité intrinsèque à résorber la matrice osseuse et ce dans diverses conditions. En effet, l'activité de TRAP fait partie des premiers éléments de résorption ayant été décrits dans les ostéocytes (108,109). De même, il a été récemment constaté chez les souris que la surface lacunaire des ostéocytes augmente avec la lactation et revient à la normal avec le sevrage forcé (110). D'autres études rapportent que ces ostéocytes de souris allaitantes expriment des gènes normalement associés aux ostéoclastes, comme la cathepsine K, la TRAP, ainsi que l'anhydrase carbonique 2. Ces observations démontrent que les ostéocytes ont la capacité de remodeler leur matrice périlacunaire et péricanaliculaire, et ce processus a été montré comme particulièrement actif durant l'allaitement pour permettre la mobilisation du calcium (111,112). Il semble que le remodelage ostéocytaire est en partie médié par la sclérostine. Des études *in vitro* ont pu montrer que l'ajout de sclérostine à des MLO-Y4 ou à des ostéocytes humains primaires induit l'expression de gènes de remodelage périlacunaires

comme la cathepsine K, l'anhydrase carbonique 2 et la métalloprotéinase matricielle 13 (113).

○ La fonction endocrine de l'ostéocyte

L'ostéocyte joue un rôle endocrine via la production et la sécrétion de FGF23 et potentiellement de la sclérostine, dont nous avons parlé précédemment. En dehors du microenvironnement osseux, la sclérostine a été rapportée comme ayant potentiellement un rôle dans certains contextes pathologiques. En effet, chez l'homme, des taux élevés de sclérostine sérique ont été rapportés chez les diabétiques. De plus, une étude clinique a révélé que des niveaux élevés de sclérostine sont corrélés à la mortalité due à des causes cardiovasculaires chez les patients ayant un diabète de type 2 (114). En outre, des souris nourries avec une alimentation riche en graisses ont présenté une augmentation du poids corporel et de la masse grasse, et une sclérostine sérique élevée (115). Ces données suggèrent que la sclérostine pourrait non seulement servir de biomarqueur du risque de mortalité cardiovasculaire, mais serait potentiellement impliquée de façon dans la régulation de l'homéostasie du tissu adipeux à des sites distants de l'os.

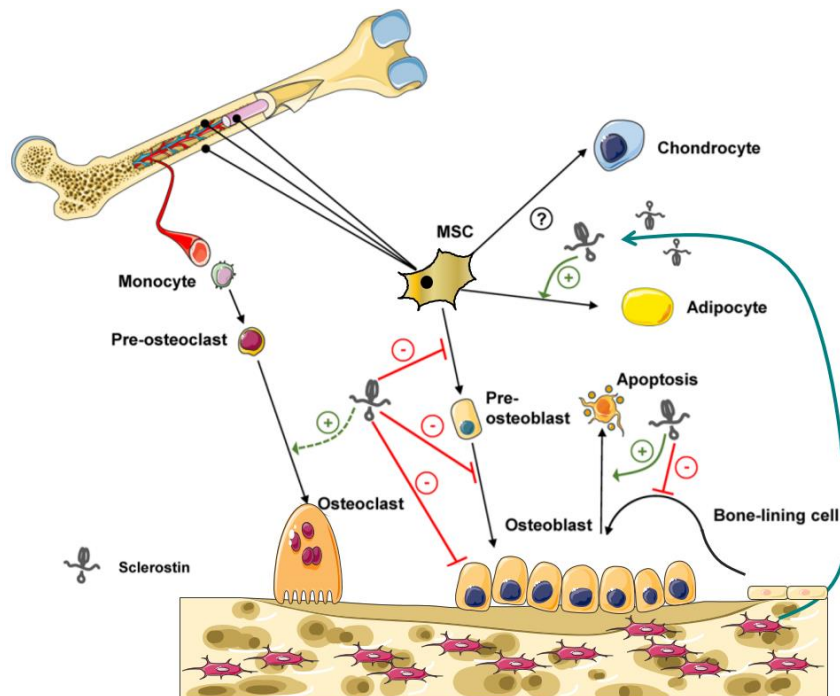


Figure 11 : Effets de la sclérostine dans le microenvironnement osseux. La signalisation canonique Wnt est inhibée par la sclérostine, résultant en une diminution de la formation osseuse. La sclérostine limite également la différenciation cellulaire de la lignée mésenchymateuse vers la lignée des ostéoblastes et favorise la

CHAPITRE I : REVUE DE LITTÉRATURE SUR LE DÉVELOPPEMENT OSSEUX ET L'OSTÉOGENÈSE

différenciation adipogénique. Elle favorise l'apoptose des ostéoblastes, maintient les cellules bordantes au repos et inhibe la transition des ostéoblastes en ostéocytes. La sclérostine favorise indirectement la résorption osseuse. Figure adaptée à partir de la référence (116).

Le deuxième acteur de la fonction endocrine de l'ostéocyte est le FGF23. Cette hormone peptidique est produite très majoritairement par les ostéocytes matures, et possède une expression relativement faible par le cerveau, le thymus, l'intestin grêle, les testicules, le cœur, le foie et les ganglions lymphatiques (25). Au niveau osseux, la production de FGF23 est stimulée par le métabolite actif de la vitamine D, 1,25(OH)₂-Vitamine D ou calcitriol, et les apports en phosphate. Une fois sécrétée, via son action au niveau du rein, le FGF23 diminue la réabsorption rénale de phosphate, inhibe la production du calcitriol et stimule l'augmentation son catabolisme. Ceci permet de maintenir la phosphatémie dans des valeurs normales (figure 12). La surproduction de FGF23 induit entre autre une hypophosphatémie, et une déminéralisation osseuse. À l'opposé l'absence de FGF23 efficace s'accompagne d'une hyperphosphatémie avec hypercalcitriolémie et une hypercalcémie. Les effets du FGF23 sont médiés par son interaction avec ses récepteurs : FGFR (FGFR1, FGFR3, FGFR4) en présence d'une protéine Klotho. Klotho agit comme cofacteur essentiel à la fixation du FGF23 sur les FGFRs, et ce mécanisme d'action est spécifique à la signalisation FGF23 (26, 27). Klotho est principalement exprimée dans le rein, le muscle, le cerveau et la glande parathyroïde. Au niveau de cette dernière, le FGF23 induit une diminution de la sécrétion de PTH, hormone essentielle dans l'ostéogenèse. L'expression FGF23/Klotho est modifiée en particulier au cours de l'insuffisance rénale.

La fonction endocrine de l'ostéocyte est donc absolument vitale pour le maintien de l'homéostasie phosphocalcique de l'organisme. Elle l'est plus particulièrement dans la régulation des mécanismes de formation du tissu osseux au cours de son développement, et tout au long de la vie humaine.

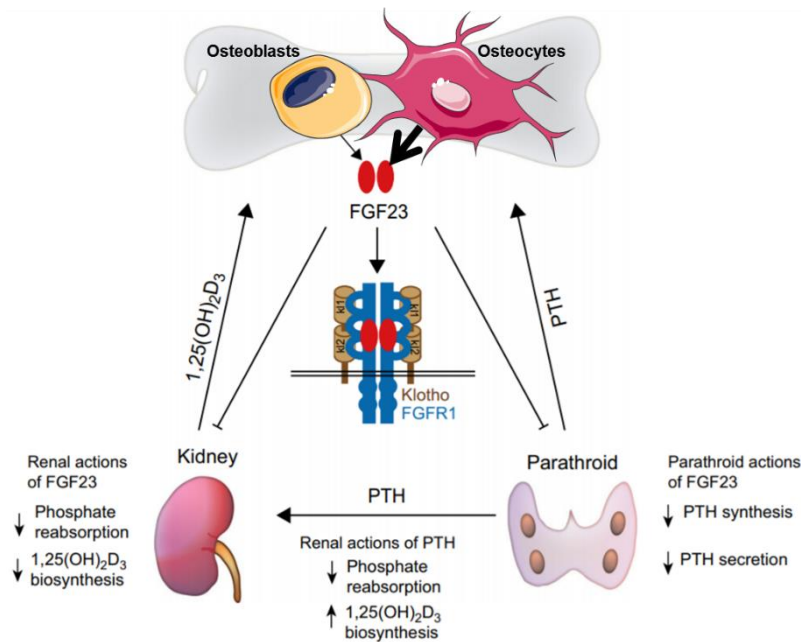


Figure 12 : Le FGF23 d'origine osseuse régule le métabolisme du phosphate. Le FGF23, synthétisé par les ostéoblastes et les ostéocytes, inhibe la réabsorption du phosphate et supprime la production de 1,25 (OH) 2D3 par sa liaison au complexe récepteur FGFR1 et Klotho dans le rein. Le FGF23 supprime également la synthèse et la sécrétion de PTH de manière dépendante de Klotho dans la parathyroïde. La synthèse et la sécrétion de FGF23 par les ostéoblastes et les ostéocytes sont régulés positivement par la 1,25 (OH)₂ Vit D et la PTH. Figure adaptée à partir de la référence (117).

1.3 Les mécanismes cellulaires de l'ostéogenèse

Le développement osseux chez l'homme et les mammifères est un processus complexe composé de phases séquentielles de morphogenèse et de croissance. Le squelette embryonnaire est formé dans un premier temps et le squelette adulte dans un second temps. Deux types d'ossification, membranaire et endochondrale contribuent à son développement (118–120). Le point de départ de ces deux types d'ossification est la condensation à partir de progéniteurs mésenchymateux. Ceux-ci sont à l'origine de la formation du tissu osseux avec trois origines embryologiques différentes : les crêtes neurales, les somites et les plaques latérales du mésoderme (121,122) (figure 1). Ces progéniteurs communs aux ostéoblastes et aux chondrocytes sont parfois appelés progéniteurs ostéochondraux (121,123).

1.3.1 L'ossification membranaire

Cette ossification concerne essentiellement les os plats de la calvaria ainsi que la partie distale de la clavicule (122). Elle débute par la condensation de tissus mésenchymateux. Les cellules mésenchymateuses vont se différencier directement en ostéoblastes produisant la matrice osseuse. Ensuite l'ossification va progresser de proche en proche à partir du centre avec la formation d'un réseau de travées osseuses qui donnent un aspect spongieux à l'os. Cet os fibreux sera ensuite totalement résorbé et remplacé par de l'os lamellaire. Le tissu conjonctif qui entoure l'os spongieux se transforme en périoste. Chez l'adulte, sa face profonde élaborera des lamelles de tissu osseux compact qui formeront les tables externes et internes de l'os. L'ossification membranaire a été associée à l'expression de marqueurs de l'ostéogénèse comme des facteurs de transcription pour le collagène de type I, l'ostéopontine, la BSP, l'ostéocalcine, les BMPs et des cytokines pro-inflammatoires TNF α (Tumor Necrosis Factor α) et l'interleukine (IL)-1 α . Le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) est présent de façon précoce dans l'os membranaire (122,124,125).

1.3.2 L'ossification endochondrale

Le processus d'ossification endochondrale concerne la majorité des os. Il est responsable de la croissance en longueur des os longs mais aussi des vertèbres et des os de la base du crâne. Il repose sur la formation d'une matrice cartilagineuse appelée plaque de croissance, qui sera remplacée progressivement pendant le développement fœtal et après la naissance par de l'os (figure 13). Ces matrices cartilagineuses sont issues de la condensation de cellules mésenchymateuses qui se différencient ensuite en chondrocytes et sécrèteront les composants de la matrice extracellulaire du cartilage (126). Cette différenciation est sous la dépendance du gène Sox9, codant pour un facteur de transcription dont les mutations sont responsables en pathologie de la dysplasie campomélique, qui comporte des os courts et incurvés. La plaque de croissance y est de taille réduite avec une expansion de la zone hypertrophique et une minéralisation prématurée (127–129). Le déficit total de Sox9 empêche les condensations mésenchymateuses (130). Sa délétion à des stades plus tardifs, diminue la prolifération des chondrocytes.

CHAPITRE I : REVUE DE LITTÉRATURE SUR LE DÉVELOPPEMENT OSSEUX ET L'OSTÉOGENÈSE

L'ossification endochondrale comporte deux mécanismes : le premier est la destruction du cartilage initial évoqué ci-dessus, et le second son remplacement par de l'os.

Le cartilage initial est envahi dans son centre puis à chaque extrémité de l'os par des cellules qui vont constituer des centres d'ossification primaire et secondaire. Ces centres d'ossification s'étendent progressivement au reste du cartilage et finissent par le remplacer complètement sauf au niveau des surfaces articulaires (122,126) (figure 13).

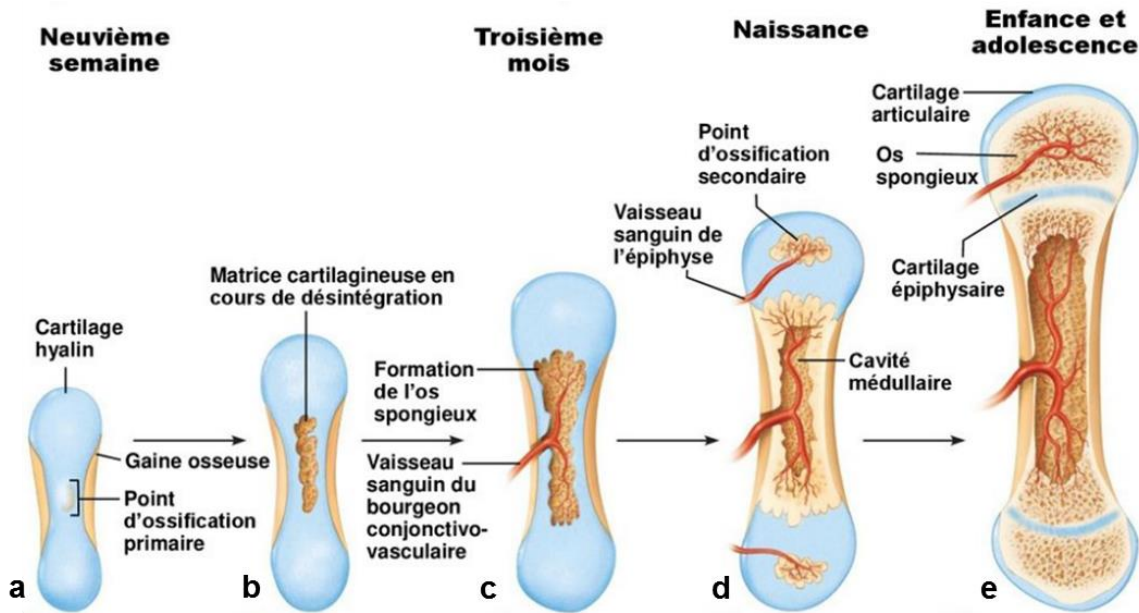


Figure 13 : Ossification endochondrale dans un os long. a) Formation d'une gaine osseuse autour du modèle de cartilage hyalin. b) Calcification du cartilage situé au centre de la diaphyse et formation de cavités. c) Invasion des cavités internes par le bourgeon conjonctivo-vasculaire et début de la formation de l'os spongieux. d) Allongement de la diaphyse et formation de la cavité médullaire pendant l'ossification ; apparition de points d'ossification secondaires dans les épiphyses en prévision du stade e. e) Ossification des épiphyses ; à la fin de ce stade, il ne reste du cartilage hyalin que dans les cartilages épiphysaires et dans les cartilages articulaires. Figure adaptée de Anatomie et Physiologie humaine, chapitre 6, 5^{ème} édition.

Au niveau de ces centres d'ossification va se mettre en place une structure de différenciation organisée en colonnes dans laquelle les chondrocytes prolifèrent puis s'hypertrophient et involuent par apoptose. La prolifération des chondrocytes est une étape extrêmement importante dans le développement du tissu, car elle permet de fournir un pool de cellules suffisant, qui va ensuite se différencier et produire de la matrice. La prolifération et l'hypertrophie des chondrocytes sont principalement régulées par le facteur Ihh (Indian

hedgehog). L'Ihh est synthétisé par les chondrocytes qui quittent le stade prolifératif, aux premiers stades de l'hypertrophie. Il lie un récepteur membranaire Patched-1 (Ptc-1) qui active Smoothened (Smo) une protéine membranaire entraînant une cascade d'activation de gènes. Le déficit d'Ihh ou de Smo induit un défaut de prolifération chondrocytaire et une augmentation de la fraction hypertrophique, les chondrocytes quittant prématurément le pool prolifératif (131). La production de l'Ihh est régulée par un autre facteur, le PTHrP (Parathyroid Hormone related peptide), une protéine synthétisée par les chondrocytes prolifératifs. Nous reviendrons sur le PTHrP plus loin. Au niveau des chondrocytes hypertrophiques, la matrice cartilagineuse est envahie par un réseau vasculaire progressivement remplacé par le front d'ossification (118) (figure 14).

L'apoptose des chondrocytes hypertrophiques conduit à leur remplacement par des progéniteurs ostéoblastiques et à l'élaboration du tissu osseux trabéculaire au sein d'une matrice osseuse progressivement calcifiée. Le chondrocyte hypertrophique, organisateur de l'ossification endochondrale, envoie lors de son apoptose des signaux aux cellules du front d'ossification en produisant divers facteurs de croissance. La production de VEGF par les chondrocytes hypertrophiques contribue notamment à l'envahissement vasculaire de cette zone, à l'activité chondroclastique et au recrutement de progéniteurs ostéoblastiques du périoste à la périphérie externe de l'os au niveau des épiphyses (126,130,132). La différenciation chondrocytaire est le véritable moteur de l'ossification endochondrale et de ce fait, de la croissance des os longs (figure 14).

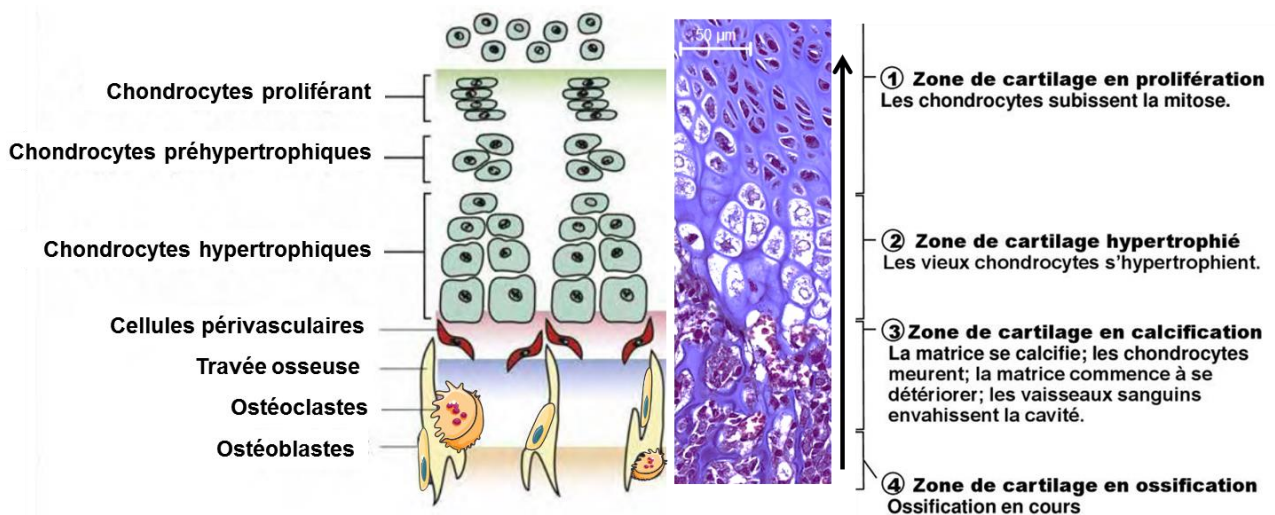


Figure 14 : Structure de la plaque de croissance. La plaque de croissance est une structure dynamique avec une zone de prolifération chondrocytaire, une zone occupée par les chondrocytes différenciés, une zone de cartilage en calcification, envahie par le réseau vasculaire et remplacé par une zone d'ossification. L'image histologique

CHAPITRE I : REVUE DE LITTÉRATURE SUR LE DEVELOPPEMENT OSSEUX ET L'OSTEOGENESE

correspond à une coloration au trichrome de Masson réalisée sur une coupe de fémur de souris âgée de 4 semaines, et montrant la zone équivalente au schéma. La flèche indique le sens de croissance de l'os en longueur. Figure adaptée à partir de la référence (118)

En aval de l'ossification initiée par les chondrocytes de la plaque de croissance, la croissance de l'os se poursuit par l'action des cellules osseuses proprement dites. Aux extrémités diaphysaires de la plaque de croissance, les ostéoclastes et les ostéoblastes présents agissent en coopération étroite. Les ostéoclastes creusent dans la matrice cartilagineuse en calcification, des travées larges et profondes qui sont rapidement comblées par de la matrice osseuse (collagène de type I essentiellement) synthétisée par les cellules ostéoformatrices proprement dites c'est-à-dire les ostéoblastes. Ce processus actif est encore appelé modelage osseux.

1.3.3 Le modelage osseux

Au cours de la croissance, les os grandissent en longueur et en épaisseur, afin d'avoir une résistance suffisante aux contraintes mécaniques. Au niveau de l'os trabéculaire, il y a un accroissement à la fois de la masse et de la densité. Au niveau cortical, la densité varie peu, mais l'épaisseur augmente. Cette augmentation active de la masse osseuse est désignée par le terme de « modelage osseux ». Le terme de modelage désigne la formation d'un tissu osseux à un endroit qui n'en a jamais contenu. Il se fait par apposition osseuse au niveau du périoste, de façon dépendante du site squelettique. Cette apposition intense se fait de façon concomitante à une résorption osseuse (remodelage osseux) interne au niveau de l'endoste. Le modelage dépend donc de l'action coordonnée des ostéoblastes et des ostéoclastes, dont la synergie permet de façonner les os et d'éviter d'éventuelles malformations. Cependant, pendant le modelage, les ostéoblastes ont une activité largement supérieure à celle des ostéoclastes. Cette supériorité de la formation sur la dégradation garantit une acquisition de masse osseuse rapide et adéquate du squelette.

Lorsque l'activité des ostéoblastes est équivalente ou inférieure à celle des ostéoclastes, l'os est dit en état de remodelage. C'est le cas chez l'adulte jeune et chez les personnes âgées.

1.3.4 Le remodelage osseux

Le remodelage osseux est un processus intrinsèque au tissu osseux, cortical ou trabéculaire, à la fois pendant le modelage, et tout au long de la vie du squelette. Il permet d'assurer le renouvellement constant du tissu osseux en permettant la dégradation de la matrice ancienne par les ostéoclastes et son remplacement par une matrice neuve par les ostéoblastes. Ainsi, contrairement au modelage, l'os est formé sur du tissu osseux préexistant. Chez l'adulte, 10% du squelette sont renouvelés chaque année. Ce remaniement permet le maintien de l'intégrité structurale de l'os et d'éviter la dégénérescence excessive. Il permet aussi la réparation de microtraumatisme ou la mobilisation rapide de minéraux nécessaires à l'homéostasie de l'organisme. Le remodelage se déroule sur des sites appelés unités fonctionnelles de remodelage. Chez l'adulte sain, ce sont 3 à 4 millions d'unités fonctionnelles de remodelage qui naissent chaque année et environ 1 million de ces unités assurent le renouvellement osseux à différents sites du squelette à tout moment. Comme nous l'avons vu, pendant le modelage, le remodelage osseux est moins important, du fait de la supériorité de la formation sur la dégradation. Chez l'adulte, un cycle de remodelage dure environ 4 mois, et comprends deux principales phases : une phase de résorption et une phase de formation. Avant le remodelage, l'os est dans un état quiescent, avec les cellules bordantes apposées sur la surface de la matrice minéralisée. Pendant la phase de résorption, se déroule une première étape dite d'activation, initiée par l'action des ostéocytes. En effet, les ostéocytes sont en mesure de détecter différents signaux qui vont initier ce remodelage osseux, signaux qui sont liés soit à des microfractures ou lésions osseuses, soit à une action hormonale systémique. Ces signaux aboutissent à une apoptose des ostéocytes, suivie d'une libération locale par l'ostéocyte apoptotique du RANKL, cytokine indispensable au recrutement et à la différenciation des précurseurs ostéoclastiques en ostéoclastes matures capables de dégrader la matrice minéralisée. Ainsi, la matrice est résorbée telle que décrit plus haut, grâce à l'activité d'enzymes spécifiques. La résorption dure approximativement 12 jours et se termine par la mort par apoptose des ostéoclastes. Une fois les ostéoclastes disparus, des macrophages apparaissent au niveau de la lacune : c'est l'étape d'inversion (figure 15).

CHAPITRE I : REVUE DE LITTÉRATURE SUR LE DEVELOPPEMENT OSSEUX ET L'OSTEOGENESE

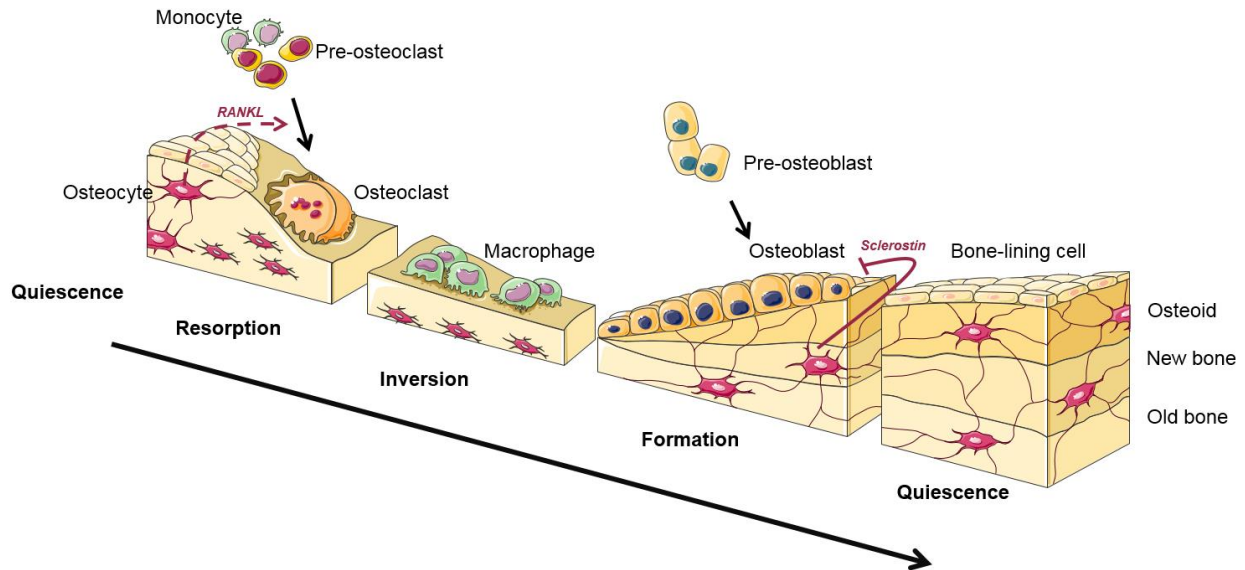


Figure 15 : Représentation schématique des quatre étapes du processus de remodelage osseux : phase de résorption, inversion, formation et quiescence.

Vient ensuite la phase de formation, pendant laquelle les macrophages apparus au niveau de la lacune disparaissent pour laisser place aux précurseurs ostéoblastiques provenant des CMSs présentes dans la moelle osseuse. Ces précurseurs sont attirés dans la lacune de résorption, prolifèrent rapidement et se différencient en ostéoblastes matures qui forment une nouvelle matrice collagénique non minéralisée, l'ostéoïde, qui est secondairement minéralisée. La phase de formation osseuse est plus longue et dure approximativement trois mois. Le processus de remodelage osseux est finement régulé dans les conditions physiologiques de façon à assurer une balance adéquate entre résorption et formation osseuse pendant les différents stades du développement, de l'enfance à l'âge adulte (133).

Ainsi, modelage et remodelage osseux doivent permettre de garantir une acquisition de masse osseuse suffisante chez l'enfant et un maintien de l'architecture et de la masse osseuse chez l'adulte. Tout dérèglement dans les processus de contrôle est susceptible d'induire des répercussions responsables de prise exagérée ou de perte de masse osseuse. En fin de croissance, la masse osseuse atteint un niveau maximal que l'on appelle le pic de masse osseuse.

1.3.5 L'Acquisition du pic de masse osseuse

Elle est possible grâce à une activité de formation osseuse très intense, et un remodelage osseux peu actif. La courbe de la croissance osseuse peut être découpée en plusieurs phases (figure 16). Une première phase de croissance osseuse rapide s'écoule de la naissance à 4 ans. Après un léger ralentissement, une deuxième phase se déroule pendant la puberté. Pendant cette deuxième phase, la croissance atteint un niveau très élevé de façon rapide qui correspond au pic de masse osseuse, et qui représente donc la valeur maximale de la masse osseuse atteinte au cours de la vie en un site squelettique donné. Cette valeur dépend non seulement de la croissance osseuse au cours de l'enfance et de la puberté, mais aussi de la consolidation osseuse chez l'adulte jeune. L'accélération de la croissance osseuse s'étend de 11 à 15 ans chez la fille et de 13 à 17 ans chez le garçon. Une part importante de la masse osseuse, de l'ordre de 25 %, est acquise durant les 2 années où la croissance est maximale. Les gains deviennent modestes au-delà de 18 ans, même si l'acquisition est possible jusque vers 30 ans. Pendant ces deux premières phases, c'est donc le processus du modelage qui est le plus actif (134).

Chez l'adulte jeune en situation non pathologique, la masse osseuse reste stationnaire, du fait d'un équilibre entre formation et dégradation, de façon à maintenir le capital osseux maximal acquis vers la fin de la deuxième décennie de vie. La masse osseuse acquise reste stable normalement pendant une trentaine d'années, par un remodelage équilibré. Enfin, le tissu osseux rentre dans une dernière phase dite de déclin, pendant laquelle la masse osseuse diminue lentement avec l'âge car la résorption devient progressivement plus importante que la formation ce qui résulte en un micro-déficit osseux à la fin de chaque cycle de remodelage. Il est maintenant prouvé que le pic de masse osseuse atteint en fin de croissance est un déterminant du risque futur d'ostéoporose et donc de fractures. Les individus qui atteignent un niveau élevé de masse osseuse en fin de croissance ont donc un avantage par rapport aux autres, parce qu'ils affrontent mieux les diminutions de la densité osseuse associées à des paramètres peu modifiables comme l'âge, les maladies, et à la réduction des hormones sexuelles, dans le cas de la ménopause par exemple.

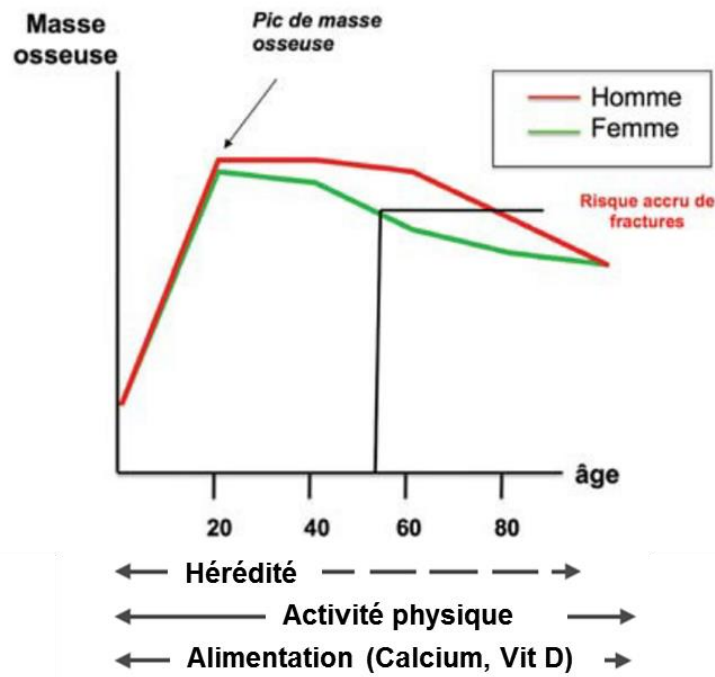


Figure 16 : Acquisition multifactorielle du pic de masse osseuse. Figure adaptée à partir des références (133,135)

L'acquisition du pic de masse osseuse est multifactorielle. Elle comporte des facteurs génétiques, expliquant 70 % de la variabilité des valeurs de densité minérale osseuse (DMO) observées dans une population, et des facteurs acquis. Un régime équilibré avec un apport protéino-calorique satisfaisant est nécessaire. Un apport suffisant en calcium, en vitamine D et en vitamine K, indispensable à la carboxylation de l'ostéocalcine, est requis. L'exercice physique est très étroitement corrélé au degré de DMO. Les œstrogènes ont également un rôle essentiel en stimulant d'abord la croissance des os longs puis l'involution des cartilages de croissance. Ils stimulent aussi l'apposition endocorticale responsable d'épaississement cortical et ceci de façon plus importante chez la fille que chez le garçon. Dans les sous-parties qui vont suivre, nous allons développer quelques facteurs biochimiques importants de la composante génétique.

1.4 Les facteurs influençant l'ostéogenèse et la masse osseuse

Différents facteurs biochimiques et hormonaux, sont impliqués dans le contrôle de l'ostéogenèse, grâce à leurs propriétés à réguler finement les processus d'ostéoblastogenèse et d'ostéocytogenèse. De nombreux facteurs de croissance à action locale peuvent intervenir en activant des signalisations spécifiques. Dans cette partie, je présenterai l'importance de la voie Wnt Bêta-caténine, le rôle des BMPs et des FGFs dans la régulation de l'ostéogenèse

Dans le deuxième chapitre, je développerai les facteurs hormonaux, activant des processus endocrines et paracrines essentiellement dépendants des RCPGs.

1.4.1 La Voie Wnt Bêta-caténine

Il existe deux voies de signalisation wnt, la voie canonique et la voie non canonique. La voie canonique est médiée par la β -caténine. En l'absence de stimulation Wnt, la β caténine cytoplasmique est phosphorylée par un complexe constitué par la glycogène synthase kinase-3 (GSK-3), l'adenomatous polyposis coli (APC) et l'axin. Elle est ensuite ubiquitinée et dégradée rapidement par le système protéasomique pour empêcher son accumulation cytoplasmique. En revanche, la stimulation Wnt supprime l'activité GSK-3 et induit l'accumulation cytoplasmique de β -caténine. La β -caténine accumulée se transloque vers le noyau où elle induit l'expression des gènes cibles tels que les facteurs de transcription de la famille Lymphoid Enhancer binding Factor (LEF) / T-cell Factor (TCF) par inactivation des co-répresseurs associés (136–141). L'activation de la signalisation Wnt est déterminée par la combinaison des ligands wnt au récepteur Frizzled (FZD) et au co-récepteur transmembranaire LRP5/6.

Des ligands tels que Wnt5a et Wnt11 active les voies Wnt/ Ca^{2+} et Wnt/Planar Cell Polarity (PCP) sans induction de l'accumulation de la caténine intracellulaire. Cette dernière signalisation représente la voie non canonique de Wnt. Dans la voie Wnt / Ca^{2+} , la concentration intracellulaire accrue de Ca^{2+} active la protéine kinase II dépendante de la calmoduline (CaMK II) et la protéine kinase C (PKC). Dans la voie Wnt/PCP, de petites protéines G telles que Rac et Rho sont activées de sorte à induire la motilité et la polarité cellulaire (137–139,142).

La voie Wnt est essentielle à l'ostéogénèse (figure 18). En effet, des études à base de souris transgéniques ont rapporté que le ligand Wnt10b favorise l'acquisition de masse osseuse (143–145). D'autres études *in vitro* ont également révélé que Wnt6, Wnt10a et Wnt10b impliqués dans la voie canonique, étaient capables de supprimer la différenciation de cellules souches mésenchymateuses en adipocytes et de favoriser la réorientation de la différenciation vers la lignée ostéoblastique (145,146). De plus, les souris LRP5 KO (LRP5-KO) présentaient une déficience en ostéoblastes et une diminution de la masse osseuse (147).

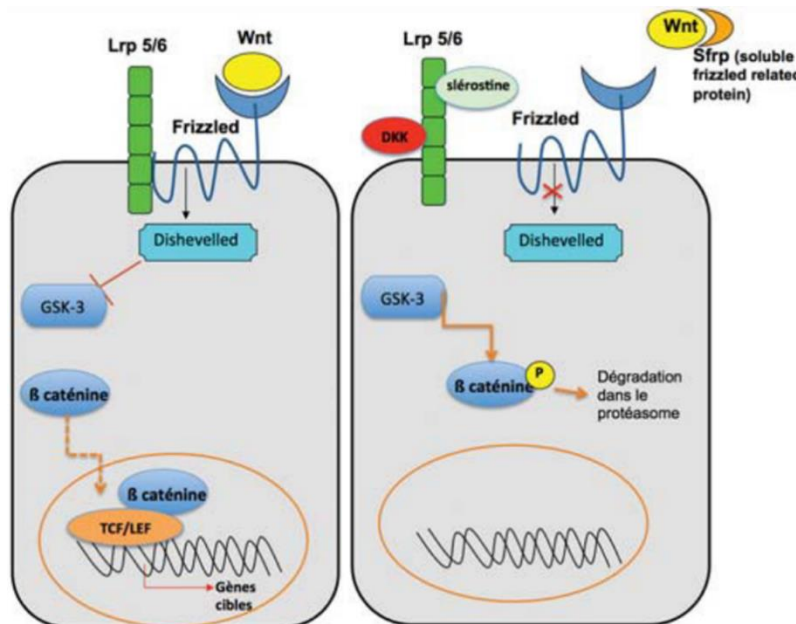


Figure 17 : Activation et inactivation de la voie canonique Wnt/β-caténine dans l'ostéoblaste. La sclérostine et Dkk1 empêchent la formation du complexe LRP5/6-Frizzled. Figure adaptée à partir de la référence (133).

Ces études ont entre autres permis de mieux comprendre l'importance de la voie Wnt dans les phases précoces de l'ostéogénèse, notamment dans l'ostéoblastogenèse. Par ailleurs, des effets sur l'ostéoclastogenèse ont été rapportés. Il a été montré dans plusieurs travaux que l'activation de la signalisation canonique Wnt dans les cellules de la lignée des ostéoblastes améliore l'expression l'OPG et inhibe la différenciation des ostéoclastes (137,138,148–152). De plus, les souris conditionnellement invalidées pour la caténine dans les précurseurs de l'ostéoclaste présentent une ostéopénie due à une différenciation accrue des ostéoclastes. Ces résultats indiquent donc que l'activation de la voie de signalisation canonique Wnt dans les précurseurs ostéoclastiques, supprime l'ostéoclastogenèse de manière indépendante de l'OPG.

De façon plus intéressante encore, une diminution de la masse osseuse a été rapportée chez les souris conditionnellement invalidées pour LRP5 dans les ostéocytes, ce qui a permis de bien mettre en évidence l'importance de LRP5 dans le maintien de la masse osseuse via les ostéocytes (153). D'autres études ont permis d'aller plus loin, en mettant en exergue l'implication de wnt dans la transmission des signaux de charge mécanique des ostéocytes aux cellules bordantes (154). La voie wnt a également été rapportée pour inhiber l'apoptose des ostéocytes induite par les glucocorticoïdes (155).

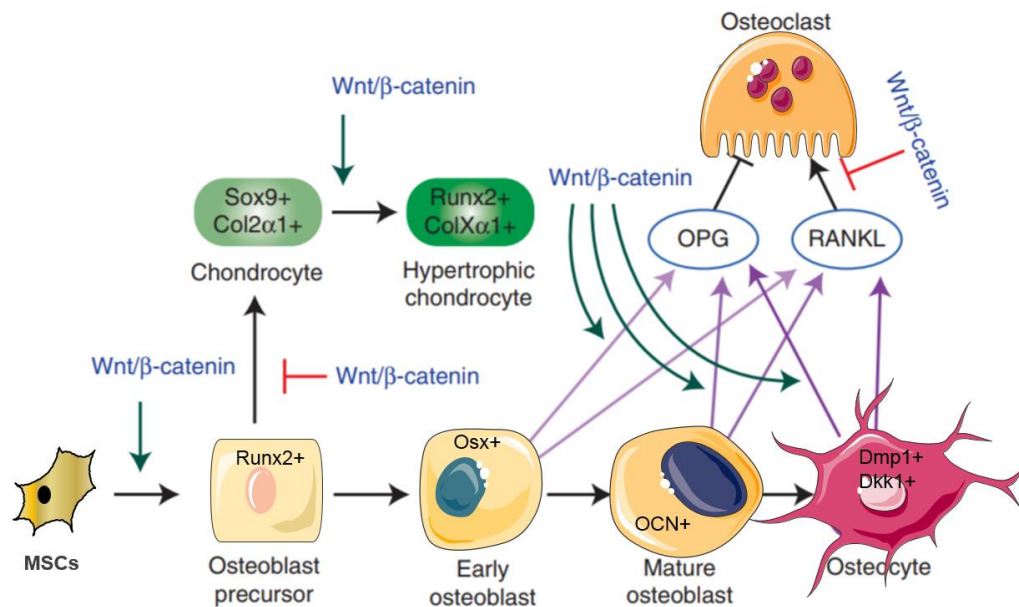


Figure 18 : Schéma montrant les effets (vert pour l'activation et rouge pour l'inhibition) de la signalisation Wnt/ β -caténine sur les l'ostéoblastogenèse et l'ostéoclastogenèse. Figure adaptée à partir de la référence (156)

Nous avons évoqué plus haut le rôle crucial de la sclérostine et de Dkk1 qui inhibent la signalisation Wnt dans les ostéocytes (figure 17). Plusieurs effecteurs ostéocytaires de wnt ont également été rapportés tels que E11, PHEX, MEPE et DMP1 (157–159). La combinaison de tous ces éléments montre que la voie wnt β -caténine joue un rôle important, non seulement dans l'ostéoblastogenèse et dans l'ostéoclastogenèse, mais également dans la viabilité et la fonction mécanique des ostéocytes, et donc dans l'intégrité du tissu osseux.

1.4.2 Les protéines morphogénétiques osseuses (BMPs)

Les BMPs ont été découvertes en 1965 par Urist (160). Ce sont des facteurs de croissance appartenant à la famille des TGF β , et impliqués dans plusieurs processus biologiques tels que la morphogenèse, le lignage cellulaire, la différenciation, la prolifération et le contrôle de l'apoptose dans divers tissus. Le rôle des BMPs a en premier été mis en évidence dans le développement du squelette, avec des travaux décrivant largement leur implication à la fois dans l'ossification membranaire et dans l'ossification endochondrale (161). En effet, certains BMPs stimulent la formation des structures craniofaciales, ainsi que la prolifération et la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en chondrocytes et en ostéoblastes. Ainsi, les BMP-2, BMP-4, BMP-6, et BMP-7 se sont avérés induire la formation de tissus osseux et cartilagineux *in vivo* (162–165). La BMP-7 est exprimée par les chondrocytes prolifératifs et les BMP-2 et –6 par les chondrocytes hypertrophiques (166–171). Des données *in vitro* ont par ailleurs rapporté que les BMP-2, BMP-6 et BMP-9 sont capables d'induire une différenciation ostéoblastique dans des cellules progénitrices mésenchymateuses en stimulant l'activité de la phosphatase alcaline et l'expression de l'ostéocalcine (172).

L'activité biologique des BMP est induite par leur liaison à des récepteurs membranaires de type sérine-thréonine kinase de type I et II (figure). Ces récepteurs une fois activés, se dimérisent et phosphorylent des protéines intracellulaires appelées Smad et MAD. Une fois les Smad 1, 5, 8 phosphorylées dits R-Smad, elles interagissent avec la Smad4 ou Co-Smad. Ce complexe est ensuite transféré au noyau pour activer la transcription et l'expression de gènes cibles comme des facteurs de croissance tels que Shh qui favorise la prolifération chondrocytaire. D'autres facteurs de différenciation peuvent être stimulés, comme le collagène de type 1, la phosphatase alcaline, l'ostéopontine ou la sialoprotéine osseuse (173–176). Les BMPs peuvent aussi activer d'autres voies de signalisation Smad indépendante comme la voie Ras/MAPK. L'activation de cette voie dans les ostéoblastes humains conduit à la régulation spécifique de BMP-2 (43).

1.4.3 Les facteurs de croissance des fibroblastes (FGFs)

Les Fibroblast Growth Factors (FGF) et leurs récepteurs (FGFR) sont des familles de protéines homologues essentielles dans le développement. Chez l'homme, la famille des FGFs comprend 22 ligands de signalisation qui, une fois sécrétés, sont capables de se lier et d'activer leurs récepteurs (177). On retrouve d'un côté les FGF1 à 14, FGF16 à 18, FGF20 et FGF22 qui sont des ligands sécrétés avec des propriétés de signalisation paracrine, se liant aux FGFRs en étroite association avec les protéoglycanes héparane sulfate (HSPG) de la MEC, qui leur servent de cofacteur. Ensuite, il y a le FGF19 (fgf15 chez les rongeurs), le FGF21 et le FGF23 dont nous avons déjà parlé, qui sont des molécules endocrines qui nécessitent l'intervention du co-récepteur Klotho pour activer les FGFR (177). Cinq récepteurs aux FGFs sont connus à ce jour, dont les quatre premiers (FGFR1 à 4) sont des récepteurs tyrosine kinase, le dernier (FGFR5) ne possédant pas de domaines intracellulaires tyrosine kinase (178). L'expression de ces récepteurs diffère suivant le stade et selon les tissus. Les ligands FGF9, FGF18, FGF2, FGF7 et les récepteurs FGFR1, FGFR2, et FGFR3 ont particulièrement été rapportés dans la régulation du développement du squelette. D'abord, au niveau de la plaque de croissance, on retrouve une très faible expression du FGFR2, une expression importante du FGFR3 dans les chondrocytes prolifératifs et hypertrophiques, puis une expression élevée du FGFR1 dans les chondrocytes hypertrophiques (179–184). Le FGFR3 exerce une régulation négative sur les chondrocytes de la plaque de croissance par une activation de STAT1, ERK1 / 2 et p38, qui conduit à une expression accrue de l'inhibiteur du cycle cellulaire p21^{Waf1/Cip1}, à l'activation de p107 et à une diminution de l'expression de SOX9. Cette cascade aboutit à la suppression de la prolifération, de la différenciation terminale ainsi que de la synthèse de matrice post mitotique des chondrocytes (177). Certaines mutations activatrices du gène du FGFR3 sont associées à l'achondroplasie, maladie autosomique dominante qui est la forme la plus fréquente de nanisme à membres courts. La sévérité est liée à l'impact fonctionnel de la mutation sur le cartilage de croissance (185). Dans des modèles de souris, de telles mutations diminuent la prolifération chondrocytaire et désorganisent la structure du cartilage de croissance, dont la taille (186). Les récepteurs FGFR1 et 2 quant à eux, surtout le FGFR1, semblent exercer une régulation positive sur les chondrocytes de la plaque de croissance, même si leurs effets sont encore mal connus. Les ligands FGF9 et FGF18 semblent être ceux impliqués dans les précédents effets positifs. En effet, il a été rapporté qu'aux premiers stades de développement de l'humérus et du fémur, les souris *Fgf9* ^{-/-} et

Fgf18 *-/-* présentent une diminution de la prolifération des chondrocytes, ainsi qu'une altération de la zone hypertrophique (187–190). Les souris *Fgf2* *-/-* ont été rapportées comme ne présentant pas d'anomalies majeures au niveau de la plaque de croissance (191).

Au niveau du tissu osseux, les FGFs semblent également jouer un rôle important aussi bien dans l'ostéoblastogenèse que dans l'ostéocytogenèse. En effet, plusieurs études ont montré que les FGFs modulent l'activité des cellules de la lignée ostéoblastique. Dans les cellules préostéoblastiques, l'activation de ERK 1/2 par la signalisation FGFR conduit principalement à une augmentation de la prolifération cellulaire (192). Dans les ostéoblastes matures, l'activation de ERK1/2 par FGF2 stimule l'expression et la stabilisation de RUNX2 (193–195). Le même effet a été rapporté pour le FGF18 dont l'action via FGFR1/FGFR2 stimule l'expression de Runx2 et la différenciation ostéoblastique dans des cellules préostéoblastiques murines (196).

De plus, dans une lignée cellulaire d'ostéocytes, il a été rapporté que le FGF2 stimule l'expression de Dmp1, un marqueur des ostéocytes également via l'activation de ERK 1/2. *In vivo*, l'expression de Dmp1 est réduite chez les souris déficientes en ERK1/ERK2, et ces souris présentent un défaut total d'ostéocytes (197). Récemment il a été démontré que le FGF2 stimule l'expression de E11 et favorise la formation de dendrites dans les cellules ostéoblastiques de la lignée MC3T3 et dans des ostéoblastes primaires. De même, le FGF2 a fortement activé les voies de signalisation ERK et PI3K/Akt. Les souris *fgf2* *-/-* ont présenté au niveau cortical une diminution significative de la longueur de leur dendrites ostéocytaires (198). Le FGF7 semble également être impliqué dans l'ostéocytogenèse. Une récente étude a montré que le FGF7 était le plus exprimé par rapport aux autres membres de la famille FGF, à la fois dans la lignée cellulaire ostéocytaire MLO-Y4 et dans le tissu osseux murin. Il y a été montré que le FGF7 pouvait induire une augmentation de l'expression de Cx43 dans les ostéocytes et favoriser les processus dendritiques ainsi que la formation de jonctions lacunaires entre les ostéocytes, en stimulant l'accumulation cytoplasmique et translocation nucléaire de la β -caténine (199).

Par ailleurs, les FGFs sont impliqués dans l'ostéoclastogenèse. FGF2 est connu pour stimuler la prolifération des précurseurs ostéoclastiques, et de stimuler via le FGFR1 l'activité des ostéoclastes matures par l'activation de MAPK (200–203). De même, le FGF18 favorise potentiellement l'ostéoclastogenèse par sa capacité à stimuler la production de RANKL et de la cyclooxygénase-2 dans les ostéoblastes (204). Une autre étude *in vitro* a montré que le

FGF6 augmentait la différenciation et l'activité de résorption dans des ostéoclastes humains, alors que le FGF8a inhibait l'ostéoclastogénèse (205).

L'ensemble de ces données montrent que le processus endochondrale est finement régulé et par différents facteurs dont la β -caténine, les BMPs, les FGFs et leurs récepteurs. L'interaction entre les différentes voies de signalisation activées par ces facteurs régule la prolifération, la différenciation et l'activité des cellules osseuses, au cours du déroulement des processus de chondrogenèse, ostéoblastogénèse, ostéocytogénèse et ostéoclastogénèse. L'intervention de ces facteurs se fait de façon différentielle selon l'espace (site de développement du tissu osseux) et le temps (stade de développement), en particulier en ce qui concerne la différenciation des cellules de la lignée ostéoblastique (figure 19).

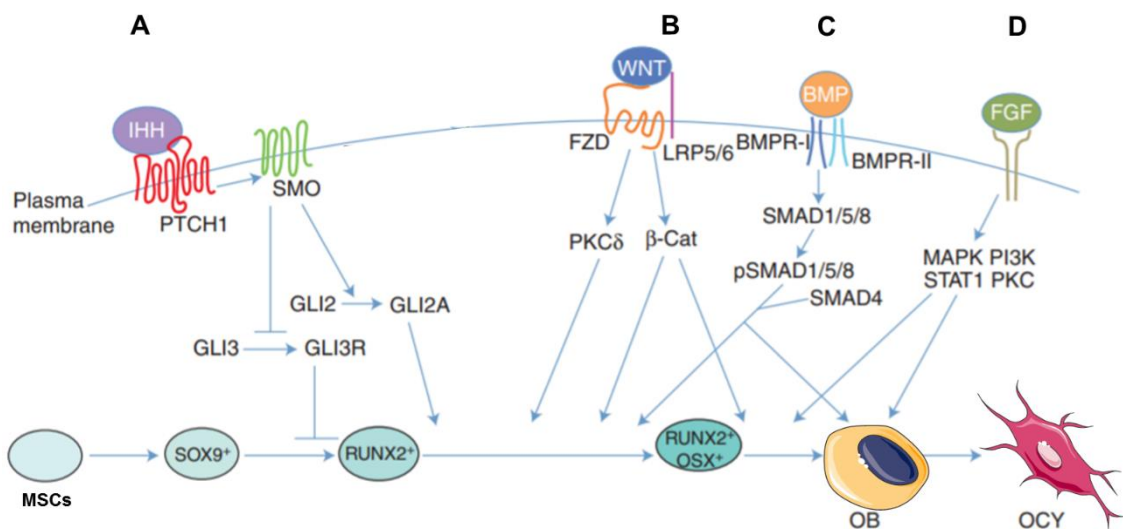


Figure 19 : Signaux extracellulaires régulant la différenciation des ostéoblastes (basés sur des études avec des modèles murins). (A) La signalisation IHH est nécessaire pour la différenciation des ostéoblastes (OB) pendant le développement osseux endochondral. La liaison de l'IHH au récepteur Patched homologue 1 (PTCH1) active la signalisation via Smoothed (SMO), inhibant ainsi le clivage protéolytique du répresseur GLI3 en GLI3R et favorisant l'activité de l'activateur GLI2 qui va stimuler RUNX2 et la progression du lignage vers des précurseurs ostéoblastiques. (B) La signalisation WNT favorise la différenciation des ostéoblastes soit via LRP5/6- Frizzled et la β -caténine, soit via la protéine kinase C δ (PKC δ), favorisant la progression vers le stade RUNX2 + OSX +. (C) La signalisation des protéines morphogénétiques osseuses (BMP) stimule la différenciation et la fonction des ostéoblastes. La Liaison de BMP2 ou BMP4 à leurs récepteurs entraînent la phosphorylation de SMAD1, SMAD5 ou SMAD8. Ceux-ci peuvent alors former un complexe avec leur partenaire, SMAD4, et pénétrer dans le noyau pour réguler l'expression génique, favorisant finalement la transition vers des cellules RUNX2 +/OSX + et l'amélioration de la fonction des ostéoblastes matures. (D) La signalisation des facteurs de croissance des

CHAPITRE I : REVUE DE LITTÉRATURE SUR LE DEVELOPPEMENT OSSEUX ET L'OSTEOGENESE

fibroblastes (FGFs) stimule la prolifération et la différenciation des préostéoblastes ainsi que l'activité des ostéoblastes matures. Elle favorise également la transition des ostéoblastes matures en ostéocytes (OCY). Figure adaptée à partir de la référence (206).

La particularité des différents facteurs que nous venons de voir, est qu'ils exercent un effet autocrine et/ou paracrine sur les différentes cellules au sein du tissu osseux. Cependant, la formation du squelette ainsi que le maintien de son homéostasie sont également soumis à une régulation endocrine très complexe. Plusieurs hormones et facteurs systémiques interviennent de façon coordonnée afin de garantir l'intégrité et les fonctions des tissus osseux au cours de la vie. Dans le prochain chapitre, nous allons nous intéresser à cette régulation endocrine en se focalisant sur le rôle particulier des voies de signalisations intracellulaires activées par les récepteurs couplés aux protéines G et leurs effets physiologiques.

2. Régulation endocrine et paracrine de l'ostéogénèse par les Récepteurs couplés aux protéines G: importance des voies Gi et Gs

Les RCPGs constituent une des plus grandes familles de protéines transmembranaires, présentes au niveau de la surface des cellules dans les organismes multicellulaires. Plus de 800 RCPGs humains distincts (environ 2% à 3% de tous les gènes humains) ont été identifiés avec des motifs structurels communs. Environ 150 RCPGs humains ont des fonctions encore inconnues avec des ligands inconnus et sont par conséquent appelés récepteurs orphelins. Ils ont une structure spécifique composée de sept domaines transmembranaires hydrophobes (hélices- α) traversant la membrane plasmique. Ces domaines sont séparés par des boucles intra et extracellulaires, le domaine aminoterminal se situant du côté extracellulaire, et le domaine C-terminal à l'intérieur de la cellule. Les ligands capables de se fixer aux RCPGs sont de diverses natures : ions, acides aminés, nucléotides, peptides, protéines (hormones, cytokines, neurotransmetteurs...), ou encore lipides (207). L'interaction entre les ligands et les récepteurs se fait dans le domaine de liaison extracellulaire constitué par la portion NH₂ terminale, les boucles extracellulaires et la poche formée à la surface de la membrane plasmique par les sept hélices assemblées. Les différentes conformations de ce domaine déterminent la spécificité du récepteur pour son ligand (208). La partie cytoplasmique des RCPGs possède une fente intracellulaire hautement dynamique où les partenaires de signalisation interagissent avec le récepteur. Trois familles de protéines à savoir les protéines G hétérotrimériques, les kinases (GRK) et les arrestines sont les principaux effecteurs de signalisation de la plupart des RCPGs. Le mécanisme de la transduction du signal induit par la liaison aux protéines G hétérotrimériques se déroule de la façon suivante : la liaison d'un agoniste au récepteur modifie sa configuration globale, ce qui engendre des changements dans les domaines intracellulaires (209,210). Ces changements permettent l'association spécifique du récepteur avec différentes protéines G hétérotrimériques. Celles-ci sont composées d'une sous-unité α interagissant avec un complexe $\beta\gamma$. Il s'en suit l'échange d'une molécule de GDP avec une molécule de GTP dans le site actif de la sous unité α , permettant alors la dissociation du complexe hétérotrimérique et l'interaction avec d'autres effecteurs intracellulaires ou membranaires. L'activité GTPase intrinsèque de la sous-unité α restaure ensuite une conformation inactive et l'affinité pour le complexe $\beta\gamma$ (208). Les différentes sous unités α

sont codées à partir d'au moins 17 gènes différents, et sont classées en 4 familles selon leur séquence : Gas, Gai / o (Gai1–3, GaoA, B, Gaz), Gaq (Gaq, Ga11, Ga14, 16) et Gα13 (Ga12, Ga13) (211,212). Une fois libre, elles peuvent activer différentes moléculaires effectrices comme l'adénylate cyclase. Le dimère $\beta\gamma$ est également capable d'activer des effecteurs tels que les canaux potassiques ou encore des phospholipases spécifiques. L'activité des RCPGs est impliquée dans de multiples processus physiologiques et/ou pathologiques comme le développement, la vision, le goût, l'odorat, le métabolisme, la neurotransmission, l'inflammation et la réponse immunitaire, la régulation du système nerveux autonome, le maintien de l'homéostasie cellulaire ainsi que la croissance tumorale et les métastases. Pour toutes ces raisons, les RCPGs sont à l'heure actuelle, les cibles pharmacologiques les plus importantes, représentant 12% de toutes les cibles médicamenteuses protéiques humaines. De plus, les effets thérapeutiques d'environ 34% des médicaments cliniquement utilisés de nos jours sont médiés par les RCPGs (213,214).

Au niveau du tissu osseux, plusieurs RCPGs sont exprimés, exerçant une régulation endocrine et paracrine sur le modelage et le remodelage osseux. Ils sont notamment impliqués dans le contrôle de la prolifération, la différenciation et l'apoptose des ostéoblastes et des ostéoclastes, via les protéines G et de nombreuses kinases (PKA, PKC, MAPK...) qui régulent activement la progression du cycle cellulaire et l'expression de protéines spécifiques (215,216). Ainsi, des mutations ou dysfonctionnements de plusieurs RCPGs ont été associés à des anomalies osseuses humaines, anomalies validées pour la plupart dans des modèles animaux. Par exemple, la délétion des récepteurs *A1r* (adenosine receptors 1), *Cnr1* (neuronal cannabinoid receptor CB1), *EP1* (PGE2 receptor 1), *Mc1r* (Melanocortin 1 receptor), a provoqué une augmentation de la masse osseuse et de la DMO (216). Par ailleurs, la délétion des récepteurs *A2ar*, *A2br*, *Adrb1*, *Htr2*, a induit une diminution importante de la masse osseuse (216). De même, des mutations du gène MC4R (melanocortin 4 receptor) ont été associées chez l'homme à une augmentation de la DMO, tandis que des mutations du gène codant pour ADRB2 (Beta-2 adrenergic receptor) ont été associées à une fragilité osseuse avec augmentation du risque de fracture (216). À l'évidence, la complexité des couplages mis en jeu par les RCPGs, est à prendre en compte pour mieux comprendre leurs effets. Certains couplages ont été beaucoup étudiés. Ainsi, l'activation de la voie Gs a été rapportée comme étant associée à une stimulation de la formation osseuse tandis que la voie Gi induirait une diminution de la formation osseuse trabéculaire (217,218).

Une balance entre les voies Gs et Gi, a été également suspectée comme pouvant être déterminante selon les stades du développement, sans qu'aucun couple ligand récepteur n'ait été clairement mis en jeu. Cela représente l'une des hypothèses majeures restant encore non élucidées. De plus, certains récepteurs agissent via ces deux voies de signalisation. Cette redondance des signalisations en aval, ajoutée à la grande variété des différents RCPGs exprimés par les cellules osseuses, et ce de façon différentielle, complexifient d'avantage la compréhension de leurs effets.

Dans la suite de cette partie, je développerai particulièrement la régulation par la PTH qui est considérée comme étant le principal agoniste de la signalisation Gs dans l'os via son récepteur PTHR1, et trois autres hormones, dont les récepteurs ont montré un intérêt physiopathologique dans la signalisation Gi dans le tissu osseux : Ghréline, sérotonine et mélatonine. En effet, cette signalisation par Gi a été montrée comme étant résistante dans les ostéoblastes de patients AIS, une des thématiques abordées au laboratoire. L'AIS est le type le plus courant de scoliose qui affecte les adolescents âgés de 10 à 13 ans avec un taux de prévalence de 1 à 4% dans le monde (219). Elle est caractérisée par une déformation en trois dimensions de la colonne vertébrale et des malformations osseuses corticales. De cause inconnue, cette pathologie fait l'objet de plus en plus d'études, explorant en particulier les voies de signalisation dérégulées dans les ostéoblastes.

Le LPA sera abordé dans le chapitre suivant.

2.1. Importance de la PTH et de la signalisation PTH/PTHR1/AMPC

L'hormone parathyroïdienne (PTH) est un peptide de 84 acides aminés, qui est synthétisé dans les cellules des glandes parathyroïdes. Elle est essentielle pour le maintien de la concentration sérique de calcium dans des limites précises, grâce à son action sur les os, les reins, et indirectement sur le tractus gastro-intestinal. La PTH régule également le métabolisme du phosphore (220). Elle diminue dans le sérum les niveaux de phosphore par l'inhibition de la réabsorption des phosphates dans les tubules proximaux et distaux (220). La PTH est sécrétée par les cellules parathyroïdiennes de manière tonique, et pulsatile. Sa synthèse et sa sécrétion sont contrôlées par le récepteur du calcium (CaSR) exprimé au

niveau des membranes cellulaires parathyroïdiennes (221). A une moindre importance, la sécrétion de PTH peut également être stimulée par une augmentation des niveaux de phosphore (220). Il existe également un peptide désigné par PTHrP (parathyroid-hormone-related peptide ou protein). Le PTHrP est retrouvé dans de nombreux tissus du fœtus et de l'adulte tels que épithélia, tissus mésenchymateux. Il possède environ 60 % d'homologie avec les 13 premiers acides aminés de la PTH (8/13) et des similitudes de conformation de séquences. Seule la région aminoterminal est similaire, les régions carboxyterminale et intermédiaire ne présentant pas d'homologie. L'activité PTH-like est contenue dans les 34 premiers acides aminés. Les portions aminoterminal de la PTHrP et de la PTH ont donc des actions identiques par l'intermédiaire d'un récepteur commun PTH/PTHrP-R ou PTHR1 qui fixe la partie aminoterminal avec la même affinité. Cette fixation entraîne une élévation de la calcémie, en augmentant la résorption osseuse et en diminuant l'excrétion rénale du calcium. L'expression du PTHrP et du PTHR1 est extrêmement précoce et durable tout au long de la différenciation ostéoblastique, débutant dès le stade de cellules ostéoprogénitrices pour se renforcer jusqu'au stade d'ostéoblastes matures, cellules bordantes et même d'ostéocytes (220).

Une exposition continue à la PTH entraîne des effets cataboliques sur le squelette. Chez les sujets humains, cette activation ostéoclastique dû à l'excès de PTH et retrouvé dans l'hyperparathyroïdie primaire, caractérisée par la perte osseuse tant corticale qu'au niveau de l'os trabéculaire du squelette (222–226). Par contre, des traitements, de faibles doses et intermittents de PTH entraînent des effets ostéoanaboliques (227). Ce traitement est d'ailleurs utilisé en clinique pour la prise en charge de l'ostéoporose. Les mécanismes moléculaires de cet effet anabolique de la PTH intermittente ont été largement étudiés. Le récepteur PTHR1 est couplé à plusieurs voies de signalisation intracellulaires liées aux protéines G hétérotrimériques. La signalisation cellulaire en aval du PTHR1 dépend en grande partie de la voie anti-apoptotique dépendante de l'AMP cyclique (AMPC), et donc de la sous-unité G α s qui active l'adénylate cyclase (figure 20). L'activation de la cascade AMPC/PKA permet la phosphorylation et l'inactivation de la protéine pro-apoptotique Bad, et à l'inverse, la stimulation de la transcription Runx2-dépendante de gènes de survie comme Bcl-2. De plus, elle induit une régulation négative de l'inducteur d'apoptose CARP-1 (Cell Cycle and Apoptosis Regulatory Protein), ainsi qu'une augmentation de la réparation de l'ADN, et une augmentation de l'expression de l'ostéocalcine, de la phosphatase alcaline, du collagène de type I, (228–231). PTHR1 peut aussi activer les phospholipases via G α q/11, et

donc induire l'activité de la protéine kinase C dont l'action participe dans une moindre mesure aux effets intracellulaires de la PTH (232). La PTH augmente aussi le nombre d'ostéoblastes en phosphorylant le récepteur PPAR γ ce qui l'inactive et diminue donc l'engagement des progéniteurs multipotents vers la lignée adipocytaire au bénéfice de la lignée ostéoblastique. Enfin, la PTH peut stimuler indirectement la différenciation et la survie des ostéoblastes via la régulation de facteurs autocrines ou paracrines. Ainsi, via un mécanisme AMPc-dépendant, la PTH stimule la synthèse par les ostéoblastes d'IGF-1 et de FGF-2 qui favorisent la différenciation et la survie de ces cellules. La signalisation des BMPs a également été décrite comme médiateur de l'ostéogenèse induite par la PTH (233). Au niveau des ostéocytes, la signalisation PTH-AMPc induit une diminution de la production de sclérostine, favorisant ainsi la différenciation des ostéoblastes par la voie Wnt Bêta-caténine (126,234,235). Un mécanisme impliquant la famille des SIKs (Salt-inducible kinase) a d'ailleurs été démontré. En effet, l'expression de la sclérostine est connue pour être positivement régulée par le facteur de transcription Mef2c. Il a été rapporté qu'une histone désacétylase, HDAC4/5, interagit avec Mef2c pour supprimer l'expression de SOST (236). L'activité du HDAC4/5 s'est elle-même avérée être bloquée par un membre de la famille des SIKs, la HDAC4/5 kinase qui induit la phosphorylation de HDAC4/5, bloquant sa translocation nucléaire. Ainsi, la PTH, via le récepteur PTHR1 et via l'activation de l'AMPc et de la PKA, supprime l'activité de la HDAC4/5 kinase et favorise la déphosphorylation de HDAC4/5, améliorant ainsi sa translocation nucléaire. Cela aboutit au blocage du recrutement de Mef2c à la région ECR5 du gène SOST et donc à une suppression de l'expression de la sclérostine (236). Ce mécanisme est d'autant plus relevant que les souris Hdac5 KO présentent une expression élevée de SOST et une diminution de la masse osseuse (237–239). Par ailleurs, des études à base de cellules ostéoblastiques et de rats parathyroïdectomisés traités par perfusion de PTH pendant 1, 3, 6 et 24 heures ont montré que la PTH réduit aussi les niveaux d'ARNm de Dkk1 en fonction du temps, et induit une activation fonctionnelle de la voie canonique Wnt (240). La PTH régule donc positivement la voie Wnt par répression de ses inhibiteurs, ce qui aboutit donc à une stimulation massive de l'ostéoblastogenèse.

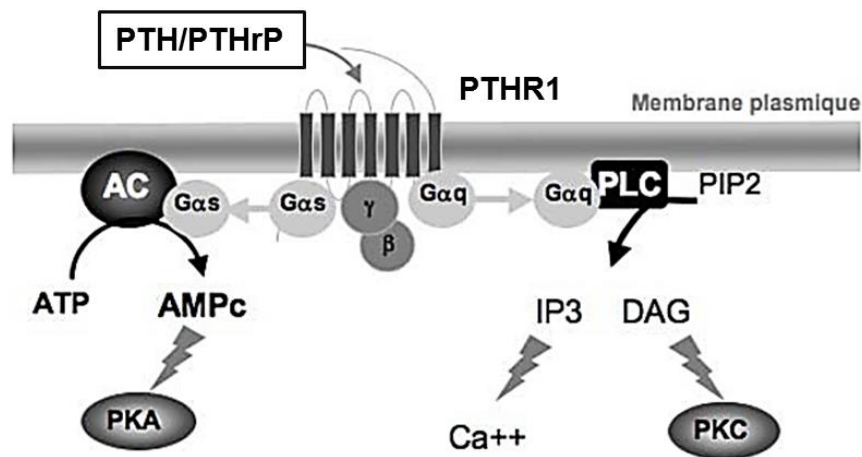


Figure 20. Signalisation intracellulaire suivant l'activation du récepteur PTH1R.

En dehors de cette action ostéoanabolique, l'administration intermittente de PTH entraîne une augmentation transitoire de l'expression de RANK-L ostéoblastique, tout en inhibant l'expression de l'OPG, conduisant ainsi à une augmentation de la résorption osseuse et à une mobilisation du calcium à partir du squelette (220). L'action prorésorbante de la PTH est donc indirecte car elle se fixe sur son récepteur présent au niveau des ostéoblastes et non des ostéoclastes. Des facteurs de croissance ostéoblastogéniques emprisonnés dans la matrice osseuse peuvent être ainsi libérés et contribuer à l'anabolisme osseux.

En revanche, la perfusion continue de PTH, provoquent dans les ostéoblastes une trop forte augmentation du rapport RANKL / OPG, et par conséquent, une ostéoclastogenèse et une résorption osseuse exagérée (241–243). Des études *in vitro* rapportent que les effets de la PTH continue, sont médiés par une augmentation du gène *Tnfsf11* codant pour RANKL, également par suractivation de la voie AMPc / PKA et le facteur CREB (244,245). Des études récentes ont montré que la PTH stimule également la production de RANKL dans les ostéocytes (246–249). De plus, les souris invalidées pour le RANKL spécifiquement dans les ostéocytes présentent une résorption osseuse moins importante lorsqu'elles subissent une hyperparathyroïdie secondaire induite par carence alimentaire en calcium (250). Cependant, ces effets délétères de la PTH continue, peuvent aussi directement impacter les fonctions ostéoblastiques. En effet, Les mutations somatiques activatrices de *GNAS*, qui peuvent exister au niveau des lésions de dysplasies osseuses, par exemple dans le cas de syndromes de Mac Cune Albright, sont responsables d'un blocage de la

différenciation ostéoblastique terminale avec un défaut de minéralisation (251). Les mêmes observations ont été rapportées dans des études *in vitro* et *in vivo*, suggérant l'importance globale et majeure de l'axe PTH/PTHrP-PTHR1-AMPc dans l'ostéogenèse.

2.2. Rôle de la sérotonine

La sérotonine ou encore la 5-hydrotryptamine (5-HT) est une bioamine synthétisée à partir de tryptophane dans le cerveau et l'intestin, respectivement par les neurones cérébraux et dans les cellules entérochromaffines du duodénum (252). Elle participe à la régulation de différentes fonctions allant de l'humeur à la motilité du tractus gastro-intestinal. L'identité fonctionnelle de la sérotonine dépend de son lieu de synthèse, car la sérotonine ne passe pas la barrière hémato-encéphalique.

La sérotonine cérébrale, synthétisée par des groupes de neurones, désignés B1-B9, et dont la production est régulée grâce à l'action du tryptophane hydroxylase 2 (TPH2), joue principalement le rôle de neurotransmetteur et est impliquée dans les fonctions cognitives. Elle a aussi un effet positif sur la croissance osseuse. Cette capacité a été rapportée grâce à l'utilisation des souris jeunes invalidées pour son gène *Tph2*^{-/-}, qui présentaient une faible masse osseuse et une diminution de la formation osseuse (253). Son action passe par l'intermédiaire d'un ou plusieurs de ses 14 récepteurs (dont 13 RCPGs) présents sur les membranes des cellules cibles. D'abord, au niveau cérébrale, la sérotonine stimule son récepteur 5-HT_{2C} au niveau des neurones hypothalamiques qui conduit à une diminution du tonus sympathique activé par la cascade de signalisation calmoduline kinase (CaMK) dépendante (253,254). Cela inhibe l'effet prorésorbant des récepteurs adrénergiques β 2 au niveau de l'os, en favorisant d'une part la prolifération des ostéoblastes et en inhibant d'autre part la prolifération et différenciation des ostéoclastes. L'action osseuse de la sérotonine cérébrale est régulée négativement par la leptine provenant des adipocytes (253,255,256). D'un autre côté, la sérotonine intestinale, qui représente 95% du total, a des fonctions de type hormonal encore peu connues. Cette sérotonine est libérée dans la circulation générale où la majorité est prise en charge par les plaquettes via un transporteur spécifique. Cependant, une petite fraction reste libre dans le sérum et peut agir comme une hormone au niveau des cellules cibles. Elle a des propriétés inhibitrices sur l'ostéogenèse, médiées au niveau des ostéoblastes par l'activation de son récepteur 5-HT_{1B}. L'absence d'un seul des deux allèles de ce récepteur, entraîne une augmentation du nombre d'ostéoblaste avec un

taux de formation osseuse et une masse osseuse plus élevée (257). Le mécanisme induit par le récepteur 5-HT_{1B} est particulièrement intéressant, car il s'agit d'un RCPG lié à une protéine Gαi qui inhibe la production d'AMPc et donc les phosphorylations dépendantes de PKA. Cette inhibition de la PKA inhibe l'activation de CREB, et par conséquent l'action du facteur de transcription FOXO1, bloquant la prolifération des ostéoblastes via notamment la régulation de l'expression de la Cycline D1, mais aussi des autres effecteurs de la PKA. Des niveaux élevés de sérotonine circulante sont associés à une diminution de l'association de FOXO1 avec CREB, et cela conduit à une inhibition de la formation osseuse (258). De façon encore plus intéressante, les personnes prenant chroniquement des inhibiteurs synthétiques de la recapture de la sérotonine (antidépresseurs), une classe de médicaments augmentant la concentration extracellulaire de sérotonine dans tout le corps, peuvent subir une réduction de leur masse osseuse (259). De plus, d'autres études ont pu montrer que l'administration de LP533401, un inhibiteur de la synthèse de la sérotonine duodénal, induit une amélioration significative de l'ostéoporose avec une efficacité semblable à celle de la PTH dans des modèles de souris et de rats ovariectomisés, soulignant ainsi un intérêt potentiel dans le traitement anabolique de l'ostéoporose (260,261).

2.3. Rôle de la ghréline

La ghréline est une hormone peptidique sécrétée majoritairement par les cellules X/A de l'épithélium gastrique fundique. Elle est produite dans une très faible mesure par les cellules X/A de l'intestin grêle, l'hypothalamus, l'hypophyse, les surrénales, la thyroïde, les poumons, le système veineux. La ghréline circule sous deux formes, la forme acylée et la ghréline non acylée, toutes 2 présentes dans le plasma humain et actives biologiquement, avec des effets similaires ou opposés selon les fonctions considérées (262). Le terme « ghréline » est couramment utilisé pour la « ghréline acylée ». La ghréline est le ligand naturel du récepteur orphelin GHS-R1 (Growth Hormone Secretagogue - Receptor type 1) qui présente 2 variants : GHS-R1a et GHS-R1b. Le GHS-R1a est un RCPG contrairement au GHS-R1b qui est lui un récepteur tronqué à seulement 5 domaines transmembranaires (262). Le GHS-R1a, après liaison du ligand est capable d'activer de nombreuses voies de signalisation différentes selon les types cellulaires étudiés, à savoir Gq/PLC, AMPc/PKA, les cascades de MAPK, PI3-K/Akt (262). Il est également capable d'induire des signaux sans liaison du ligand, ce qui lui confère une activité basale intrinsèque. De nombreuses études

ont montré l'effet de la ghréline sur la physiologie osseuse. En effet, la ghréline est connue pour réguler négativement l'ostéoblastogenèse en diminuant la différenciation des cellules souches mésenchymateuses vers la lignée ostéoblastique, tout en stimulant l'adipogenèse (263). Pendant les phases précoces, la ghréline induit de façon dose-dépendante une baisse de l'activité PAL et de l'expression des marqueurs ostéogéniques tels que Osterix et le collagène de type I dans les cellules C3H10T1/2 (263). De même la ghréline semble jouer un rôle dans les chondrocytes. En effet, il a été rapporté chez la souris, le rat et l'homme que la ghréline est sécrétée et localisée dans les zones proliférative et hypertrophiques de la plaque de croissance, où elle inhibe l'activité métabolique cellulaire, stimule la production d'AMPc intracellulaire (264). De plus, l'ARNm de la ghréline a été détecté dans les lignées cellulaires de chondrocytes humains et murins (265). Ainsi, la ghréline produite par les chondrocytes pourrait réguler de façon autocrine/paracrine la croissance, même si les mécanismes impliqués sont encore insuffisamment élucidés. En revanche, plusieurs études ont montré que la ghréline était impliqué dans l'ostéoblastogenèse. La majorité des études *in vitro* rapportent un effet stimulant sur la prolifération des ostéoblastes et leur différenciation, ainsi qu'une inhibition de l'apoptose (266). Cependant, les effets de la ghréline pourraient fortement dépendre des modèles cellulaires et des espèces étudiées, vu les données divergentes rapportées à ce sujet. Des études ont rapporté par RT-PCR et immunohistochimie, que les ostéoblastes de calvaria d'origine fœtale de rat exprimaient la ghréline, de même que l'ARNm de la ghréline a été retrouvé dans les ostéoblastes et des biopsies osseuses (267). Cela suggère donc l'idée d'une potentielle régulation auto/paracrine *in vivo* (266). Quoiqu'il en soit, la ghréline possède un effet anabolisant sur la masse osseuse d'autant plus que son administration à des rats normaux et nains a induit une augmentation la DMO fémorale (267). Un effet positif a été également rapporté sur la minéralisation, d'autant plus qu'il a été montré que le traitement à la ghréline stimule l'expression des marqueurs tels que la phosphatase alcaline, l'ostéocalcine et le collagène I (268). Le pouvoir prolifératif et ostéoinductif de la ghréline sur les ostéoblastes a été rapporté comme passant par une activation de MAPKs dont ERK et PI3K (266,269). L'implication des deux récepteurs GHS-R1a GHSR1ba été évoquée. Le GHS-R1a a été retrouvé au niveau des ostéoblastes de rat, et a été spécifiquement associé aux effets prolifératifs de la ghréline dans ces cellules (267). En revanche, en 2006, Delhanty et al. ont surtout associé les effets de la ghréline au récepteur GHSR1b (270). Grâce à des modèles de biopsies fémorales humaines et une lignée préostéoblastique humaine SV-HFO, ils ont pu démontrer que la ghréline mais aussi la ghréline non acylée stimulent la prolifération des

ostéoblastes en condition non différenciantes et différenciantes et cet effet prolifératif diminue avec le temps de culture et l'état de différenciation. Cet effet est supprimé par des inhibiteurs des kinases ERK (Extracellular-signal Regulated Kinase) et PI3K (Phosphoinositide-3 Kinase). De plus, les 2 formes de ghréline induisent la phosphorylation de ERK. Ainsi, Delhanty et al. ont conclu un effet stimulant de la ghréline et de la ghréline non acylée sur la prolifération des ostéoblastes humains par des voies de signalisation impliquant PI3K et MAPK, et ce en absence de GHS-R1a (270). Enfin, Wang et al. en 2009 ont également démontré un effet stimulant de la ghréline sur des cellules ostéoblastiques humaines (TE85) par une voie de signalisation impliquant le récepteur GHS-R1a, puis la cascade NO/GMPc (271).

Par ailleurs, la ghréline a été rapporté comme étant impliquée dans l'activité des ostéoclastes, même si très peu d'études existent sur le sujet. Ainsi, Costa et al. ont pu démontrer que la ghréline augmentait l'activité de résorption des ostéoclastes de rats (272). Ils n'ont cependant montré aucun effet stimulant sur l'ostéoclastogénèse et la résorption osseuse dans le modèle murin. D'autres données montrent même un effet inhibiteur local de la ghréline sur la différenciation des précurseurs ostéoclastiques murins (273). De plus, les souris invalidées pour le GHSR, présentent à 3 mois un nombre plus élevé d'ostéoclastes par rapport aux souris sauvages, et à l'âge de 6 mois ont une masse osseuse significativement diminuée.

2.4. Rôle de la mélatonine

La mélatonine ou N-acétyl-5-méthoxytryptamine est une hormone découverte par Aaron Lerner en 1958, connue principalement pour son rôle de modulation des rythmes circadiens, mais qui a une multitude d'autres effets physiologiques (274). Chez les mammifères, elle est synthétisée très majoritairement dans les pinéaloctes de la glande pinéale (ou épiphyse), surtout la nuit (274). Il existe d'autres lieux de synthèse mineurs comme la rétine, l'intestin et la moelle osseuse (275). Physiologiquement, lorsque la nuit tombe, de la noradrénaline est libérée par les fibres terminales sympathiques, ce qui stimule le système récepteur adrénergique/adénylate cyclase dans les pinéaloctes, entraînant une augmentation de la concentration d'AMP cyclique intracellulaire puis une augmentation de la sécrétion de mélatonine. La mélatonine, sécrétée par la glande pinéale, peut servir d'horloge

circadienne dans tous les tissus périphériques, y compris l'os, où il participe au maintien de l'homéostasie du microenvironnement osseux (274,276,277). Au niveau de la moelle osseuse, la mélatonine synthétisée peut s'accumuler à des concentrations deux fois supérieures aux taux sanguins nocturnes, ce qui peut favoriser son action local au niveau des os. L'action de la mélatonine est médiée par l'activation de ses récepteurs MT1 et MT2, qui sont des RCPG pouvant activer les sous-unités Gai, Gas et Gq/11. Les récepteurs MT1 sont présents au niveau du noyau supra chiasmatique de l'hypothalamus qui contrôle la sécrétion rythmique de la mélatonine. MT1 et MT2 sont rencontrés chez l'homme également au niveau du cervelet, des cellules en bâtonnets de la rétine et des ganglions. Les récepteurs de la mélatonine ont également été isolés dans d'autres tissus et dans les cellules osseuses : chondrocytes, ostéoblastes et ostéoclastes (275,278). La régulation de l'homéostasie du tissu osseux par la mélatonine a été décrite à plusieurs niveaux, avec des mécanismes impliquant ou non ses récepteurs. D'abord, la mélatonine favorise la chondrogenèse. En effet, des études à partir de cellules mésenchymateuses ont rapporté que la mélatonine améliore la différenciation chondrocytaire, en favorisant l'augmentation de la synthèse des glycosaminoglycanes (aggrécan, collagène de type II et X), et l'expression de marqueurs chondrocytaires tels que SOX9 et BMP2 (278). Une implication des récepteurs MT1 et MT2 a été suggérée. De plus, la mélatonine est impliquée dans l'ostéoblastogenèse et dans l'activité des ostéoblastes. Elle favorise la survie, la prolifération et la migration des cellules souches mésenchymateuses en stimulant Bcl2 et l'expression du neuropeptide Y (NPY) et du récepteur NPY1R (279). La mélatonine stimule également la prolifération et la différenciation d'ostéoblastes humains, ce qui se traduit par une augmentation significative des marqueurs de différenciation osseuse comme la BSP, la phosphatase alcaline et le collagène I. Elle stimule également la formation de l'os cortical comme rapportée dans des études *in vivo* chez la souris (280). Au niveau de l'ostéoblastogenèse, le récepteur MT2 semble être le plus impliqué dans la signalisation de la mélatonine. En effet, les souris *Mt2*^{-/-} présentent une faible masse osseuse contrairement aux souris *Mt1*^{-/-} (276). De façon cohérente, les ostéoblastes issus des souris *Mt2*^{-/-} présentent un défaut de prolifération et de différenciation, ainsi que des capacités de minéralisation réduites par rapport aux souris sauvages. De plus, ces ostéoblastes perdent la sensibilité à la stimulation par la mélatonine. Aussi, Zaminy et al ont rapporté que la mélatonine améliore l'activité ALP dans la différenciation des cellules souches mésenchymateuses via la cascade de signalisation MT2 et MEK / ERK1/2 (281). D'autres études *in vivo* sur des souris femelles *Her2*^{neu} d'un an, traitées par la mélatonine ont pu montrer d'une part une augmentation de la densité minérale

osseuse, et d'autre part, une augmentation de pErk1/2 et de pErk5, une augmentation de l'expression de Runx2, de l'ostéoprotégérine, et du ratio OPG/RANKL dans les os (282). Ces différents mécanismes moléculaires ont été associés à une activité du récepteur MT2. Une autre étude plus édifiante encore a pu montrer l'intérêt majeur de l'activation de PKA et de PKC. En effet, il a été rapporté que la stimulation des cellules de type préostéoblastique C2C12 par la mélatonine, favorise la différenciation ostéoblastique en stimulant l'expression et la stabilisation d'Osterix. Cet effet était assuré par une stimulation de l'activité PKA et PKC dont le blocage avec des inhibiteurs spécifiques, abroge les effets de la mélatonine (283). Ces études montrent l'intérêt de la modulation de l'AMPc dans l'ostéogénèse. Par ailleurs, tout comme le récepteur MT2, des niveaux d'expression élevés du récepteur MT1 ont été rapportés dans plusieurs études, suggérant également une possible implication de ce dernier (284). Le récepteur MT1 quant à lui, a été associé à un couplage majoritaire à Gai pour une modulation à la baisse de la production d'AMPc et de l'activité PKA (285,286). Cette signalisation par Gai est d'autant plus intéressante que chez l'homme, elle a été mise en évidence dans les ostéoblastes. En effet, il a été montré que la mélatonine administrée dans le milieu de culture d'ostéoblastes primaires humains induit une inhibition de l'activité adénylate cyclase, stimulée au préalable par la forskoline, et cela se traduit par une baisse du taux intracellulaire d'AMPc d'environ 60 à 70 % (287).

Par ailleurs, la mélatonine régule négativement l'activité des ostéoclastes. D'abord, comme mentionné plus haut, elle favorise la sécrétion d'ostéoprotégérine et la diminution de l'expression de RANKL (288,289). Ensuite, il a été montré que la mélatonine était capable d'inhiber la résorption osseuse grâce à ses propriétés antioxydantes et anti-radicaux libres (290). De façon logique, l'administration orale quotidienne de la mélatonine favorise non seulement la formation osseuse, mais réduit la dégénérescence structurelle et fonctionnelle de l'os dans des modèles de rats ovariectomisés (276). Des données in vitro ont montré que le traitement à la mélatonine régule à la baisse l'expression de SMURF1 entraînant une baisse de l'ubiquitination et la dégradation induites par le TNF α , de la protéine SMAD1, conduisant ainsi à la stabilisation de l'axe BMP-SMAD1 dont l'activité favorise l'ostéogénèse (291). Cela souligne un potentiel effet intéressant de la mélatonine dans l'inhibition de la résorption osseuse médiée par le TNF α , observée dans l'ostéoporose liée à l'inflammation. D'autres données ont permis de compléter ces observations. Ainsi, plusieurs études ont démontré que la mélatonine a des effets protecteurs sur le tissu osseux chez l'homme, similaires à ceux observés chez les animaux. St Hilaire et al ont rapporté que de faibles niveaux de mélatonine surviennent chez les femmes préménopausées, en même temps que

CHAPITRE I : REVUE DE LITTÉRATURE SUR LE DÉVELOPPEMENT OSSEUX ET L'OSTEOGENESE

la résorption osseuse (292). Aussi, le traitement à la mélatonine pendant un an a augmenté d'une manière dose-dépendant la DMO au col fémoral chez des femmes ménopausées atteintes d'ostéopénie (293). Par ailleurs, on note une diminution progressive de la sécrétion de mélatonine avec l'âge (275).

En somme, l'ostéogénèse est finement régulée par des mécanismes impliquant des RCPGs et ce à diverses étapes des processus d'ostéoblastogénèse, d'ostéocytogénèse et d'ostéoclastogénèse. Le couplage Gs absolument essentiel à la prolifération des ostéoblastes et à leur activité, est non seulement insuffisant pour garantir une prise de masse osseuse adéquate, mais doit s'activer de façon intermittente. Par ailleurs, le couplage Gi semble également essentiel. Pour autant, la prévalence de l'un de ces couplages sur l'autre est encore loin d'être comprise. Il en est de même en ce qui concerne la prédominance des agonistes ainsi que de leur impact réel sur les différents stades du développement du tissu osseux. Une meilleure compréhension de ces signalisations fines pourraient permettre de découvrir de nouvelles cibles voire de nouvelles combinaisons thérapeutiques pour résoudre les problématiques de perte de masse osseuse ou de croissance osseuse anormale.

Enfin, certaines études récentes ont montré qu'un autre facteur, le LPA, pourrait jouer un rôle dans le développement osseux, en particulier par l'intermédiaire de son récepteur LPA1.

CHAPITRE II: REVUE DE LITTERATURE SUR L'ACIDE
LYSOPHOSPHATIDIQUE, UN MEDiateUR POTENTIEL
DANS LE CONTROLE DE L'OSTEOGENESE

1. L'Acide lysophosphatidique : médiateur potentiel dans le contrôle de l'ostéogénèse

1.1 Structure et Origine du LPA

L'acide lysophosphatidique (LPA) est un petit glycérophospholipide (masse molaire 430–480 Da), le plus simple phospholipide retrouvé dans la nature. Il est constitué d'un squelette glycérol-phosphate sur lequel est greffé un acide gras, en position 1 ou 2, par l'intermédiaire d'une liaison acyl, alkyl ou alkényl. Chez les mammifères, les espèces majoritaires de LPA retrouvées dans les liquides biologiques sont constituées d'acides gras à longue chaîne saturée ou insaturée LPA 18:0, 20:4, 16:0 et 18:1. Le terme LPA se réfère le plus souvent au 18 :1 oléoyl-LPA (1-acyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphate), une espèce majoritaire couramment utilisée en laboratoire (figure 21). Ces espèces majoritaires sont particulièrement abondantes dans le plasma (294). Les premières études portant sur le LPA, ont commencé principalement avec les travaux de Vogt au début des années 1960 (295), le décrivant comme étant doté de différentes activités biologiques telles que la contraction des cellules musculaires lisses, des effets vaso-actifs ou l'agrégation plaquettaire. Aujourd'hui, le LPA est considéré comme un phospholipide endogène bioactif. Il possède toutes les propriétés d'un facteur de croissance et joue notamment un rôle dans la prolifération cellulaire, la migration et l'apoptose (296–299)

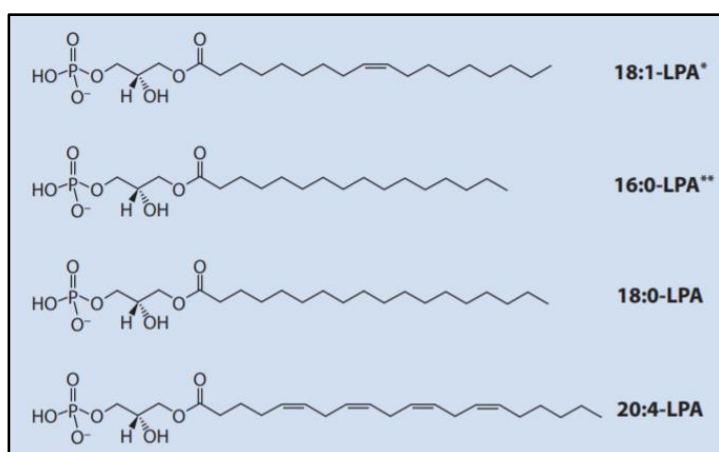


Figure 21. Structure du LPA, * 18:1-LPA est l'espèce le plus couramment utilisé comme réactif de laboratoire pour l'activation des récepteurs du LPA. ** 16:0-LPA est l'espèce la plus abondante dans le plasma humain. Figure adaptée à partir de la référence (294).

CHAPITRE II : REVUE DE LITTÉRATURE SUR L'ACIDE LYSOPHOSPHATIDIQUE, UN MÉDiateUR POTENTIEL DANS LE CONTRÔLE DE L'OSTÉOGENÈSE

1.2. Localisation du LPA

Le LPA est présent dans plusieurs liquides biologiques où il est maintenu en solution grâce à sa liaison avec l'albumine qui lui sert de véhicule. Les plaquettes sanguines sont la source la plus importante de LPA dans le corps, notamment lors de l'agrégation plaquettaire induite par la thrombine (2 à 20 μ M). Le LPA est également détecté dans le plasma à des concentrations de l'ordre de 0,1 μ M en absence d'agrégation plaquettaire (300). Il a d'ailleurs été montré que le blocage de la fonction plaquettaire chez l'animal entraîne une déplétion du LPA dans le sang (301). Des études ont pu montrer que les adipocytes humains produisent du LPA in vitro (302). Par ailleurs, les ostéoblastes sont capables de produire du LPA par implication du récepteur P2X7 (303). Le LPA a également été quantifié dans le tissu neural, le liquide céphalo-rachidien (LCR), liquide séminal, les urines et la salive (294,294,304). La production et/ou l'accumulation de LPA dans les fluides biologiques, est également associée aux contextes physiopathologiques, comme dans l'humeur aqueuse après une lésion cornéenne ou dans les liquides d'ascite de patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire (305). De plus, il a été montré que l'incubation de cellules métastatiques du cancer du sein avec des plaquettes humaines à 37 ° C induisent une agrégation plaquettaire et une production de LPA bioactif, favorisant les métastases cellulaires du cancer du sein (301). Aussi, des concentrations élevées de LPA sont trouvées dans le liquide synovial des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde mais pas chez les patients normaux (306). Dans l'ensemble, le LPA est produit et exerce de multiples activités biologiques dans des conditions physiologiques et pathologiques.

1.3. Métabolisme du LPA

Il existe deux principales voies de synthèse pour le LPA. La première voie consiste en un premier temps en la conversion en lysophospholipides de précurseurs de phospholipides (phosphatidylcholine, phosphatidylsérine ou phosphatidyléthanolamine). Les lysophospholipides obtenus par cette voie peuvent être la lysophosphatidylcholine (LPC), la lysophosphatidylsérine (LPS) ou la lysophosphatidyléthanolamine (LPE). Dans les plaquettes, cette conversion se produit par l'action de la phospholipase A1 spécifique des phosphatidylsérines (PS-PLA1) ou de la phospholipase sécrétoire A2 (sPLA2). Dans un second temps, les lysophospholipides (LPC, LPS ou LPE), surtout les LPC qui sont les plus abondants dans le plasma, sont convertis en LPA via l'activité d'une enzyme appelée

CHAPITRE II : REVUE DE LITTÉRATURE SUR L'ACIDE LYSOPHOSPHATIDIQUE, UN MÉDiateUR POTENTIEL DANS LE CONTRÔLE DE L'OSTÉOGENÈSE

autotaxine (ATX). L'ATX (ectonucleotide pyrophosphatase/PDE2 ou Enpp2), est une enzyme à activité de lysophospholipase D, glycosylée, sécrétée et également présente dans le sang (van Meeteren et al. 2006). L'ATX a une large expression tissulaire, avec des niveaux relativement élevés dans le sang, le cerveau, les reins et les organes lymphoïdes (307–309). Les souris (Enpp2 ^{-/-}) meurent au dixième jour du développement embryonnaire avec des défauts de développement vasculaire et neural (310). Les souris Enpp2 + ^{-/-} hétérozygotes apparaissent normales, mais ont une réduction de 50% des taux plasmatiques de LPA par rapport aux souris de type sauvage. Ainsi, l'activité ATX est importante pour garantir la concentration correcte de LPA dans le plasma. L'ATX est aussi fortement exprimé dans les tumeurs, où elle stimulerait la migration de cellules tumorales (311). Le mécanisme de production du LPA impliquant l'ATX, paraît prédominant dans beaucoup de contextes paracrines, en particulier dans l'adipocyte ou dans les tumeurs (307).

La deuxième voie majeure correspond à la conversion en LPA à partir de l'acide phosphatidique (PA) comme substrat, par l'activité de la PLA1 ou de la PLA2. Les PA sont produits à partir de phospholipides par l'action de la phospholipase D, ou à partir du diacylglycérol par l'action de la diacylglycérol-kinase (figure 22). Cette deuxième voie est surtout mise en jeu lorsque des membranes externes cellulaires ou des microvésicules sont libérées par les plaquettes par exemple (312).

D'autres voies minoritaires de production du LPA ont été évoquées. Par exemple, grâce à un mécanisme distinct, le LPA peut être généré par l'acylation du glycérol-3-phosphate par le glycérophosphate l'acyltransférase (GPAT). Cette voie de production est purement intracellulaire, du fait de la localisation de la GPAT au niveau de la membrane mitochondriale et du réticulum endoplasmique. Elle pourrait avoir un intérêt particulier pour activer des mécanismes à l'intérieur de la cellule. En effet, des études ont rapporté que le LPA pourrait agir en tant que ligand fonctionnel du facteur de transcription intracellulaire PPAR γ , bien que ce partenariat moléculaire reste à explorer (313). En outre, la production via le glycérol-3-phosphate a récemment été montrée comme étant particulièrement active dans le tissu osseux en cas de lésion rénale, où du glycérol-3-phosphate d'origine rénale est massivement converti en LPA dans l'os sous l'action de la GPAT (314). Par ailleurs, la PLC (phospholipase C) est également impliquée dans la production de LPA. En effet, le diacylglycérol produit sous l'effet d'une PLC et rephosphorylé peut être transformé en LPA sous l'effet d'une PLA1 ou d'une PLA2 (296,315). Ce mécanisme de production important, quantitativement, pourrait être envisagé en dehors des plaquettes, en particulier lorsque des cellules en apoptose subissent le phénomène de flip flop (303).

CHAPITRE II : REVUE DE LITTÉRATURE SUR L'ACIDE LY SOPHOSPHATIDIQUE, UN MEDIEATEUR POTENTIEL DANS LE CONTROLE DE L'OSTEOGENESE

Enfin, parallèlement à sa synthèse, le LPA subit un catabolisme important. Plus de 90% de son hydrolyse correspond à sa déphosphorylation par des lipides phosphate phosphohydrolases (LPP). Ce sont des phosphatases dont le site catalytique est orienté vers la face externe de la membrane plasmique, d'après Brindley et al., 2002 et Simon et al., 2002 (316,317). Le LPA peut aussi être reconverti en PA ou en glycérol- 3-phosphate (318).

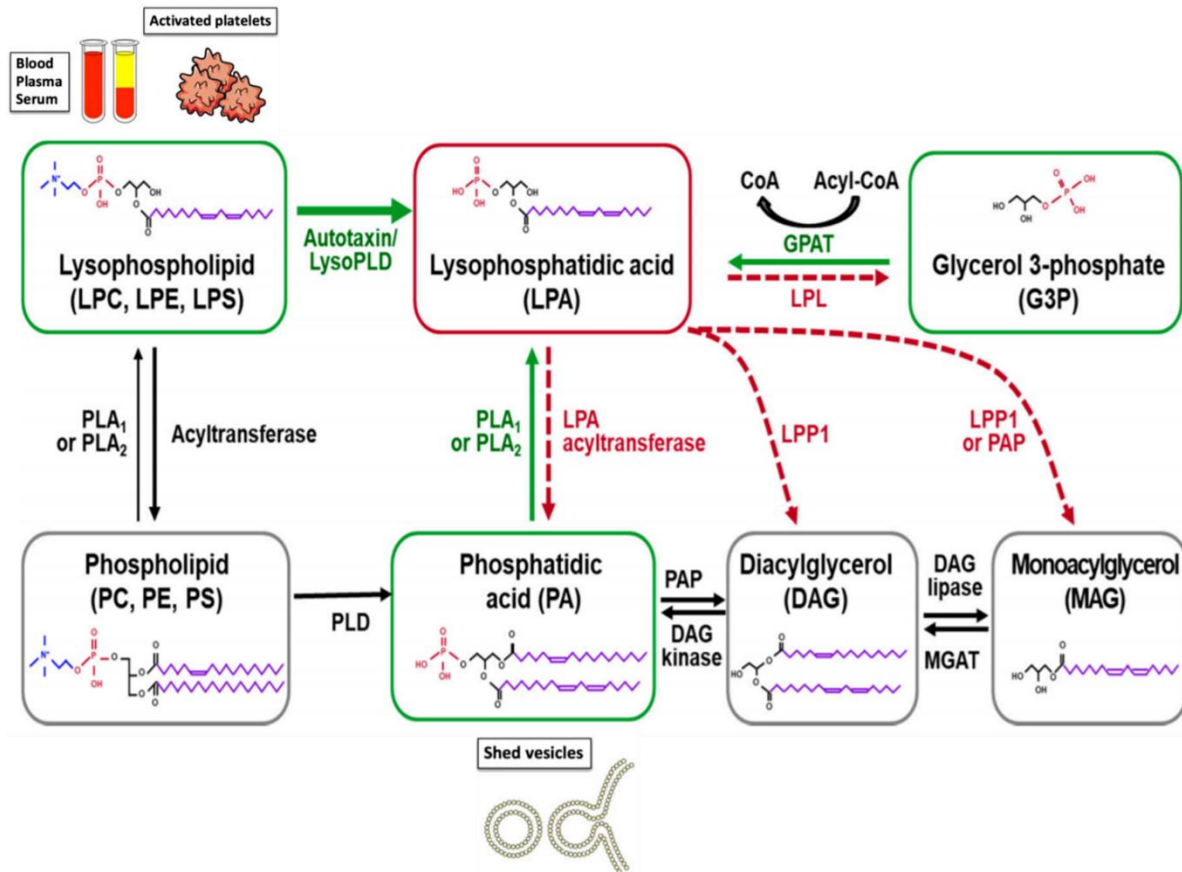


Figure 22 : Les voies enzymatiques de synthèse et de dégradation de l'acide lysophosphatidique (LPA). Le LPA peut être synthétisé à partir de différents précurseurs comme les lysophospholipides, l'acide phosphatidique et le glycérol 3-phosphate. Les voies de production du LPA sont indiquées en vert et en ligne continue tandis que les voies de dégradation sont en rouge et en ligne discontinue. Les contextes de production prédominant sont indiqués (plaquettes activées, libération de vésicules membranaires). Figure adaptée à partir des références (318,319).

1.4. Les récepteurs du LPA

Le LPA agit par l'intermédiaire de récepteurs membranaires. A ce jour, six récepteurs au LPA ont été formellement caractérisés dans des cellules eucaryotes. LPA1 à LPA6

CHAPITRE II : REVUE DE LITTÉRATURE SUR L'ACIDE LYSOPHOSPHATIDIQUE, UN MEDIATEUR POTENTIEL DANS LE CONTROLE DE L'OSTEOGENESE

(nomenclature humaine) ou Lpa1 à Lpa6 (nomenclature non humaine) codés respectivement par les gènes *LPAR1* à 6 et *Lpar1* à 6 (307). Ces récepteurs appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), présentant sept domaines transmembranaires, trois boucles extracellulaires (extracellulaires boucle-ECL1, ECL2, ECL3), trois boucles intracellulaires (boucle intracellulaire-ICL1, ICL2, ICL3), un domaine N-terminal intracellulaire, et un domaine C-terminal à l'extérieur la cellule. Les trois premiers récepteurs au LPA, présentant 50 à 57% d'identité en acides aminés, ont été identifiés sur la base d'homologies de séquence avec la famille des gènes de différenciation endothéliale (Edg), LPA1/Edg-2, LPA2/Edg-4, LPA3/Edg-7. Les trois derniers récepteurs, plus récemment identifiés, et ayant 35 à 55% d'identité (LPA4/GPR23/P2Y9, LPA5/GPR92 et LPA6/P2Y5), présentent une très faible homologie de séquence avec les membres de la famille Edg. Ils partagent cependant la même structure GPCR que les récepteurs purinergiques (307). En plus de ces six récepteurs, le LPA est capables de se lier à trois autres RCPGs à savoir GPR87, GPR35 et P2Y10. Leur activation par le LPA conduit à la mobilisation du calcium intracellulaire (320).

Les récepteurs au LPA présentent une expression aussi large que différentielle dans les tissus ainsi que dans de nombreuses lignées cellulaires. Ils se couplent à au moins un ou plusieurs des quatre protéines G (G12/13, Gq /11, Gi/o et Gs). Ainsi, leur activation déclenche diverses cascades de signalisation aboutissant à la mobilisation du calcium intracellulaire, à l'inhibition ou l'activation de l'adénylate-cyclase et ainsi qu'à l'activation de MAP Kinases (figure 23). L'activation de ces voies leur permet d'assurer les effets physiologiques du LPA, allant du remaniement du cytosquelette, de la motilité cellulaire, et de la survie, à la prolifération et différenciation cellulaire (307). De nombreuses études ont montré que le LPA et ses récepteurs jouent un rôle crucial dans les maladies neurologiques, les tumeurs, les maladies métaboliques, les maladies du foie ainsi que dans de nombreuses pathologies cardiovasculaires (294,304,307).

CHAPITRE II : REVUE DE LITTÉRATURE SUR L'ACIDE LYSOPHOSPHATIDIQUE, UN MEDIEATEUR POTENTIEL DANS LE CONTROLE DE L'OSTEOGENESE

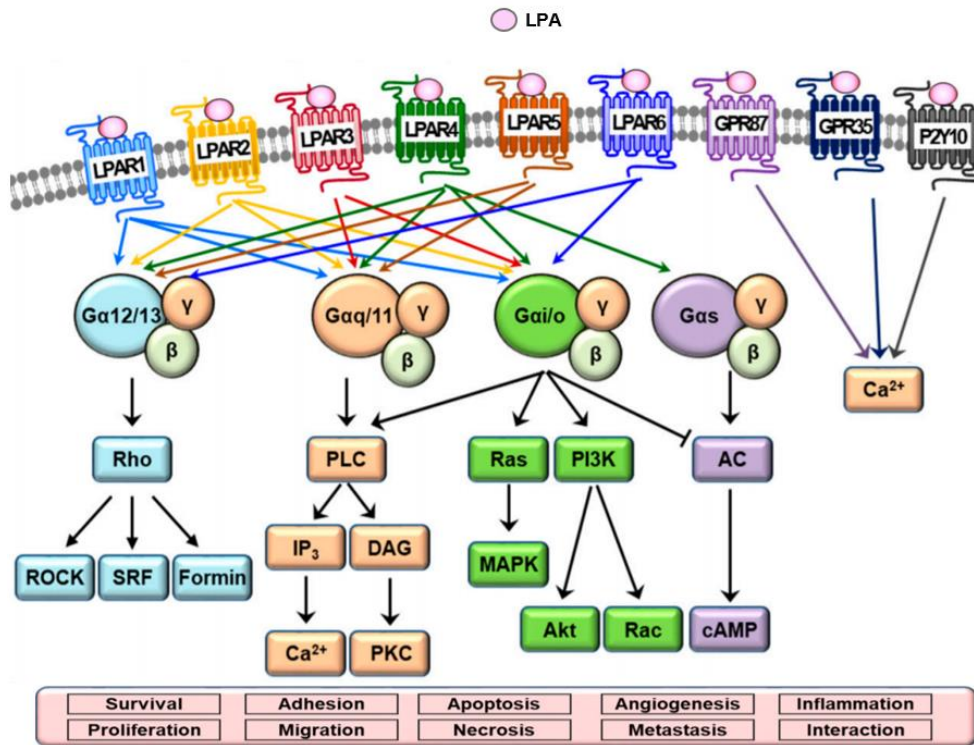


Figure 23 : Les voies de signalisation du LPA et les effets cellulaires physiologiques et pathologiques associés. Interaction des récepteurs du LPA avec les différentes familles de protéines G et les effets en aval sur les seconds messagers, AC, adénylate cyclase; cAMP, cyclic adenosine monophosphate; DAG, diacylglycérol ; p42/p44 MAPK, p42/p44 mitogen-activated protein kinase; IP3, inositol 1,4,5- triphosphate; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; PKC, protéine kinase C; PLC, phospholipase C; Rock, Rho associated kinase; SRF, serum response factor. Figure adaptée à partir de la référence (318).

• Le récepteur LPA1

Le LPA1, initialement appelé EDG-2 ou V2G-1 est le premier récepteur de lysophospholipides à avoir été identifié dans le cerveau comme médiateur des effets du LPA en 1996 (321). C'est aussi celui qui est le mieux étudié des six récepteurs au LPA. Le gène *LPAR1* est situé sur le chromosome 9 (locus chromosomique humain 9q31.3) et code une protéine de 41 kDa contenant 364 acides aminés. Chez la souris, le gène *Lpar1* est situé sur le chromosome 4, au locus 32.2 cM, et comporte cinq exons avec un intron conservé entre *Lpar1*, 2 et 3. Le *Lpar1* présente une expression ubiquitaire dans de nombreux organes tels que le cerveau, l'os, le cœur, les poumons, l'estomac, l'intestin grêle, la rate, le thymus, les

CHAPITRE II : REVUE DE LITTÉRATURE SUR L'ACIDE LYSOPHOSPHATIDIQUE, UN MÉDIATEUR POTENTIEL DANS LE CONTRÔLE DE L'OSTÉOGENÈSE

testicules et les muscles squelettiques des souris adultes mais pas dans le foie (322). Chez l'homme, le LPA1 est retrouvé dans le cerveau, l'os, le cœur, le placenta, la rate, les reins, le colon, l'intestin grêle, la prostate, les testicules, les ovaires, le pancréas, les muscles squelettiques et peu ou pas dans le thymus, le foie les poumons ou les leucocytes du sang périphérique (294,322). L'activation du LPA1 entraîne des réponses cellulaires variées telles que la prolifération, la survie cellulaire, l'inhibition de l'apoptose, l'activation des MAPK et du SRE (Serum Response Element), l'inhibition de l'adénylate cyclase, l'activation des PLC (phospholipase C) et PKC (Protéines Kinases C), l'activation de Rho et Akt (294,307). D'autres réponses comme la formation de fibres de stress, la rétraction des neurites, l'augmentation de calcium intracellulaire, la myélinisation, l'incorporation de BrdU, le relargage d'acide arachidonique et la production d'inositol-phosphate (IP) sont aussi décrits (294,304,307). Ces réponses se font par l'intermédiaire de 3 voies de signalisation principales en aval des GCPR qui sont Gi/o, Gq/11 et G12/13 (172). L'expression du *Lpar1* est particulièrement importante dans le cerveau au cours du développement embryonnaire chez la souris (323,324). Dans l'optique de mieux comprendre son rôle, le groupe du Pr Jerold Chun a généré la souris invalidée pour le gène du LPA1 par délétion de l'exon 3. Les souris *Lpar1*^{-/-} présentent une multitude d'anomalies à savoir entre autre, une mortalité néonatale de 50% (324), un réflexe de succion altéré, un retard de croissance post-natal, un dysmorphisme cranio-facial (museau raccourci et yeux plus espacés), ainsi qu'une augmentation de l'apoptose des cellules de Schwann au niveau du nerf sciatique (322), une résistance à la douleur (325) avec un phénotype proche de pathologies psychiatriques telles que la schizophrénie (307). Par ailleurs, les souris *Lpar1*^{-/-} présentent des anomalies sévères au niveau du développement osseux endochondrale, sur lesquelles je reviendrai en détails plus loin.

- **Le récepteur LPA2**

Le gène du second récepteur du LPA, le LPA2 aussi appelé EDG-4 a été découvert grâce à des moteurs de recherche comme GeneBank qui ont révélé une autre RCPG présentant une homologie de séquence de 60% de ses acides aminés avec le LPA1 (326,327). Le gène *LPAR2* est localisé sur le chromosome 19 au locus 19p12 chez l'homme, et le gène *Lpar2* situé sur le chromosome 8 chez la souris se trouve au locus 33.91 cM. Le gène humain code pour une protéine de 351 acides aminés avec un poids moléculaire

CHAPITRE II : REVUE DE LITTÉRATURE SUR L'ACIDE LYSOPHOSPHATIDIQUE, UN MÉDIATEUR POTENTIEL DANS LE CONTRÔLE DE L'OSTÉOGENÈSE

d'environ 39,1 kDa, tandis que le gène murin code pour une protéine de 348 acides aminés avec un poids moléculaire d'environ 38,9 kDa. Le récepteur LPA2 est exprimé chez la souris abondamment au niveau du cerveau (pendant la vie embryonnaire), au niveau des testicules, des reins mais aussi dans les poumons, le cœur, la rate, l'estomac, le thymus et le cerveau adulte. Il est peu ou pas exprimé dans d'autres organes tels que le foie, l'intestin grêle et les muscles squelettiques (322,328). Chez l'homme, il est essentiellement localisé dans les testicules et les leucocytes du sang périphérique, un peu moins dans le pancréas, la rate, le thymus et la prostate (327) et présente peu ou pas d'expression dans le cœur, le cerveau, le placenta, les poumons, le foie, les muscles squelettiques, les ovaires, les reins, l'intestin grêle et le colon (294,322). L'activation du récepteur 2 du LPA entraîne des réponses cellulaires similaires à celles retrouvées lors de l'activation du LPA1 telles que la rétraction neuronale, l'inhibition de l'adénylate cyclase, l'activation du SRE, l'augmentation de calcium intracellulaire, la production d'inositol phosphate, l'activation des MAPK, l'inhibition de l'apoptose et le relargage d'acide arachidonique et l'«arrondissement» cellulaire. De la même façon que pour le LPA1, le signal LPA2 passe par Gi/o, Gq/11 et G12/13 (294). Les souris invalidées pour le récepteur 2 du LPA par délétion de l'exon 2 naissent avec une fréquence normale. Elles ne possèdent aucune anomalie phénotypique notable, cependant, l'activation de la PLC et la mobilisation du calcium sont nettement diminuées dans les cellules MEF (Mouse Embryonic Fibroblast) de ces souris (328). La double invalidation LPA1/LPA2 n'apporte pas d'anomalies phénotypiques supplémentaires par rapport à la souris LPA1 (-/-) à part une augmentation de la fréquence d'hématomes frontaux périnataux (328). Il semblerait qu'il y ait des fonctions redondantes comme l'activation de PLC, la mobilisation du calcium, la prolifération, l'activation d'Akt et JNK ainsi que la formation de fibres de stress (294).

- **Le récepteur LPA3**

Le gène du LPA3 a été découvert et cloné de manière similaire au LPA2, en utilisant des recherches d'homologie pour les RCPG orphelins, par une méthode de clonage dégénérée basée sur la PCR (294,307). Le LPAR3/*Lpar3* (locus 1p22.3 sur le chromosome humain n°1 et locus 3, 71,03 cM sur le chromosome murin n°3) code pour une protéine de 353 acides aminés avec une masse moléculaire de 40 kDa. Le gène du LPA3 présente environ 54% de codons identiques au LPA1 et 49% identiques au LPA2 (307). Comme pour

CHAPITRE II : REVUE DE LITTÉRATURE SUR L'ACIDE LYSOPHOSPHATIDIQUE, UN MEDIATEUR POTENTIEL DANS LE CONTROLE DE L'OSTEOGENESE

le LPA2, le LPA3 murin est abondamment retrouvé dans les testicules, les reins, les poumons. Il est plus modérément exprimé dans le cœur, l'estomac, la rate et le cerveau adulte et « périnatal », le placenta, l'utérus et les ovaires des souris adultes. Par contre, il est peu ou pas présent dans le cerveau embryonnaire, le foie et le thymus (294,304,307). Le LPA3 humain, chez l'adulte est abondamment exprimé dans le cœur, les testicules, la prostate et le pancréas (329). Son expression est moindre dans les poumons, les ovaires et dans le cerveau et il n'est pas retrouvé dans le placenta, le foie, les muscles squelettiques, les reins, la rate, le thymus, l'intestin grêle, le colon ou les leucocytes du sang périphérique (294,307,320). Contrairement au LPA1 et LPA2, le LPA3 se lie avec les protéines Gi/o, Gq/11 mais pas G12/13 entraînant l'activation de la PLC, la mobilisation du calcium intracellulaire, l'inhibition ou l'activation de l'adénylate cyclase et l'activation des MAPK ainsi que la production d'inositol phosphate, le relargage d'acide arachidonique et l'élongation neuronale (294,307,320). Les souris *Lpar3*^{-/-} naissent avec une fréquence normale, sont viables et semblent normales, sans déficience majeure. Cependant les femelles *Lpar3*^{-/-} montrent une implantation embryonnaire retardée, un espacement embryonnaire altéré, une hypertrophie placentaire et une diminution de taille des portées (330).

- **Le récepteur LPA4**

Le LPA4 fut le premier récepteur de lysophospholipides à avoir été identifié comme présentant une différence majeure dans les séquences d'acides aminés par rapport aux autres récepteurs LPA1–3. En effet le LPA4 ne partage que 20% d'identité en acides aminés avec le LPA1 et une homologie à peine supérieure à ce pourcentage pour les LPA2 et 3 (294,304,307,320). Le LPA4 était connu sous le nom de récepteur orphelin P2Y9, en raison de sa similitude avec les récepteurs purinergiques P2Y. Cependant, il a été reclassifié comme LPA4 après avoir démontré sa réactivité à LPA. Le gène *LPAR4/Lpar4* est situé chez l'homme sur le chromosome X au locus Xq21.1, et chez la souris au niveau de la région D du chromosome X. Dans l'espèce humaine il semble relativement peu exprimé quel que soit l'organe examiné sauf au niveau des ovaires (307). Il code pour une protéine de 370 acides aminés avec une masse moléculaire d'environ 41,9 kDa. Chez la souris, le LPA4 est retrouvé dans l'utérus et le placenta. Il jouerait un rôle dans la reproduction à la fois chez l'Homme et chez la souris (331). Par ailleurs, la gestation augmente l'expression des ARNm du LPA4 dans l'utérus mais pas dans les ovaires. En milieu de gestation, la quantité d'ARNm

CHAPITRE II : REVUE DE LITTÉRATURE SUR L'ACIDE LYSOPHOSPHATIDIQUE, UN MÉDiateUR POTENTIEL DANS LE CONTRÔLE DE L'OSTÉOGENÈSE

du LPA4 est supérieure dans l'embryon par rapport au placenta et à l'utérus. Le LPA4 jouerait un rôle important dans le développement de nombreux organes dont le cerveau. En effet, l'expression de l'ARNm du LPA4 a été observée dans des cellules souches embryonnaires humaines indifférenciées et en voie de différenciation neuronale (331). Chez la souris le LPA4 a aussi été détecté dans les neurones et les astrocytes. Il semblerait qu'il soit impliqué dans des processus de développement neuronaux (331). Enfin, le LPA4 serait aussi présent dans les plaquettes et agirait comme inhibiteur de l'agrégation plaquettaire liée au LPA (307). La signalisation par le LPA4 active les voies G_s , $G_q/11$ et $G_{12/13}$ et G_i , entraînant une augmentation du calcium, la stimulation ou l'inhibition de l'adénylate cyclase, la rétraction de neurites, l'agrégation cellulaire, la formation de fibres de stress (294,304,307,331). Le LPA4 est le seul récepteur au LPA connu pour avoir une activité G_s . L'activation de la voie $G_{12/13}/Rho/ROCK$ facilite à la fois l'agrégation cellulaire ROCK-dépendante et l'adhésion cellulaire dépendante de la N-cadhérine (294). Le couplage G_i est très peu évoqué dans la littérature semble minoritaire sur le couplage G_s . Cependant, il a été mis en évidence dans des cellules de neuroblastome (B103), où il résulte en une augmentation du calcium intracellulaire, probablement par activation de la PLC (304,332). La migration cellulaire induite par le LPA notamment via le LPA1 est inhibée par l'activation de LPA4, et des cellules déficientes en LPA4 ont une sensibilité accrue à la stimulation au LPA, avec formation de lamellipodes (333). Cette capacité du LPA4 à réguler négativement la motilité cellulaire s'oppose aux effets chimioattracteurs classiquement connus du LPA, et suggère que la prévalence de l'expression d'un récepteur sur les autres peut être déterminante dans les réponses intracellulaires induites par le LPA. Par ailleurs, le facteur YAP et le coactivateur transcriptionnel TAZ peuvent également être activés par le LPA4 via la voie de signalisation $G_{\alpha 12} / G_{\alpha 13}$ (334). Cette activation de YAP et TAZ a souvent été montrée comme pouvant favoriser la prolifération et la migration des cellules cancéreuses, conduisant à l'accélération de certains cancers comme le cancer du foie, de la vessie et du poumon (335–337). Les souris *Lpar4*^{-/-} présentent des anomalies de développement embryonnaire. En effet, leur survie prénatale est diminuée, et elles développent des altérations à savoir : des œdèmes, la présence d'hémorragie sévère, une dilatation anormale des vaisseaux sanguins et lymphatiques et une altération du recrutement des péricytes (338). Cela indique des rôles pléiotropiques importants pour le LPA4 dans le développement du système lymphatique. En revanche, les souris *Lpar4*^{-/-} adultes semblent tout à fait normales. Toutefois elles présentent une augmentation de la masse osseuse, un phénotype intéressant sur lequel je reviendrai en détails plus loin (339).

CHAPITRE II : REVUE DE LITTÉRATURE SUR L'ACIDE LYSOPHOSPHATIDIQUE, UN MÉDIATEUR POTENTIEL DANS LE CONTRÔLE DE L'OSTÉOGENÈSE

- **Le récepteur LPA5**

Le LPA5 reconnu en 2006 comme étant de la famille des récepteurs au LPA partage 35% d'homologie avec le LPA4, mais seulement 22% d'homologie avec les récepteurs LPA1–3 (340). Le gène *LPAR5/Lpar5* est situé chez l'homme sur le chromosome 12 au locus 12p13.31, et chez la souris sur le chromosome 6 au niveau du locus 59,21 cM. Il code pour une protéine de 372 acides aminés (294,307,320). Chez l'homme, le LPA5 est fortement exprimé dans la rate, et dans une moindre mesure dans le cœur, l'intestin grêle, le placenta, le côlon et le foie. Chez la souris, le *Lpar5* est très exprimé dans l'intestin grêle, et plus modérément dans les poumons, le cœur, l'estomac, le côlon, la rate, le thymus, la peau, le foie, les plaquettes, les mastocytes, les lymphocytes gastro-intestinaux et les ganglions de la racine dorsale (294,307). Le *Lpar5* a été trouvé dans le cerveau antérieur embryonnaire précoce de la souris, au niveau du mésencéphale rostral et dans le cerveau postérieur. La signalisation du LPA5 active d'une part la voie $G_{12/13}$ conduisant à une rétraction des neurites, la formation de fibres de stress et l'internalisation des récepteurs *in vitro* (340). Le LPA5 peut également activer G_q pour augmenter les niveaux de calcium intracellulaire (340). La signalisation LPA5 pourrait jouer un rôle important dans le côlon, où il peut être impliqué dans l'absorption d'eau (341). En effet, il a été rapporté que dans des cellules épithéliales intestinales, le LPA favorise l'absorption de l'eau sodium dépendante, à travers l'échangeur d'ions Na^+/H^+ NHE3 recruté dans les microvillosités grâce à l'activation du LPA5 (342). Par ailleurs, le LPA5 a été montré comme étant le principal récepteur impliqué dans l'action du LPA dans les mastocytes (341).

- **Le récepteur LPA6**

Le LPA6, anciennement P2Y5 est le récepteur le plus récemment ajouté à la famille des récepteurs au LPA (343). Des études utilisant une protéine chimérique G_{13} ont indiqué que le LPA induisait plusieurs effets, notamment une accumulation d'AMPc médiée par P2Y5, ainsi que des changements Rho-dépendants dans la morphologie cellulaire (344). Le P2Y5 a donc fini par être reclassifié comme récepteur LPA et renommé LPA6 (294,307,320). Chez l'homme, le gène *LPAR6* est localisé sur chromosome 13 au locus 13q14. Il code pour une protéine de 344 acides aminés avec un poids moléculaire d'environ 39 kDa (307,345).

CHAPITRE II : REVUE DE LITTÉRATURE SUR L'ACIDE LYSOPHOSPHATIDIQUE, UN MÉDIATEUR POTENTIEL DANS LE CONTRÔLE DE L'OSTÉOGENÈSE

Le LPA6 est bien connu aujourd'hui pour activer les protéines G_i , et $G_{12/13}$ induisant une augmentation du Calcium intracellulaire, une diminution de l'AMPc stimulé par la forskoline, et une activation de ERK 1/2 (346). Comme le LPA4, l'activation du LPA6 peut également stimuler la transcription des régulateurs YAP et TAZ dont l'activation participe à la progression des tumeurs (334). En outre, la signalisation LPA/LPA6 a été rapportée comme pouvant réguler la perméabilité vasculaire (347). Le LPA6 régule également la formation des follicules pileux, et la perte de LPA6 conduit à une alopecie congénitale (348). Étant le dernier récepteur identifié, les mécanismes médiés par le LPA6 dans différents systèmes présentent encore de nombreuses zones d'ombre.

- **Les récepteurs P2Y10, GPR87 et GPR35**

Le récepteur P2Y10, appartient aussi à la famille des récepteurs non-EDG. Il est localisé sur le chromosome X chez l'homme et chez la souris (304,307). Il présente peu d'homologie avec les récepteurs EDG. Cependant, il présente 34% d'homologie avec le récepteur LPA4, 35% avec le LPA5 et 31% avec le GPR87 (349). Chez la souris, il est retrouvé entre autres au niveau de l'utérus, de la prostate, et du cerveau. Il répond à la stimulation par le LPA en mobilisant le calcium intracellulaire (294,307,349).

Le récepteur GPR87 appartient également à la famille des récepteurs dits non-EDG et est localisé sur le chromosome 3 (3q25) chez l'homme et la souris (350). Il ne présente pas d'homologie avec les récepteurs LPA1-3. Il possède 27% et 25% d'homologie respectivement avec le LPA4 et LPA5 (350). Chez la souris, le gène du GPR87 est exprimé de façon importante dans les testicules et le cerveau, et beaucoup moins dans les autres tissus. Son activation par le LPA entraînerait une mobilisation du calcium intracellulaire (307,350).

Le GPR35 appartient également à la famille des récepteurs dits non-EDG, et est localisé sur le chromosome 2 (2q37.3) chez l'homme (351). Il possède 32% d'homologie avec le LPA4. On le retrouve dans divers tissus de mammifères, tels que les tissus gastro-intestinaux, les tissus lymphoïdes et les tissus nerveux central et périphérique (352,353). La signalisation du LPA via le GPR35, induit tout comme pour le GPR87 et le P2Y10, une mobilisation du calcium intracellulaire (354).

CHAPITRE II : REVUE DE LITTÉRATURE SUR L'ACIDE LYSOPHOSPHATIDIQUE, UN MEDiateur POTENTIEL DANS LE CONTROLE DE L'OSTEOGENESE

1.5. Rôles Physiologiques du LPA

Le LPA exerce une très grande diversité d'activités sur une très large variété de cellules, l'impliquant dans un nombre important de processus physiologiques (tableau 1) (294). Ces processus concernent plusieurs systèmes comme le système vasculaire, le système immunitaire ou encore le système nerveux.

	Phenotype	Established roles for LPA signaling
Nervous system	Growth/development	Proliferation and differentiation of neural progenitor cells (NPCs) Neurogenesis Ionic conductance changes Neuronal survival LPA production by neurons Astrocyte proliferation
	Morphology	Morphological changes in NPCs, neurons, and astrocytes Cortical actin assembly in <i>Xenopus</i> neurons Synapse formation
	Cellular interaction	Neuronal differentiation by astrocyte-derived soluble factors
	Myelination	Differentiation of oligodendrocytes Morphological changes in Schwann cells Proliferation and survival of Schwann cells Upregulation of myelin P0 protein
Vascular system	Vasculogenesis Angiogenesis	Frontal cephalic hemorrhages in <i>Lpar1</i> ^{-/-} and <i>Lpar1</i> ^{-/-} / <i>Lpar2</i> ^{-/-} Severe vascular defects in ATX null Vasculature maintenance
	Vasoregulation	Hypertension or hypotension by LPA Endothelial cell death Loss of vascular integrity Increase in hydraulic permeability
Immune system	T cell functions	Chemotaxis Cytokine production Apoptosis Trafficking (regulation by ATX)
	Dendritic cell functions	Maturation Chemotaxis of immature dendritic cells
Reproductive system	Embryo implantation	Timing and spacing of implantation Regulation of prostaglandin pathways
	Spermatogenesis	Survival factor for germ cell Sperm motility
	Others	Possible role in male sexual function, ovarian functions, fertilization, decidualization, pregnancy maintenance, and parturition

Tableau 1: Rôles physiologiques du LPA (294).

De même, de nombreuses études réalisées pour la plupart avec des modèles animaux, ont permis de mieux caractériser l'importance du LPA dans certains processus pathologiques. Ces pathologies peuvent être d'ordre neuronal, vasculaire, reproductif mais

CHAPITRE II : REVUE DE LITTÉRATURE SUR L'ACIDE LYSOPHOSPHATIDIQUE, UN MÉDiateUR POTENTIEL DANS LE CONTRÔLE DE L'OSTÉOGENÈSE

plusieurs d'entre elles sont des cancers. Certaines de ces pathologies ainsi que les mécanismes impliqués sont présentés au tableau 2 (320)

LPAR	Disease	Impact	Mechanism
LPAR1	Ovarian cancer	Aggravate	PI3K/AKT pathway ↑
	Glioblastoma	Aggravate	PKCα ↓
	Lung cancer	Aggravate	P53 ↓
	Neuropathic pain	Aggravate	Rho-ROCK pathway ↑, PKCγ ↑, Caα2δ1 ↑
	Neuropathic pain	Aggravate	macrophages/microglia ↑
	Atherosclerosis	Aggravate	CXCL12 ↑, HIF-1α ↑, SPC ↑
	Calcified aortic stenosis	Aggravate	RhoA-NF-κB pathway ↑
	Renal fibrosis	Aggravate	the myocardin-related transcription factor-serum response factor pathway ↑, CTGF ↑
	Pulmonary fibrosis	Aggravate	BMSC to differentiate into myofibroblasts ↑, ECM ↑
	Liver fibrosis	Aggravate	α-SMA ↑, CTGF ↑, TGF-β1 ↑
	Diabetic nephropathy	Aggravate	GSK3b (Ser9) phosphorylation ↑, SREBP1 ↑, TGF-β ↑
	Diabetic nephropathy	Aggravate	TLR4 /NF-κB pathway ↑, NADPH ↑
	Rheumatoid arthritis	Aggravate	RA/FLS ↑
LPAR2	Ovarian cancer	Aggravate	Gαi-Src-EGFR-ERK pathway ↑
	Colon cancer	Aggravate	cPKC ↓, β-catenin ↓
	Colon cancer	Attenuate	MAGI-3 ↑
	Colon cancer	Aggravate	NHERF-2 ↓
	Pancreatic cancer	Attenuate	Gα12/13-Rho pathway ↑
	Lung cancer	Aggravate	P53 ↓
	Atherosclerosis	Aggravate	CXCL12 ↑, HIF-1α ↑, SPC ↑
	Renal fibrosis	Aggravate	Gαq-Rho/ROCK pathway ↑, TGF-β ↑
	Pulmonary fibrosis	Aggravate	TGF-β1 ↑
LPAR3	Ovarian cancer	Attenuate	PI3K/Akt pathway ↑
	Colon cancer	Aggravate	cPKC↑, β-catenin↑
	Liver cancer	Aggravate	Gαi-ERK-MAPK pathway↑
	Lung cancer	Aggravate	P53↓
	Neuropathic pain	Aggravate	macrophages/microglia↑
	Atherosclerosis	Aggravate	CXCL12↑, HIF-1α↑, SPC↑
	Cardiac fibrosis	Attenuate	α-SMA↑, CTGF↑, TGF-β1↑
LPAR4	-	-	-
LPAR5	Melanoma	Attenuate	cAMP↓
	Neuropathic pain	Aggravate	PKD ↑, microglia ↑
LPAR6	Liver cancer	Aggravate	pim-3 ↑
	Hepatic encephalopathy	Aggravate	Gα12/13-Rho pathway ↑, BBB ↑

Tableau 2: Implications des récepteurs du LPA en pathologies humaines, PKCα: protein kinase Cα; PKCγ: protein kinase Cγ; LPAR: lysophosphatidic acid receptors; CXCL12: CXC motif ligand 12; HIF-1α: hypoxia-inducible factor-1α; SPC: smooth muscle progenitor cells; CTGF: connective tissue growth factor; BMSC: bone marrow-derived mesenchymal stem cells; ECM: extracellular matrix; SREBP1: sterol-regulatory element binding proteins 1; TGF-β1: transforming growth factor β1; NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; RA: rheumatoid arthritis; ERK: extracellular regulated protein kinases; cPKC: classical protein kinase C; MAGI-3: inverted orientation-3; NHERF-2: Na⁺/H⁺ exchange regulatory factor-2; MAPK: mitogen-activated protein kinase;

CHAPITRE II : REVUE DE LITTÉRATURE SUR L'ACIDE LYSOPHOSPHATIDIQUE, UN MÉDIATEUR POTENTIEL DANS LE CONTRÔLE DE L'OSTÉOGENÈSE

cAMP: cyclic adenosine monophosphate; PKD: protein kinase D; BBB: blood-brain barrier. Tableau adaptée à partir de la référence (320).

2. Rôle du LPA en physiopathologie osseuse

Le LPA apparaît comme un acteur essentiel dans le contrôle de l'ostéogénèse endochondrale. En effet, plusieurs travaux ont mis en évidence une production de LPA par les chondrocytes de la plaque de croissance, les ostéoblastes, et les cellules souches mésenchymateuses en milieu ostéogénique (303). De même, le LPA est présent dans la moelle osseuse, probablement sous forme de gradient, avec des niveaux élevés dans les régions périvasculaires et beaucoup plus bas dans l'endoste (355). Les origines les plus évoquées du LPA médullaire sont son apport, ou l'apport de précurseurs de synthèse comme le glycérol-3-phosphate par la vascularisation, ou encore une production locale par les adipocytes de la moelle (314,356). De plus, différents types de cellules, chondrocytes, ostéoblastes et ostéoclastes expriment les récepteurs du LPA. Ainsi, le LPA produit, pourrait jouer un rôle majeur dans l'ossification endochondrale et le remaniement du tissu osseux tout au long de la vie.

2.1. LPA et plaque de croissance

Le rôle du LPA dans le cartilage de croissance et les chondrocytes est de plus en plus étudié. Les premiers travaux reliant LPA et système cartilagineux ont été réalisés en 1998 par Koolpe et al qui ont montré que le LPA était capable d'induire une augmentation du calcium intracellulaire dans les chondrocytes articulaires (357). Par la suite, Kim et al ont montré que le LPA régule la prolifération de chondrocytes articulaires de rat. Cet effet a de plus été montré comme passant par la voie Gi-ERK (358). Des études récentes ont rapporté que, dans des contextes de lésions du cartilage articulaire de rat, l'autotaxine et le LPA sont produits de façon importante au niveau du site de lésion par les cellules stromales mésenchymateuses et les chondrocytes. Le LPA induit dans ces cellules une augmentation de la synthèse de collagène de type I, et cette production est bloquée en présence de la pertussis toxine et d'inhibiteurs des MAP Kinases et PI3 Kinases, suggérant ainsi l'implication potentielle des récepteurs LPA1 et 2, ou plus particulièrement celle du LPA1 (359). Ces travaux laissent penser à une action potentiellement bénéfique du LPA pour le cartilage de croissance.

CHAPITRE II : REVUE DE LITTÉRATURE SUR L'ACIDE LYSOPHOSPHATIDIQUE, UN MÉDIATEUR POTENTIEL DANS LE CONTRÔLE DE L'OSTÉOGENÈSE

Il a été suggéré que le LPA agirait en potentialisant l'effet de la vitamine D3 sur les chondrocytes non prolifératifs, en augmentant leur maturation, leur production matricielle et leur survie (360). Une implication particulière du récepteur LPA1 a été rapportée dans de nombreuses études. En effet, des données non publiées du laboratoire indiquent que les souris *Lpar1*^{-/-} à 4 semaines de croissance, présentent un défaut marqué d'ossification endochondrale caractérisé entre autres, au niveau de la plaque de croissance par une diminution de la taille de la zone proliférative. De plus, il a été décrit un polymorphisme du récepteur LPA1 associé à l'arthrose, une dégénérescence du cartilage, suggérant que l'axe LPA-LPA1 pourrait être associé à des pathologies du cartilage sur une population japonaise (361). Dernièrement, Nishioka et al, ont démontré que les souris *Lpar1*^{-/-} présentaient une réduction en nombre et un défaut d'alignement des chondrocytes dans le tissu cartilagineux au niveau des côtes, fémurs et humérus, provoquant de graves défauts de formation du cartilage de croissance. Les mêmes observations ont été retrouvées dans le modèle zebrafish. Ils ont également mis en évidence le mécanisme selon lequel, la signalisation ATX/LPA/LPA1 induit probablement via Gi et/ou G_{12/13} une translocation de l'intégrine β1 conduisant à l'assemblage de fibronectine et au dépôt de matrice extracellulaire. Cela aboutit à une augmentation de l'adhésion des chondrocytes à la matrice, suivi d'une entrée en phase S et d'une augmentation de la prolifération cellulaire (362).

2.2. LPA et résorption osseuse

Le LPA joue un rôle important dans l'ostéoclastogénèse et dans la résorption osseuse. En effet, son action est requise lors de la différenciation ostéoclastique en réponse au RANKL et au MCSF (363). De plus, des études utilisant des ostéoclastes matures différenciés de rat, des cellules de moelle osseuse de souris et de lapin ou des lignées cellulaires macrophagiques comme la lignée RAW264.7, ont permis de mettre en évidence l'activité du LPA sur la survie des ostéoclastes et sur leurs changements morphologiques (364,365). Il a été montré que tous les récepteurs au LPA (sauf LPA3 et 6), sont exprimés de façon croissante dans les ostéoclastes au cours de leur différenciation. L'expression du LPA6 quant à lui diminue au cours de l'ostéoclastogénèse tandis que le LPA3 n'est pas exprimé (366). En présence de RANKL et MCSF, les précurseurs monocytaires issus de moelle osseuse des souris *Lpar1*^{-/-} présentent une capacité réduite à former des ostéoclastes matures, contrairement à ceux des souris *Lpar2*^{-/-} et *Lpar3*^{-/-}. De plus, le traitement des précurseurs monocytaires issus de moelle osseuse et des ostéoclastes

CHAPITRE II : REVUE DE LITTÉRATURE SUR L'ACIDE LYSOPHOSPHATIDIQUE, UN MÉDIATEUR POTENTIEL DANS LE CONTRÔLE DE L'OSTÉOGENÈSE

matures de souris de type sauvage avec le Ki16425, inhibe remarquablement l'ostéoclastogénèse (366). Cela suggère une fois encore l'implication majeure du récepteur LPA1. De façon plus intéressante encore, la taille des lacunes de résorption induites par les ostéoclastes matures *Lpar1*^{-/-} était fortement diminuée par rapport à celle observée dans les ostéoclastes de type sauvage. La même observation a été rapportée chez les ostéoclastes matures de souris sauvages traités par Ki16425. Cette perturbation du cytosquelette a un impact majeur sur la capacité de résorption minérale des ostéoclastes (366). D'autres données *in vivo* viennent confirmer ces éléments, en ce sens que, l'expression du LPA1 augmente au niveau des ostéoclastes de souris ovariectomisées qui présentent un déficit en œstrogène et une ostéoporose résultante de la suractivité des ostéoclastes. Lorsque ces souris sont traitées par le Debio0719 (stéréoisomère du Ki16425) et par le Ki16425 lui-même, la perte osseuse induite par l'ovariectomie est significativement contrecarrée (367). L'ensemble de ces résultats indiquent que, par l'intermédiaire de son récepteur LPA1, le LPA joue un rôle majeur dans l'ostéoclastogénèse et dans l'activité des ostéoclastes *in vitro* et *in vivo*.

2.3. Le LPA dans les métastases osseuses et la résorption osseuse associée

Comme nous l'avons vu, le LPA est impliqué dans de nombreux processus cancéreux, notamment la prolifération cellulaire et la résistance à l'apoptose. Des effets similaires ont également été rapportés dans le tissu osseux, dans le contexte de la mise en place des métastases osseuses issues de cancer du sein (301). En effet, le LPA a été détecté sur des sites de métastases osseuses, en réponse à une interaction entre les cellules tumorales et les plaquettes sanguines. Le LPA favorise la progression de la pathologie de deux façons. D'abord, il stimule directement la prolifération des cellules tumorales et par conséquent la croissance de la tumeur. Ensuite, le LPA provoque de façon indirecte la destruction osseuse, en stimulant dans les cellules tumorales la production de cytokines comme les interleukines IL-6 et IL-8 (301). Ces cytokines activent les ostéoclastes qui participent à l'érosion osseuse. Le récepteur LPA1 a particulièrement été associé à ces effets (319,368).

2.4. LPA et ostéoblastogenèse

Plusieurs travaux ont permis de mettre en évidence l'implication du LPA dans l'ostéogénèse. En effet, Grey et al. ont montré pour la première fois que le LPA jouait un rôle dans la prolifération de cellules ostéoblastiques de rat par la mise en jeu de la voie de signalisation Gi avec activation des PI3K. Il peut être anti-apoptotique pour ces mêmes cellules ainsi que des cellules d'ostéosarcome (SaOS) (369,370). Il a été rapporté que l'action du LPA, potentialisée par le calcitriol favorise la maturation de lignées cellulaires d'ostéosarcome humains MG63 (371). Par ailleurs, le LPA est capable d'induire des changements dans le cytosquelette et de stimuler la migration cellulaire dans les lignées ostéoblastiques MC3T3-E1 (371). Il a également été démontré que le LPA stimule la formation de vésicules extracellulaires dans des ostéoblastes primaires de souris, suggérant son potentiel rôle dans les phénomènes de communication cellulaire, voire indirectement de minéralisation (372). En effet, l'activation du récepteur P2X7 conduit à la production de LPA et augmente la minéralisation (303).

L'implication spécifique des récepteurs du LPA dans ces effets a été également étudiée. Le LPA1 est exprimé par toutes les cellules de la lignée ostéoblastique (cellules souches mésenchymateuses (CSM), ostéoblastes non différenciés et différenciés et lignées cellulaires ostéoblastiques), et son expression reste relativement constante lors de la différenciation ostéoblastique (294). Les cellules ostéoblastiques expriment également le LPA2, mais de façon moins importante. L'expression du LPA3 est inconstante et généralement faible, tandis que le LPA4 est exprimé uniquement dans les cellules différenciées (218). L'absence d'altérations osseuses chez les souris invalidées pour les récepteurs LPA2 et 3 laisse supposer qu'ils ne seraient pas d'une importance majeure (366). Ainsi, deux récepteurs semblent être plus impliqués à savoir les récepteurs LPA1 et LPA4. Tout d'abord, l'utilisation d'inhibiteurs des récepteurs LPA1 et LPA3 (VPC-32183, Ki16425) bloque efficacement la prolifération des ostéoblastes induite par le LPA, ce qui suggère fortement l'implication du LPA1 dans les effets ostéogéniques du LPA (218). De plus, la Pertussis toxine, un inhibiteur de la voie Gi, bloque la prolifération et la différenciation induite par le LPA dans les ostéoblastes, montrant ainsi l'importance majeure de l'activation de LPA1/Gi dans les ostéoblastes (369,373,374). Ces résultats soutiennent donc l'hypothèse d'un rôle prédominant du LPA1 dans la réponse des cellules ostéoblastiques au LPA. L'activité PAL peut également être stimulée par une production autocrine de LPA par les ostéoblastes eux-mêmes à travers au moins deux mécanismes, l'un impliquant l'activation des récepteurs P2X7 évoqués plus haut et conduisant à une augmentation de l'activité PLD

CHAPITRE II : REVUE DE LITTÉRATURE SUR L'ACIDE LYSOPHOSPHATIDIQUE, UN MÉDIATEUR POTENTIEL DANS LE CONTRÔLE DE L'OSTÉOGENÈSE

et PLA2, et le second passant par l'intermédiaire de l'expression de l'autotaxine (375). Le phénotype osseux des souris *Lpar1*^{-/-} publié dans le laboratoire confirme l'ensemble de ces éléments (376). Les souris ont une masse osseuse diminuée et une ostéoporose sévère caractérisée par une diminution du volume trabéculaire osseux et une diminution de l'épaisseur de l'os cortical. Les travées au niveau des fémurs et des vertèbres sont moins épaisses, moins nombreuses avec une diminution importante des connectivités. L'activité ostéogénique et la minéralisation *in vitro* étaient significativement diminuées (376).

D'un autre côté, contrairement au LPA1, l'inhibition de l'expression du LPA4 dans les cellules souches mésenchymateuses humaines par interférence à l'ARN, stimule de manière significative l'ostéogénèse. De plus, les souris déficientes en LPA4 présentent une augmentation de la masse osseuse, caractérisée notamment par une élévation du volume trabéculaire osseux, confirmant ainsi l'effet inhibiteur du LPA4 sur l'ostéogénèse (218,339). La prévalence de l'action de l'un ou l'autre des récepteurs LPA1 et LPA4 semble particulièrement avoir une influence au cours des phases précoces de l'ostéoblastogénèse. En effet, des études ont montré que le LPA est capable de diminuer l'expression de PPAR γ 2 et d'altérer la différenciation adipocytaire des cellules préadipeuses. À l'inverse, l'effet anti-adipogénique du LPA était aboli dans les préadipocytes primaires des souris invalidées pour le LPA1, qui par ailleurs présentent une adipogénèse plus élevée que les souris contrôles (377). De façon cohérente, les souris traitées avec le Ki16425 présentent un surpoids et une adipogénèse accrue, comparativement aux souris contrôles nourries avec un régime riche en graisses (378). Ces données montrent donc que l'activation du LPA1 inhibe l'adipogénèse dans les cellules souches mésenchymateuses, et favoriserait par conséquent une réorientation de la différenciation vers la lignée ostéoblastique. Le LPA1 et le LPA4 présentent donc des fonctions opposées dans les ostéoblastes pendant le développement osseux. Les mécanismes moléculaires induits spécifiquement par le LPA4 dans l'ostéogénèse sont de mieux en mieux compris. Récemment un mécanisme moléculaire intéressant a été rapporté grâce à des modèles cellulaires mésenchymateux et préostéoblastique. En effet, il a été démontré que le LPA4 inhibe l'ostéogénèse en bloquant la signalisation RhoA / ROCK1 / β -caténine (379). La surexpression de ROCK1 stimule la différenciation ostéogénique en activant la voie Wnt/ β -caténine, diminue la différenciation adipocytaire et atténue l'inhibition de la différenciation ostéogénique causée par LPA4 (379). Cela peut donc laisser place à l'hypothèse selon laquelle, à l'inverse, les effets ostéogéniques du récepteur LPA1 pourraient découler d'une stimulation de la voie Wnt/ β -

CHAPITRE II : REVUE DE LITTÉRATURE SUR L'ACIDE LYSOPHOSPHATIDIQUE, UN MEDIATEUR POTENTIEL DANS LE CONTROLE DE L'OSTEOGENESE

caténine. Néanmoins, les voies cellulaires utilisées par le LPA1 pour produire ses effets sur les ostéoblastes sont loin être élucidées.

2.5. LPA et ostéocytogenèse

A ce jour, très peu d'études ont été réalisées sur le rôle spécifique du LPA dans l'ostéocytogenèse. On sait néanmoins qu'il stimule la formation de dendrites sur les cellules de type ostéocytaire MLO-Y4 (figure 24), phénomène déterminant dans l'ostéocytogenèse (380). La lignée MLO-Y4 exprime d'ailleurs majoritairement les récepteurs LPA1 et 2, et la formation des dendrites est bloquée en présence de Ki1625 et de la pertussis toxine, suggérant l'implication du récepteur LPA1 et de la voie Gi. Le LPA pourrait aussi être impliqué dans la cicatrisation de fractures, où il stimulerait la reformation de la connectivité mécanosensorielle des ostéocytes (380). Une étude protéomique plus récente a permis de mettre en évidence certains changements au niveau de l'expression des gènes et la distribution des protéines dans les dendrites des cellules MLO-Y4, induits par la stimulation au LPA (381). Cette étude a pu montrer un enrichissement en produits géniques associés à la régulation de la dynamique des microfilaments d'actine sous l'effet du LPA. Le LPA stimulerait dans les ostéocytes, les processus cellulaires qui contrôlent la distribution des protéines et la croissance des membranes, y compris la localisation des protéines, l'assemblage des complexes protéiques, le transport des vésicules de Golgi, le transport dépendant du cytosquelette et l'invagination / endocytose des membranes (381). Cela étant, une action du LPA pendant la transition ostéoblaste-ostéocyte ou dans la maturation des ostéocytes n'a jamais été mise en évidence à ce jour, de même que les mécanismes moléculaires induits par le LPA dans les ostéocytes restent à être élucidés.

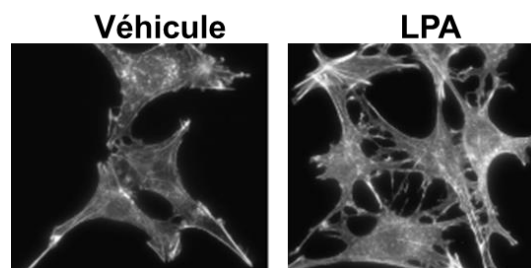


Figure 24 : Augmentation de la formation des dendrites dans les cellules ostéocytaires MLOY-4 sous l'effet du LPA. Images en microscopie à épifluorescence des cellules MLOY-4 stimulées par 1 μ M de LPA pendant 16 heures. Figure adaptée à partir de la référence (380).

OBJECTIF DE LA THESE

Comme nous venons de voir, le LPA est un médiateur lipidique dont les fonctions biologiques régulent l'homéostasie de nombreux organes, y compris l'os. L'exploration du modèle murin de souris (*Lpar1*^{-/-}) invalidée globalement pour le récepteur LPA1 et précédemment publiée dans le laboratoire a permis de mettre en évidence pour la première fois l'importance du LPA dans le développement osseux endochondrale, notamment pendant le modelage osseux. Cependant, en raison de l'expression ubiquitaire du récepteur LPA1, et de multiples autres facteurs, ce modèle ne permet pas de déterminer l'effet spécifique du LPA dans les cellules ostéoblastiques dont l'action est majoritaire au cours de la croissance.

Dans ce contexte, mon travail avait deux objectifs majeurs :

- Evaluer l'importance du récepteur LPA1 dans l'ostéogénèse pendant la croissance du squelette, dans un nouveau modèle de souris *Lpar1* Δ Ob, où l'expression du récepteur a été spécifiquement supprimée dans la lignée ostéoblastique. Pour ce faire, j'ai étudié les souris *Lpar1* Δ Ob et les souris contrôles, avec plusieurs approches : histologie, immunohistochimie, biologie moléculaire et cellulaire.
- Explorer *in vitro* les mécanismes impactés par l'absence du récepteur LPA1. Pour cela, j'ai réalisé des expériences de différenciation cellulaire à partir d'ostéoblastes primaires des souris *Lpar1* Δ Ob, de lignées ostéoblastiques immortalisées Ob-*Lpar1*^{fl/fl} et cl1-Ob-*Lpar1*^{-/-}, que j'ai ensuite analysées par des approches de biochimie et de biologie moléculaire.

CHAPITRE III: RESULTATS EXPERIMENTAUX

Article

Publié dans "Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids"

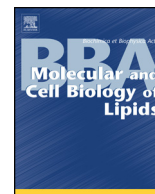
L'expression du récepteur de l'acide lysophosphatidique de type 1 dans la lignée cellulaire ostéoblastique contrôle à la fois la minéralisation osseuse et la spécification des ostéocytes

Candide A. Alioli^{1 *}, Léa Demesmay^{2 *}, Sara Laurencin¹, Nicolas Beton¹, Delphine Farlay², Helene Follet², Saber AMRI¹, François Duboeuf², Jerold Chun³, Richard Rivera³, Daniel Bouvard⁴, Irma Machuca-Gayet², Jean-Pierre Salles¹, Isabelle Gennero^{1 \$} and Olivier Peyruchaud^{2 \$ ¶}.

RESUME

L'acide lysophosphatidique (LPA) est un médiateur lipidique naturel dont les fonctions biologiques affectent de nombreux organes dont le tissu osseux. Le LPA apparaît comme une molécule intervenant sur les cellules du remodelage osseux, les ostéoblastes qui sont responsables de la formation osseuse, et les ostéoclastes qui résorbent l'os. Le LPA1 est le récepteur du LPA le plus omniprésent parmi les six membres de la famille des récepteurs LPA (LPA1-6). La participation du LPA dans l'ostéogenèse a été mise en évidence dans un modèle murin dans lequel l'expression de son récepteur LPA1 a été désactivé de façon globale (*Lpar1*^{-/-}). Ces animaux présentent un défaut de croissance et une déminéralisation osseuse. Pour mieux comprendre le rôle spécifique du LPA1 dans la lignée ostéoblastique, nous avons généré des souris dont l'expression de ce récepteur a été spécifiquement désactivée (*Lpar1*^{ΔOb}). De façon surprenante les souris *Lpar1*^{ΔOb} ne présentent pas les mêmes défauts osseux que les souris *Lpar1*^{-/-} mais ont révélé une baisse de la minéralisation osseuse et réduction de l'épaisseur de l'os cortical, ainsi qu'une augmentation de sa porosité. *In vitro*, les ostéoblastes primaires *Lpar1*^{ΔOb} et cl1-Ob-*Lpar1*^{-/-} immortalisés ont révélé une expression prématurée de la phosphatase alcaline, une prolifération cellulaire réduite associée à une diminution de l'accumulation nucléaire de YAP-P et une activité de minéralisation réduite. Par ailleurs, nous avons mis en évidence des altérations ostéocytaires au niveau du réseau lacuno-canaliculaire, et une réduction de l'expression des marqueurs ostéocytaires précoces de la différenciation (E11) et tardifs (DMP1, DKK1, SOST) ex vivo dans des fractions ostéocytaires enrichies à partir d'explants

osseux de souris *Lpar1 Δ Ob*. Ces altérations indiquent clairement un impact important sur les fonctions ostéocytaires. De plus, l'expression d'E11 et la formation de dendrite induites par le FGF2 sont nettement altérées à la fois dans les ostéoblastes primaires *Lpar1 Δ Ob* et immortalisés cl1-Ob-*Lpar1* *-/-*. Ces résultats suggèrent un nouveau rôle pour le LPA dans le contrôle de la masse osseuse via la minéralisation osseuse et la fonction des ostéocytes.



Expression of the type 1 lysophosphatidic acid receptor in osteoblastic cell lineage controls both bone mineralization and osteocyte specification[☆]

Candide A. Alioli^{a,1}, Léa Demesmay^{b,1}, Sara Laurencin-Dalacieux^a, Nicolas Beton^a, Delphine Farlay^b, Helene Follet^b, Amri Saber^a, François Duboeuf^b, Jerold Chun^c, Richard Rivera^c, Daniel Bouvard^d, Irma Machuca-Gayet^b, Jean-Pierre Salles^a, Isabelle Gennero^{a,2}, Olivier Peyruchaud^{b,*,2}

^a Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan INSERM UMR 1043, Toulouse, France

^b Pathophysiology, Diagnosis and treatments of bone diseases, INSERM UMR1033, Lyon, France

^c Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute, La Jolla, CA 90237, USA

^d Institute for Advance Biosciences, Grenoble, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Lpar1
LPA₁
Osteoblast
Osteocyte
Bone
Knockout mice

ABSTRACT

Lysophosphatidic acid (LPA) is a major natural bioactive lipid mediator whose biological functions affect multiple organs. These include bone as demonstrated by global *Lpar1*-knockout mice (*Lpar1*^{−/−}) which present a bone growth defect. LPA acts on all bone cells including osteoblasts, that are responsible for bone formation, and osteoclasts, which are specialized cells that resorb bone. LPA appears as a potential new coupling molecule during bone remodeling. LPA₁ is the most ubiquitous LPA receptor among the six LPA receptor family members (LPA_{1–6}). To better understand the specific role of LPA via its receptor LPA₁ in osteoblastic cell lineage we generated osteoblast-specific *Lpar1* knockout mice (*Lpar1*-ΔOb) by crossing *Lpar1*^{fl^{ox}/fl^{ox}} and *Osx:Cre*⁺ mouse lines. *Lpar1*-ΔOb mice do not recapitulate the bone defects of *Lpar1*^{−/−} mice but revealed reduced bone mineralization and decreased cortical thickness, as well as increased bone porosity associated with an augmentation in the lacunae areas of osteocyte and their apoptotic yield. *In vitro*, primary *Lpar1*-ΔOb and immortalized c11-Ob-*Lpar1*^{−/−} osteoblasts revealed a remarkable premature expression of alkaline phosphatase, reduced cell proliferation associated with decreased YAP-P nuclear accumulation, and reduced mineralization activity. Osteocyte specification is markedly impaired as demonstrated by reduced expression of early (E11) and late (DMP1, DKK1, SOST) osteocyte markers *ex vivo* in enriched osteocytic fractions of *Lpar1*-ΔOb mouse bone explants. In addition, E11 expression and dendrite formation induced by FGF2 are markedly impaired in both primary *Lpar1*-ΔOb and immortalized c11-Ob-*Lpar1*^{−/−} osteoblasts. Taken together these results suggest a new role for LPA in bone mass control via bone mineralization and osteocyte function.

Abbreviations: ALP, Alkaline phosphatase; Bglap, Osteocalcin; BMSC, Bone marrow mesenchymal cells; BSA, Bovine serum albumin; BSP, Bone sialoprotein; BV/TV, Bone volume over tissue volume ratio; CFU-F, colony-forming-unit-fibroblasts; Col1, Collagen 1; Cre, Cre recombinase; CTRL, Control; Cx43, Connexin 43; Dkk1, Dickkopf-related -protein-1; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; Dmp1, Dentin matrix protein 1; E11, Podoplanin; FBS, Foetal calf serum; FGF-23, Fibroblast growth factor 23; FGF2, Fibroblast growth factor 2; FTIRM, Fourier transform infrared microspectroscopy; GAPDH, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GFP, Green fluorescent protein; HBSS, Hank's balanced salt solution; Lats1/2, Large Tumor Suppressor Kinase 1/2; LDH, Lactate dehydrogenase; LPA, Lysophosphatidic acid; LPA1–6, LPA receptor 1–6; *Lpar1*, LPA receptor gene; Mepe, Matrix extracellular phosphoglycoprotein; MicroCT, Micro-computed tomography; MSC, Mesenchymal cells; MSD, Musculoskeletal diseases; Ob, Osteoclast; Opn, Osteopontin; *Osx*, Osterix; PBS, Phosphate buffer; PFA, Paraformaldehyde; PHEX, phosphate regulating endopeptidase homolog X-linked; PMMA, Polymethyl methacrylate; Ppargc1a/b, Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha/beta; qRT-PCR, Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction; Runx2, Runt-related transcription factor 2; SOST, Sclerostin; TAZ, Transcriptional co-activator with PDZ-motif; TBP, TATA-Box Binding Protein; YAP, Yes-associated protein 1

[☆] This article is part of a Special Issue entitled Lysophospholipids and their receptors: New data and new insights into their function edited by Susan Smyth, Viswanathan Natarajan and Colleen McMullen.

* Corresponding author.

E-mail address: olivier.peyruchaud@inserm.fr (O. Peyruchaud).

¹ indicates persons who contributed equally to this work.

² indicates persons who contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2020.158715>

Received 5 March 2020; Received in revised form 3 April 2020; Accepted 10 April 2020

Available online 21 April 2020

1388-1981/ © 2020 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Musculoskeletal diseases (MSD) are the most common disorders in the human population [1]. MSD have a paramount social and economic consequences because they exacerbate the impact of multimorbidity [2]. This indicates the need for better clinical care for patients with bone diseases. Bone is a complex tissue whose integrity is maintained throughout the life by the continuous process of bone remodeling [3]. This process is controlled by two cell types: osteoclasts that resorb bone, and osteoblasts that form new bone. Crosstalk and exchanges between these cells, under the influence of mechanical stimulation, immune cell action, and both paracrine and endocrine growth factors, control bone remodeling. Impaired coordination between osteoblasts and osteoclasts leads to an imbalance of bone remodeling that is responsible for multiple forms of MSD.

Lysophosphatidic acid (LPA) is a naturally occurring bioactive lipid with growth factor activity on a wide range of cells [4]. LPA's effects are mediated by six different G protein-coupled receptors (LPA₁₋₆). These receptors share intracellular signaling pathways dependent on Gα_i (LPA_{1,4,6}), Gα_{12/13} (LPA_{1,2,4,6}), Gα_q (LPA_{1,5}) and Gα_s (LPA_{4,6}) resulting in potentially redundant or opposing effects of LPA receptors on cell biology, which include cytoskeleton rearrangements, cell motility, survival, and both proliferation and differentiation [5]. Evidence that LPA is produced within bone tissue has been obtained in the context of bone metastasis wherein it acts as a paracrine factor stimulating cancer cell proliferation, cytokine secretion and osteoclastic bone resorption [6,7]. The therapeutic use of LPA and LPA derivatives in bone regeneration has been proposed recently [8]. However, most eukaryotic cells, including bone cells, express various forms of LPA receptors [9–11]. As a consequence, activation of different cell types in bone may undermine the complex mode of action of LPA in bone pathophysiology due to pleiotropic activities of LPA through co-activation signals from multiple receptors. Understanding the role of each type of LPA receptor in bone cell functions *in situ* is crucial for more effective therapeutic applications in MSD.

LPA₁ is the most ubiquitous LPA receptor in mammals [12]. Global deletion of the LPA₁ gene in mice (*Lpar1*) and zebrafish (*lpa1*) alters the growth of animals as a consequence of chondrocyte proliferation and bone formation defects [9,13]. However, analyses of the *Lpar1*^{−/−} mouse global phenotype have revealed a large spectrum for LPA function in general homeostasis. *Lpar1*^{−/−} mice have major neurological defects [14] with an additional alteration in olfactory bulb maturation that markedly impairs food intake [15]. These mice also exhibit adipogenesis and glucose tolerance defects [16]. Bone development is very sensitive to metabolic changes such as those that occur in obesity and diabetes [17]. The dietary deficiencies and poor metabolic regulation observed in *Lpar1*^{−/−} mice are therefore likely to compromise bone homeostasis. Furthermore, LPA₁ is expressed in almost all cell types present in the bone microenvironment, osteoblasts [9], osteoclasts [10], osteocytes [11], chondrocytes [13] and adipocytes [16]. Thus, the bone phenotype of *Lpar1*^{−/−} mice is likely to be a consequence of multiple constraints on bone remodeling.

In order to evaluate the specific role of LPA₁ expressed by osteoblasts during bone development we generated *Osx-Cre:GFP/Lpar1*^{fl/fl} (Δ LPA₁^{Osx}) mice that exhibited tissue-specific deletion of *Lpar1* in osteoblastic cell lineage. Micro-computerized tomography measurements, bone histology and confocal microscopy analyses of Δ LPA₁^{Osx} mice associated with primary and immortalized Δ LPA₁^{Osx} bone cell biology investigations revealed that osteoblastic expression of LPA₁ controls bone quality through osteocyte behavior but not bone growth.

2. Materials and methods

2.1. Mice

Mice with a specific deficiency of *Lpar1* in the osteoblastic cell

lineage (*Lpar1* Δ Ob) were generated by using the Cre/loxP strategy. C57B6J carrying loxP sites flanking exon 3 of the LPA₁ receptor gene, *Lpar1*^{fl/fl} mice, recently generated by J. Chun and R. Rivera [18] were crossed with BALB/c heterozygous mice expressing Cre-recombinase driven by the osterix promoter (*Osx1-GFP::Cre/+* mice) obtained from Dr. Andrew P. McMahon, Harvard University, Cambridge, USA [19].

2.2. Ethics statement

Mice were housed in pathogen-free conditions in the Experimental Therapy Units in Toulouse (INSERM US 006 ANEXPLO/CREFRE) in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the European Council and under the supervision of the authorized investigators. All protocols involving animal experimentations were approved by the Animal Care and Ethics Committee of US006/CREFE (CEEA-122; application number APAFIS#5122–20,160,420 17,274,859 v2).

2.3. Mouse genotyping and real-time PCR

The genotype of all experimental mice was determined by PCR analysis of genomic DNA extracted from tail or ear biopsies using the following primers: Cre transgene: forward 5'-CCTGGAATGCTTCTGTCGGTTTGCC-3' and reverse: 5'-GAGTTGATAGCTGGCTGGTGGCAGATG-3'; *Lpar1* allele: 5'LoxP forward: 5'-GTTGGGACATGGATGCTATTC-3', Internal forward 1: 5'-AGACTGTGGTCATTGTGCTTG-3', 3'LoxP reverse: 5'-GGTTTAGTGGTGTGGGATCG-3'. Total RNA from OC cultures and from powdered whole bone was extracted using Trizol (Invitrogen AB) and the Nucleospin RNAII kit (Macherey-Nagel). Complementary DNA from OC and bones were synthesized by reverse transcription using the iScript cDNA Synthesis kit (Biorad). Expression of target genes was quantified by qRT-PCR using the Biorad CFX Connect Real Time PCR Detection System with the iTaq Universal SYBR Green Supermix (Biorad) and sets of specific primers. Quantifications were normalized to TBP values and expressed as relative expression using the 2^{−(Delta Delta C(T))} method (27). Primer sequences are indicated in Table 1.

2.4. Micro-computed tomography (μ CT)

Three-dimensional (3D) microarchitecture of the distal metaphyseal femur and cortical midshaft were carried out using a Skyscan 1176 micro-CT scanner (Skyscan Inc.). The X-ray excitation voltage was set to 50 kV with a current of 500 mA. A 0.5 mm aluminum filter was used to reduce beam-hardening artifacts. Samples were scanned in 70% ethanol with a fixed voxel size of 9.08 μ m. Section images were reconstructed with NRecon software (version 1.6.1.8, Skyscan). The region of interest to delineate trabecular bone was drawn manually away from the endocortical surface, starting at 0.3 mm of underneath the growth plate and ending at 1.3 mm. For cortical analysis, 0.5 mm on either sides of the femur midshaft were reconstructed. The global threshold was set at 0.394 g HA/cm³. Three-dimensional modeling and analysis of bone, vertebra length and bone volume to tissue volume (BV/TV) were obtained with the CTAn (version 1.9) and CTVol (version 2.0) softwares.

2.5. Digitized microradiography

The technique of digitized microradiography was used to measure the degree of mineralization of bone (DMB) and its heterogeneity index [20]. Briefly, 50 μ m-thick bone sections were analyzed with a Hamamatsu L9421–02 Microfocus X-ray system tube with a power maximum of 8 W, a copper anode, a nickel filter, a beryllium window of 150 μ m and a focal spot size of 5 μ m in diameter. The exposure parameters were high voltage: 40 kV, current: 50 μ A, and power of 2 W. The detector was a Photonic Science FDI VHR 11 M CCD camera with an active area of 36 × 24 mm (4008 × 2671 pixels). The scintillator was

Table 1
List of primer sequences.

Target	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
<i>Lpar1</i>	CCAGGAGGAATCGGGACAC	CAATAACAAGACCAATCCCGGA
<i>Lpar2</i>	GTCAAGACGGTTGTCATCATTCT	GAAGCATGATCCGCGTGCT
<i>Lpar3</i>	ACAAAGCTTGTGATCGTCCTGT	TCATGATGGACATGTGCTTTCC
<i>Lpar4</i>	GCATTGTTGACATTAGTGGTGA	AACCTGGCCCTCTCTGATT
<i>Lpar5</i>	CCGTACATGTTTCATCTGGAAGAT	CAGACTAATTTCTCTCCACCT
<i>Lpar6</i>	TGGCATATGGCTGTACACCTA	GGGGATTCTGCACAAGTGAT
<i>Alpl</i>	CGGATCCTGACCAAAACC	TCATGATGTCGGTGGTCAAT
<i>Bsp2</i>	GAAAATGGAGACGGCGATAG	CATTGTTTTCTCTTCGTTTGA
<i>Col1</i>	GCCTTGGAGGAACTTGTCTT	CACGGAACCTCAGCTGATTTT
<i>Dkk1</i>	CCGGGAACCTACTGCAAAAAT	CCAAGGTTTTCAATGATGCTT
<i>Dmp1</i>	CATTCTCTTGTGTTCTTTTG	TCAGTATTGTGGTATCTGGCAACT
<i>E11</i>	GCCAGTGTTGTTCTGGGTTT	TCTCCTGTACCTGGGGTCAC
<i>Cx43</i>	GTGCCGGCTTCACTTTCA	GGAGTAGGCTTGGACCTTGTC
<i>Mepe</i>	GATGCAGGCTGTGCTGTG	TCCTGTCTTCATTTCGGCAAT
<i>Bglap</i>	AGACTCCGGCGCTACCTT	CTCGTCACAAGCAGGGTTAAG
<i>Opn</i>	GGAAACCAGCCAAGGTAAGC	TGCCAATCTCATGGTCGTAG
<i>PHEX</i>	CTGCCAGAGAACAAAGTGCAA	AATGGCACCATTGACCCTAA
<i>SOST</i>	TCCTGAGAACACACAGACCA	GCAGCTGTACTCGGACACATC
<i>TBP</i>	TCTGAGAGCTCTGGAATGTACCG	TGATGACTGCAGCAATCGCTTG

Gd2O₂S:Tb, and an aluminum filter of 12 μm was used. The image digitization step was made with a 12-bit digital image detector (pixel size: 9 μm , object pixel size: 0.83 μm). A threshold of 0.8 g/cm³ was used. The mean DMB were expressed in g mineral/cm³. Cortical porosity was measured on X-ray images with ImageJ software. A threshold was applied (Li method) and the thresholded image then was then segmented outline selected. The cortical porosity was assessed using weighting by the total number of pixels analyzed. For the quantification of the sizes of pores, each pore was automatically outlined and identified by a digit. Areas of pores were expressed in μm square (μm^2). The size of the different pores was measured and the distribution of the sizes of their size was generated.

2.6. Fourier transform infrared microspectroscopy (FTIRM)

Analysis of the intrinsic material properties of bone was performed on cortical bone as previously described [21,22]. Briefly, thin bone sections from blocks embedded in PMMA (2 μm thick) were longitudinally cut with a polycut in proximal tibia, and analyzed in transmission mode with a Perkin-Elmer GXII Auto-image Microscope (Norwalk, CT, USA) equipped with a wide band detector (mercury-cadmium-telluride; 7800–400 cm^{-1}). A Cassegrain objective with a numerical aperture of 0.6 was used with a spatial resolution of 10 μm at typical mid-infrared wavelengths. Ten areas (50 $\mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$) in metaphysis and 10 in diaphysis were scanned. After curve-fitting of infrared spectra, 4 variables were measured: mineral maturity, crystallinity, mineral/organic ratio, and collagen maturity. Each spectrum was collected at 2 cm^{-1} resolution, and 40 scans by spectrum were performed in the transmission mode. The contributions of air and PMMA were subtracted from the original spectrum, baseline adjusted and curve-fitted with Python software [23]. The following parameters were determined: the mineral crystallinity (cryst), which is inversely proportional to the full width at half-maximum of the 604 cm^{-1} peak (apatite phosphate environment $\nu_4\text{PO}_4$) and corresponds to both crystal size and perfection [22], the mineral to organic ratio (min/org) i.e. the area ratio of the bands of mineral matrix over organic matrix (1184–910 cm^{-1} /1712–1592 cm^{-1}) [24], the mineral maturity (min mat) which is calculated as the area ratio of the apatite phosphate over non-apatite phosphate (1030/1110 cm^{-1} area ratio) and reflects the age of mineral [22], and the collagen maturity (coll mat) which is calculated as the ratio of organic matrix bands (1660/1690 cm^{-1} area ratio) [21]. Results are expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD).

2.7. Quantification of YAP nuclear localization

Cells were immunostained as recently described [25] with an anti YAP and images acquired with a confocal laser scanning microscope (Zeiss LSM510) equipped with a 63 $\times$ plan-Apochromat oil immersion objective (n.a. 1.4) and a pinhole set to one Airy. On each cell image, a region of interest (ROI) was defined either within the nucleus, or in the cytoplasmic area next to the nuclear envelope. As the ROI thickness in the two positions was likely to be identical, the average fluorescence intensity should be proportional to YAP concentration in that area and was estimated using the Fiji public software. Within the same cell, the ratio of the fluorescence intensities in the nucleus *versus* the cytoplasmic area reflects the YAP concentration ratio in the two compartments. This ratio was represented with a logarithmic scale to have an identical range of positive and negative ratios. Measurements were performed with $n \geq 50$ (unless otherwise indicated) and differences were compared with the Student's *t*-test. Boxplots were generated with the R public software.

2.8. Quantification of Rac1 localization

Cells were immunostained with an anti Rac1 and images acquired with a confocal laser scanning microscope (Zeiss LSM510) equipped with a 63 $\times$ plan-Apochromat oil immersion objective (n.a. 1.4) and a pinhole set to one Airy. On each cell image, a line profiling was acquired using Fiji software. Cell border was defined and used to set the origin. Measurements were performed with $n \geq 50$ and differences were compared with the Student's *t*-test.

2.9. Cell cultures and FGF2 experimental procedure

Mouse BMSC were isolated from the bone marrow of femurs and tibias of control and *Lpar1* ΔOb mice as previously described [26]. Cells were maintained in Alpha Modified Eagle's Medium alpha (αMEM) with 10% (v/v) FBS, 100 U/ml penicillin and 0.1 mg/ml streptomycin at 37 $^\circ\text{C}$. For the colony-forming-unit assay, nucleated cells from the bone marrow were seeded at 6×10^5 cells per cm^2 and cultured for up to 14 days in the same medium, additionally supplemented with ascorbic acid (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and beta-glycerophosphate (10 mM).

Control and *Lpar1* ΔOb mice primary osteoblasts were isolated as previously described [27] and maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) with 100 U/ml penicillin and 0.1 mg/ml streptomycin at 37 $^\circ\text{C}$. Ob-*Lpar1*^{fl/fl} and cl1-Ob-*Lpar1*^{-/-} immortalized osteoblast were cultured in αMEM with 10% (v/v) heat inactivated FBS,

100 U/ml penicillin and 0.1 mg/ml streptomycin. For induction of osteogenic differentiation, Ob-*Lpar1*^{fl/fl} and cl1-Ob-*Lpar1*^{-/-} cells were seeded and cultured until they reached confluence. The medium was then supplemented (day 0) with ascorbic acid (50 µg/ml) and beta-glycerophosphate (10 mM) for 21–30 days. For induction of osteocytogenesis, primary and immortalized osteoblasts were seeded, then at the subconfluence (day 0), the culture media were replaced with 1% (v/v) FBS supplemented medium, and 10 ng/ml FGF2 (bFGF, Thermo Fisher Scientific) in 0.1% bovine serum albumin (BSA). Cells were treated with FGF2 or 0.1% BSA as vehicle and harvested after 4 h for RT-qPCR analysis or after 24 h for western blot analysis using a mouse podoplanin antibody (R&D Systems). For actin filament visualization, the cells were fixed in 4% PFA, rinsed in PBS and permeabilized in 0.1% (w/v) triton X-100 (Sigma) in PBS for 15 mins after vehicle or FGF2 challenge for 72 h. The cells were rinsed and incubated with 0.6 unit/mL of Alexa Fluor 488-conjugated phalloidin (Thermo Fisher Scientific) (in PBS with 0.1% BSA) in the dark at RT for 2 h.

2.10. Ex-vivo osteocyte enriched bone preparation

Osteocytes enriched samples were obtained following as previously described [28]. Briefly, bone pieces from 4 mice femurs and tibias were harvested and flushed with PBS to eliminate the bone marrow, and the trabecular bones cut and removed. The remaining diaphyses samples were serially digested in α -MEM containing 1 mg/ml of collagenase II (Thermo Fisher Scientific) on a rocking platform at 90 oscillations per min at 37 °C for 30 min. The digestion solution containing osteoblasts, osteoclasts and other peripheral cells was discarded, and the samples were washed in HBSS. This experiment was repeated four more times and the digested samples were rinsed, plated and incubated for 24 h in the primary osteoblast culture medium. Samples were then harvested for RT-qPCR experiments.

2.11. Histology

For histological preparations, the cortical femurs from 3 week old CTRL and *Lpar1* Δ Ob mice were isolated, fixed in 4% paraformaldehyde for 24 h, dehydrated in 70% Ethanol and decalcified in 14% EDTA for 3 weeks. The paraffin embedded tissue samples were cut into 5 µm sections and stained with Hematoxylin/eosin and analyzed with a Panoramic 250 Flash III scanner (3DHISTECH Ltd). For each femur sample, three sections were cut into three independent plans. ImageJ software (NIH) was used to count the number of osteocytes per mm² and to measure the surface of osteocyte lacunae (in µm²). Each measure was repeated in four randomly selected areas per plan and the average of the three plans was calculated for each mouse. A TUNEL apoptosis assay was then performed using an *in-situ* Cell Death Detection Kit (Roche, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions. TUNEL positive osteocytes (in brown) and the living cells (in blue) were counted in four randomly selected area and the ratio positive/living cells (%) was calculated for each mouse. The presence of cleaved Caspase-3 (Asp175) was examined by immunohistochemistry using a monoclonal rabbit anti-mouse antibody (R&D systems) as primary antibody. A biotinylated goat anti-rabbit (Abcam) was used as secondary antibody, and visualized using the peroxidase-conjugated streptavidin-biotin system (Vectastain). Diaminobenzidine (Abcam) chromogene substrate was used to visualize positive cells as brown and hematoxylin eosin was used as counterstaining. The ratio (%) of positive osteocytes from four randomly selected area was calculated for each mouse with ImageJ software.

2.12. Confocal osteocyte imaging and quantification

30 µm thick cryo sections of decalcified femurs from both genotypes were labeled for 1 h with Alexa Fluor 488 Phalloidin (Life Technologies) and DAPI from (Roche) and then mounted in Fluorsave

Reagent (Calbiochem). Image acquisition was performed at high voxel resolution with a Zeiss LSM 880 laser scanning confocal microscope, using an Objective Plan-Apochromat Oil DIC M27. Z stack images were deconvoluted using Huygens Scientific Volume Imaging (B.V. Netherlands) and 3-D reconstruction and dendrite quantification was assessed using Bitplane Imaris 9.3 software (Oxford Instruments).

2.13. Isolation, immortalization, infection, and in vitro Cre-mediated deletion of osteoblasts

Experiments were carried out using the procedure as previously described [29]. Briefly, a primary mouse osteoblast-enriched cell population was isolated from newborn calvaria using a mixture of 0.3 mg/ml collagenase type I (Sigma-Aldrich) and 0.25% trypsin (Invitrogen). Cells were grown in α -MEM medium containing 10% FCS. Primary osteoblasts (passage 2) were immortalized by transduction with a retrovirus expressing the large SV40 T antigen, cloned, and then tested for their ability to induce alkaline phosphatase upon differentiation. *Lpar1*^{fl/fl} immortalized osteoblasts were infected with an adenoviral supernatant encoding the Cre recombinase for 1 h in PBS supplemented with 2% FBS and 1 mM MgCl₂.

3. Results

3.1. Selective *Lpar1* deletion in osteoblasts affects bone morphometric parameters

Conditional knockout mice for *Lpar1* in the early osteoblastic cell lineage (*Lpar1* Δ Ob) were generated by crossing *Lpar1*^{fl/fl} animals [18] with *OsxCre*^{+/-} mice (CTRL) whose Cre recombinase is driven by the osterix (*Osx*) promoter [19]. We choose the *Osx* promoter as a driver for the Cre-recombinase expression because its activation follows Runx2 activation, which engages mesenchymal stem cells into the osteoblastic lineage. *Lpar1* expression was significantly decreased in the bone of *Lpar1* Δ Ob mice without affecting the expression of genes coding for any other types of LPA receptors (Fig. 1A). In addition, major tissues that are well-known to express LPA₁ (heart, brain, lungs, intestine) did not show significantly altered expression of *Lpar1* in *Lpar1* Δ Ob mice indicating the specificity of our animals for investigating the role of LPA₁ expressed by cells of the osteoblastic lineage on bone development.

Mice with global deletion of *Lpar1* (*Lpar1*^{-/-}) revealed an osteoporotic phenotype at 4 weeks of age without significant differences between males and females [9]. Since then, no studies have further characterized the bone phenotype of *Lpar1*^{-/-} mice. We therefore decided to focus our study on one-month-old female mice. *Lpar1* Δ Ob mice showed a mild growth retardation phenotype as judged by a significantly shorter length of the femurs (6% reduction) and smaller size of vertebral plates (11% reduction) compared to controls (Fig. 1C-D). Interestingly, no significant alteration of the bone mass was detected in *Lpar1* Δ Ob mice even though we observed a trend for decreased values of BV/TV (Fig. 1E) and trabecular thickness (Fig. 1F) parameters indicating a marginal impact on trabecular bone remodeling (Fig. 1D). By contrast, femur cortical bone thickness was significantly decreased in *Lpar1* Δ Ob mice as compared to CTRL mice (Fig. 1F-G).

3.2. Altered osteoblast differentiation and defective mineralization in *Lpar1* Δ Ob mice

To investigate the impact of *Lpar1* osteoblast selective deletion at the cellular level, bone marrow MSCs (mesenchymal stem cells) were derived from CTRL or *Lpar1* Δ Ob mice, and cultured under osteogenic conditions. *Lpar1* Δ Ob cultures displayed a lower number and size of fibroblastic methylene blue stained colonies than CTRL, suggesting a defect in early progenitor cell proliferation. Conversely the number of Alkaline Phosphatase (ALP) positive colonies (CFU-AP) in *Lpar1* Δ Ob was higher than in CTRL (Fig. 2A-B). The monitoring of ALP activity by

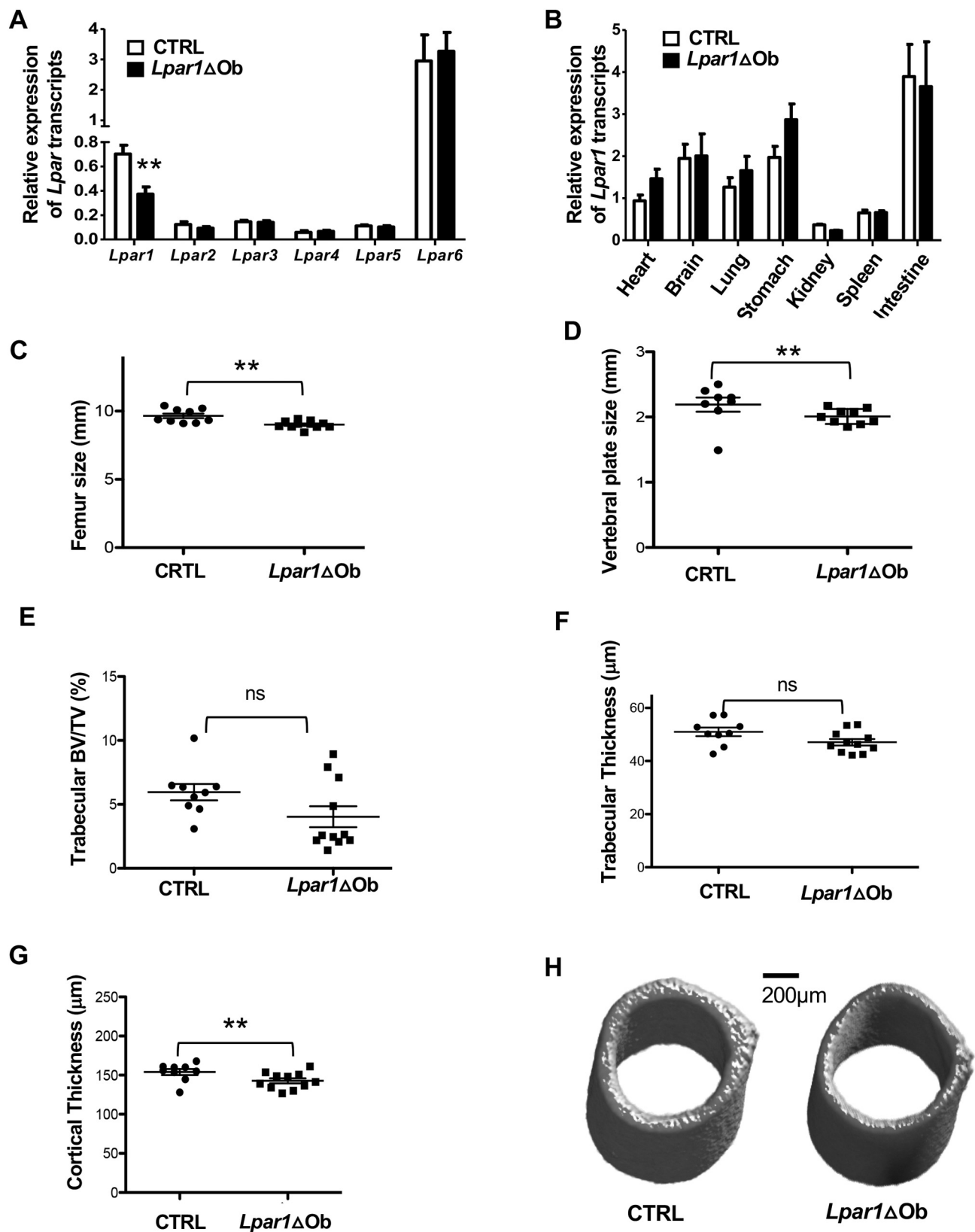
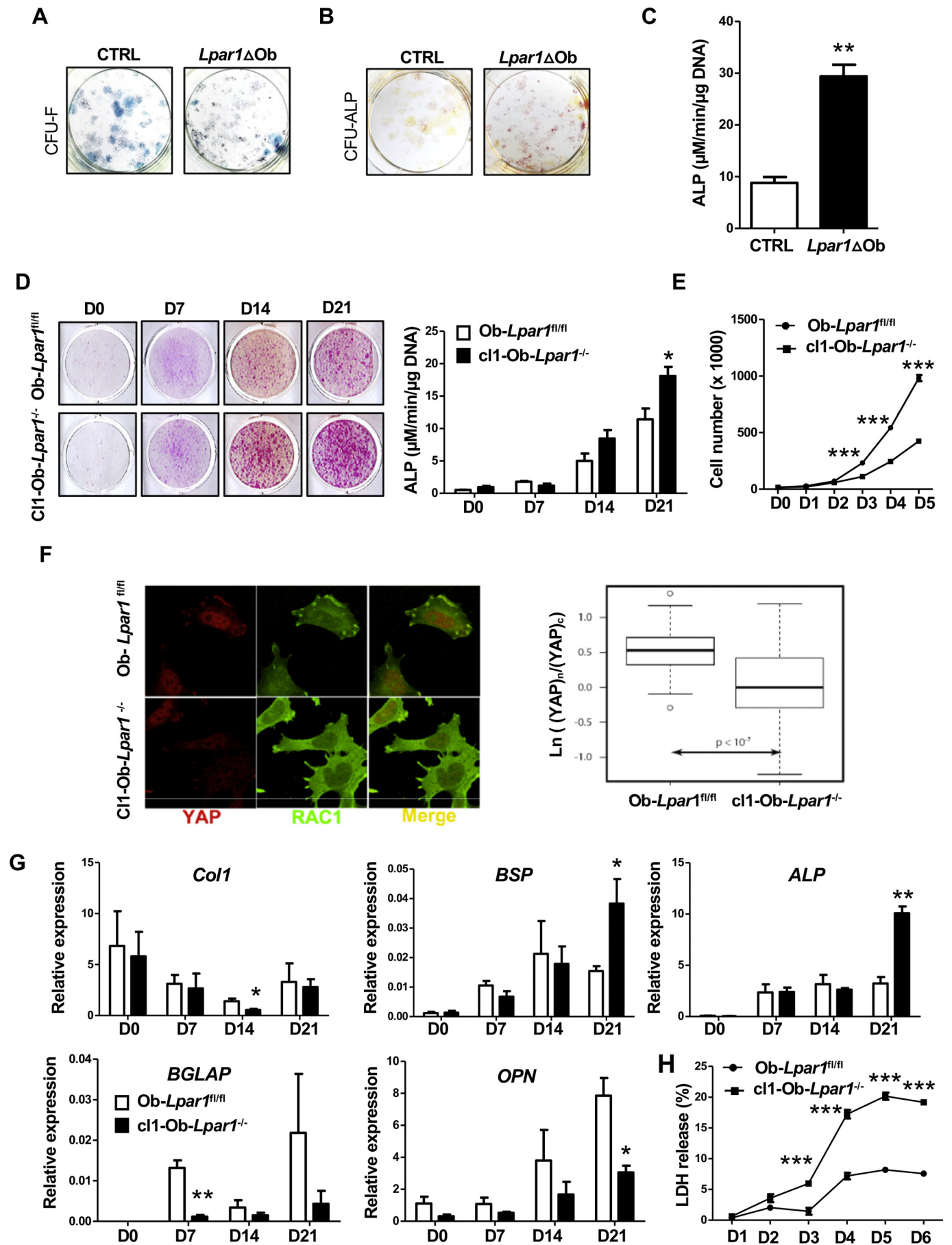


Fig. 1. *Lpar1* selective deletion in osteoblasts affects bone morphometric parameters. **A**- Real-time expression of LPA receptor transcripts in bone, values are the mean $\pm$ SEM ** p < 0,01 assessed by ANOVA. **B**- Real-time expression of *Lpar1* transcript levels in various tissues and selective *Lpar1* deletion in osteoblasts. **C**- For mice analysis samples were respectively CTRL n = 9 and *Lpar1*ΔOb n = 11 -femur and **D**-vertebra size values of 1 month old female mice from each genotype, * p < 0,005 assessed by Mann-Whitney test. **D**- Bar charts of trabecular bone mass quantification showing BV/TV values of CTRL and *Lpar1*ΔOb mice from femur microcomputed tomography (μCT) analysis CTRL n = 9 and *Lpar1*ΔOb = 11 assessed by Mann-Whitney test. **E**- Bar charts of femur cortical thickness values from CTRL and *Lpar1*ΔOb mice * p < .05 assessed by Mann-Whitney test. **F**- Representative 3D-μCT reconstruction images of midshaft femur cross section from CTRL and *Lpar1*ΔOb mice.



(caption on next page)

Fig. 2. *Lpar1*-deficient osteoblasts showed reduced proliferation, increased ALP activity and altered differentiation. Primary mouse BMSCs from 3 week old CTRL and *Lpar1* Δ Ob mice were cultured in osteogenic differentiation medium for 21 days and corresponding cells were (A) stained with methylene blue for total number of colony-forming-unit-fibroblasts (CFU-F) and B- stained for Alkaline Phosphatase (ALP) for total number of CFU-ALP. C- ALP dosage of CTRL and *Lpar1* Δ Ob D21 Ob. D- Preosteoblasts immortalized clones Cl1-Ob-*Lpar1* $^{-/-}$ and Ob-*Lpar1* $^{fl/fl}$ were plated at the same density, cultured in the non-osteogenic medium and at each time-point, cells were counted $n = 3$. ALP activity was analyzed by either staining of osteogenic culture or by colorimetric dosage at each time-point. E- *Lpar1* deficiency induced ALP activity increase in early osteoblasts. Cl1Ob-*Lpar1* $^{-/-}$ and Ob-*Lpar1* $^{fl/fl}$ clones were cultured in the osteogenic medium for 21 days and ALP activity was analyzed by staining and colorimetric dosage at days 0,7,14 and 21, $n = 3$. values are the mean $\pm$ SEM * $p < .05$ assessed by Mann-Whitney test. F-Immunostaining of Yap (red) and Rac1 (green) on Cl1-Ob-*Lpar1* $^{-/-}$ and Ob-*Lpar1* $^{fl/fl}$ clones Scale bar statistical analysis of YAP nuclear to cytoplasmic ratio. Data are represented on a logarithmic scale. $n = 50$; statistical significance of differences was assessed by a two-tailed unpaired Student's *t*-test, and the box plot is representative of three independent experiments. G- Cl1-Ob-*Lpar1* $^{-/-}$ and Ob-*Lpar1* $^{fl/fl}$ clones were cultured in the osteogenic medium. Real-time PCR showing relative expression levels of osteoblast differentiation markers; values are the mean $\pm$ SEM * $p < .05$, ** $p < .01$ assessed by Mann-Whitney test. H- Cl1-Ob-*Lpar1* $^{-/-}$ and Ob-*Lpar1* $^{fl/fl}$ cells were plated at the same density for 6 days and fluorimetric LDH release assay was performed following serum starvation to assess cell viability, values are the mean $\pm$ SEM *** $p < .001$ assessed by Mann-Whitney test.

an enzymatic assay in *Lpar1* Δ Ob osteoblasts confirmed the increased ALP expression over that of CTRL (Fig. 2 C). To facilitate the follow-up of *Lpar1*-depleted osteoblast cell differentiation *in vitro*, *Lpar1* $^{fl/fl}$ primary calvaria osteoblasts were immortalized and used as controls (Ob-*Lpar1* $^{fl/fl}$) or subsequently deleted for *Lpar1* by adenovirus infection driving Cre expression, generating *Lpar1* $^{-/-}$ osteoblasts (clone cl1-Ob-*Lpar1* $^{-/-}$).

Time sequential ALP staining of Ob-*Lpar1* $^{fl/fl}$ and cl1-Ob-*Lpar1* $^{-/-}$ osteogenic cultures showed an overall increase of ALP staining and activity significant at end point, but visible at day 7 suggesting a delayed differentiation (Fig. 2D). Proliferation curves showed a significantly proliferation defect at days 3, 4 and 5 for cl1-Ob-*Lpar1* $^{-/-}$ with respect to Ob-*Lpar1* $^{fl/fl}$ (Fig. 2E). In addition, cl1-Ob-*Lpar1* $^{-/-}$ displayed a significant decrease in cell viability compared to Ob-*Lpar1* $^{fl/fl}$ (Fig. 2H). These results, combined with the data obtained with *Lpar1* Δ Ob derived from MSCs, highlight the importance of LPA₁ expression for tuning osteoblast proliferation *versus* cell differentiation.

YAP/TAZ activation is required for the expression of some LPA-induced genes and plays a critical role in cell proliferation in response to LPA [30]. YAP/TAZ is activated by $G\alpha_{12/13}$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_{q/11}$ that are also hallmark transducers of intracellular signals of LPA₁ activation [30]. YAP promotes osteogenesis by controlling cell proliferation in the Ob-cell lineage and suppressing adipogenesis [31]. Further studies have shown the crucial role of YAP expression and its rac1-dependent cellular localization in growth and proliferation pathways. Accordingly, Ob-*Lpar1* $^{fl/fl}$ and cl1-Ob-*Lpar1* $^{-/-}$ osteoblasts were examined by immunolabeling for their YAP and rac1 expression and cellular localization upon fibronectin adhesion (Fig. 2F). Ob-*Lpar1* $^{fl/fl}$ displayed YAP nuclear localization as well as accurate rac1 binding to focal adhesion structures, but conversely in cl1-Ob-*Lpar1* $^{-/-}$ osteoblasts, YAP and Rac1 were found to be diffused throughout the cytoplasm. Quantification of the YAP nuclear/cytoplasmic ratio showed a significantly decrease in cl1-Ob-*Lpar1* $^{-/-}$ *versus* Ob-*Lpar1* $^{fl/fl}$ ($n = 50$) indicating a strong mis-regulation of the YAP pathway. Overall, these results suggest that alteration of the LPA/LPA₁/YAP pathway may result in reduced survival of cells in the osteoblast lineage.

To further study the impact on differentiation of *Lpar1* deletion in osteoblasts, time course expression of major osteogenic markers was assessed (Fig. 2G). In cl1-Ob-*Lpar1* $^{-/-}$, ALP and BSP were found to be elevated at the end point of differentiation whereas Col1, Bglap and Opn were significantly decreased compared to *Lpar1* $^{fl/fl}$ osteoblasts. Overall, sequential osteogenic gene expression is disturbed when *Lpar1* is lacking in osteoblasts, suggesting a delay in osteoblast maturation. Cl1-Ob-*Lpar1* $^{-/-}$ cells revealed a remarkable decrease in cell viability compared to Ob-*Lpar1* $^{fl/fl}$ cells as judged by a significant increase in LDH release starting from D3 after starvation (Fig. 2H).

3.3. Hypomineralization phenotype of *Lpar1* Δ Ob mice

We have shown that cl1-Ob-*Lpar1* $^{-/-}$ cells display up-regulated ALP transcript levels compared to *Lpar1* $^{fl/fl}$ osteoblasts during osteogenic differentiation. Because ALP is involved in matrix mineralization,

we then monitored the ability of cl1-Ob-*Lpar1* $^{-/-}$ to mineralize the matrix *in vitro* using Alizarin Red staining. In comparison to *Lpar1* $^{fl/fl}$ osteoblasts Cl1-Ob-*Lpar1* $^{-/-}$ cells showed a strong delay in the time course to achieve bone matrix mineralization (Fig. 3A). This last result prompted us to investigate to what extent bone mineral properties are affected in *Lpar1* Δ Ob mice with respect to CTRL mice. MicroCT analysis revealed that cortical femur bone mineral density (BMD) values from *Lpar1* Δ Ob mice were significantly lower than those of CTRL mice (Fig. 3B) and suggested an hypomineralization in *Lpar1* Δ Ob bones. Indeed, the degree of bone mineralization measured by X-ray micro-radiography analysis on tibia cortical sections confirmed a significant decrease in mineral content in *Lpar1* Δ Ob *versus* CTRL long bones (Fig. 3C), further supported by a lower mineral/organic ratio quantified by FTIRM bone analysis (Fig. 3D). Taken together, these data indicate that *Lpar1* deficiency in osteoblasts results in a defect of bone mineralization.

3.4. Bone cortical defect in *Lpar1* Δ Ob mice

The hypomineralization and reduced cortical thickness observed on *Lpar1* Δ Ob long bones suggest that *Lpar1* deficiency in osteoblastic cell lineage might could potentially deeply impact on cortical bone quality and structure. In order to examine this point, we analyzed cortical bone structure and cellular content. Cortical porosity of both femurs and tibias were assessed by two different technical approaches. Cortical porosity was first assessed by μ CT analysis at the midshaft of the femurs. *Lpar1* Δ Ob bones revealed a significantly higher cortical porosity than those of CTRL (Fig. 4A). Consistently, microradiography digitized image analysis showed that *Lpar1* Δ Ob tibia cortical porosity was significantly higher than *Lpar1* $^{fl/fl}$ tibia transverse sections, which resulted in an increased number of pores in the range of osteocyte lacunae (Fig. 4B).

The cellular content of compact bone is mainly composed of osteocytes (90%), which are fully differentiated osteoblasts embedded in the bone matrix [32]. Consequently, specific *Lpar1* deletion in osteoblast could potentially affect the osteocyte phenotype. To provide more insights into the cortical bone defect in *Lpar1* Δ Ob mice, osteocyte distribution and viability were assessed by histological analyses of cortical bone performed on midshaft femur sections. Similar numbers of osteocytes per mm² were found in both genotypes whereas the mean size of osteocyte lacunae areas appeared to be larger in the bone of *Lpar1* Δ Ob mice than CTRL mice, confirming previous X-ray microradiography digitized imaging results (Fig. 4C). These results suggest altered osteocyte behavior in *Lpar1* Δ Ob mice. This hypothesis was further supported by histological analyses of cortical bone sections stained for TUNEL and cleaved Caspase-3 assays showing a significant increase in the number of TUNEL-positive (Fig. 4D) and activated Caspase 3-positive cells/mm² (Fig. 4E) in *Lpar1* Δ Ob cortical bone compared to CTRL. These results indicate for the first time that altered LPA₁ signaling in osteoblastic cell lineage promotes osteocyte apoptosis *in vivo*.

Osteocytes are endocrine cells that orchestrate bone remodeling and

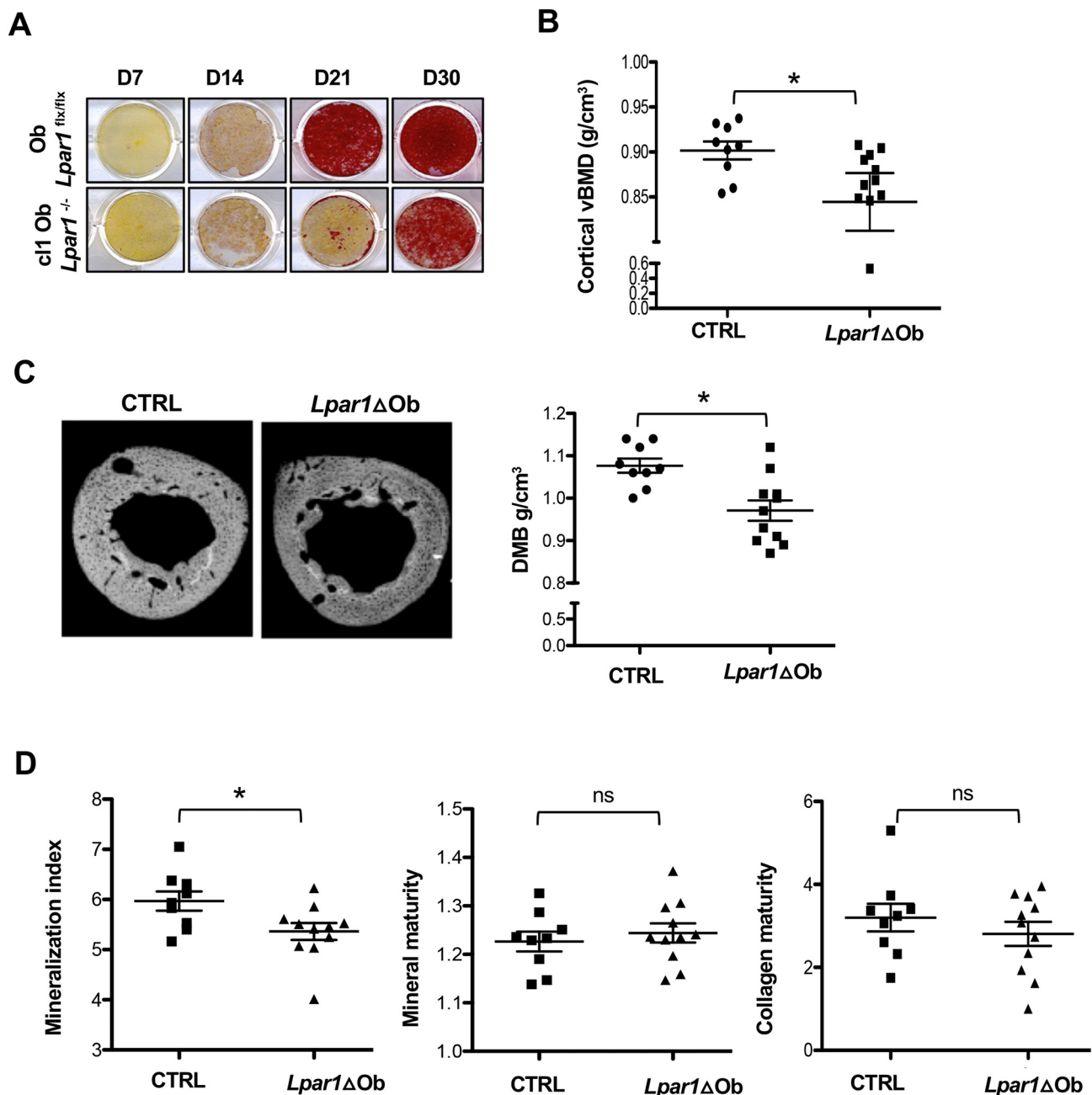


Fig. 3. Defective bone mineralization in *Lpar1*ΔOb mice.

A- Mineralization was analyzed by Alizarin Red staining at days 7,14,21 and 30 of culture. B- Cortical volumetric bone mineral density (vBMD) was measured from digitally extracted 3D bone cortical volumes of CTRL and *Lpar1*ΔOb femur **p* < .05, assessed by Mann-Whitney test. C- Digitized microradiography images (upper panel) and corresponding DMB (degree of bone mineralization) of cortical tibia section from CTRL and *Lpar1*ΔOb mice (lower panel) values are the mean ± SEM **p* < .05, assessed by Mann-Whitney test. D- Fourier Transformed Infra Red Microscopy (FTIRM) analysis showing mineral index, mineral and collagen maturity of CTRL and *Lpar1*ΔOb mice tibia, values are the mean ± SEM **p* < .05, assessed by Mann-Whitney test.

calcium homeostasis through secreted factors such as sclerostin and FGF-23 [32]. To better characterize the osteocyte phenotype in *Lpar1*ΔOb mice, we performed real-time PCR of osteocyte markers in bone explants (Fig. 4E). E11 (podoplanin), an actin fiber bundle connector which is involved in dendrite formation [33] and expressed mainly in embedding osteoblasts and mineralizing osteocytes was strongly reduced in *Lpar1*ΔOb bone explants (Fig. 4E). Dkk1 (Dkkopf-related -protein-1) a wnt pathway antagonist [34] and Dmp1 (Dentin Matrix Protein1) were also significantly down-regulated in *Lpar1*ΔOb bone explants compared to CTRL. In contrast, the level of transcripts corresponding to matrix proteins, PHEX and MEPE, as well as Connexin 43, were not significantly altered in CTRL bone explants. Sost

(sclerostin transcript) which is expressed in mature osteocytes and is instrumental for osteocyte-mediated control of bone remodeling, was strikingly decreased in *Lpar1*ΔOb bone explants. Taken together, these results indicate that *Lpar1* deficiency in osteoblasts results in a defect of osteocyte homeostasis.

3.5. Osteocyte dendrite network is affected by osteoblast *Lpar1* deficiency

Osteocytes are mechanosensors and mechanotransducers responsible for the adaptation of bone to internal and external stress. They form a dense highly connected dendritic network that extends from the cell body through bone canaliculae, allowing communications

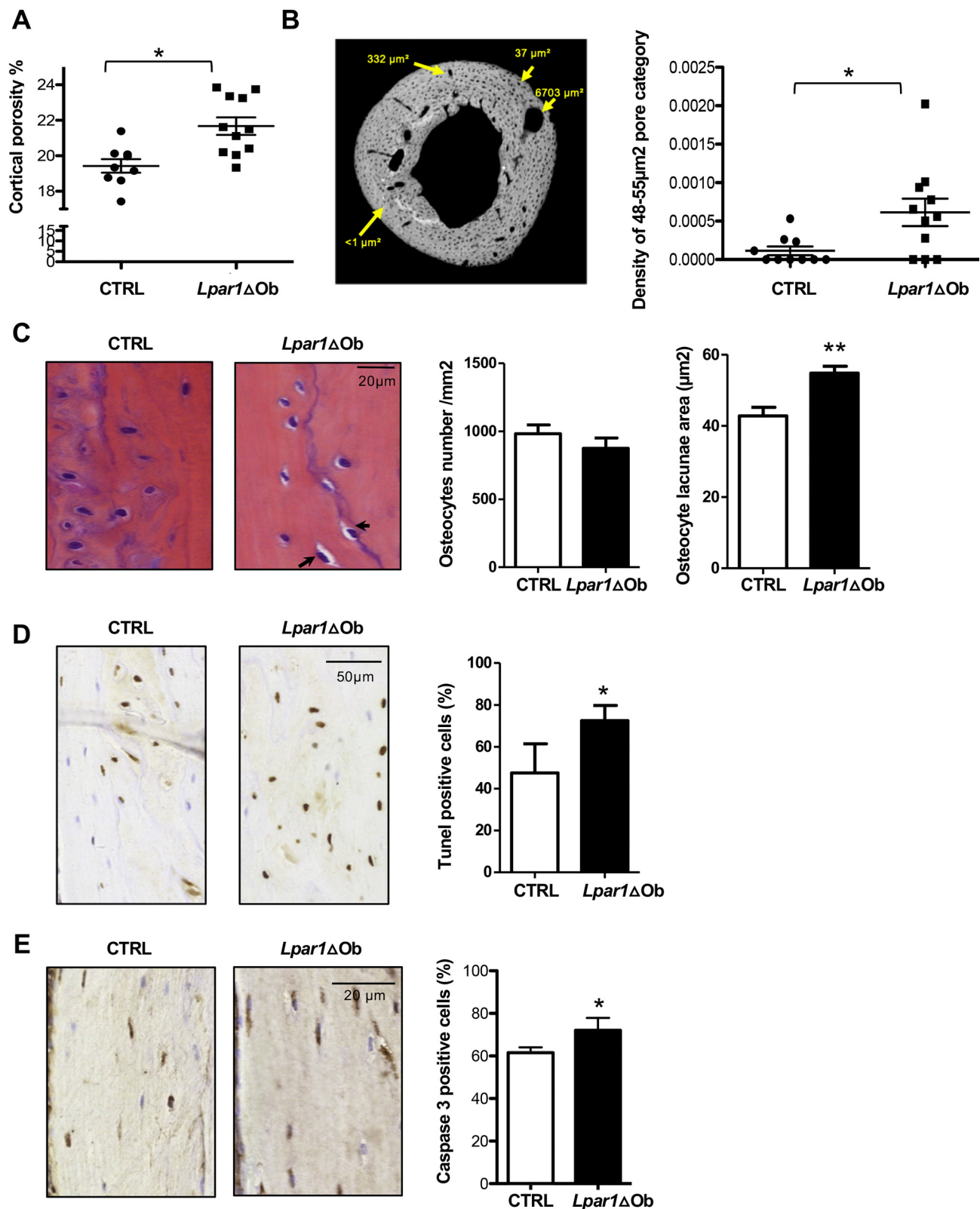


Fig. 4. – *Lpar1* selective deletion in osteoblasts impacts osteocytes and increases cortical porosity. A - Percentage of bone cortical porosity was evaluated from digitally extracted 3D μCT bone cortical volume femur analysis of CTRL $n = 8$ and *Lpar1*ΔOb $n = 11$ $*p < .05$, assessed by Mann-Whitney test. B- Tibia cortical porosity: pore density over the total cortical surface was measured by quantitative microradiography, values from 70 to 79 μm^2 were considered for each genotype; values are $\pm$ SEM $*p < .05$, assessed by Mann-Whitney test. C- Representative hematoxylin staining of femur cortical sections of CTRL and *Lpar1*ΔOb from 3 week old mice. Arrows indicate enlarged lacunae around osteocytes in *Lpar1*ΔOb, the number of osteocytes/mm² were counted and numbers reported in the corresponding bar chart. D-E Representative TUNEL (D) and cleaved Caspase-3 (E) staining of cortical section of Ctrl and *Lpar1*ΔOb femur from 3 week old mice and corresponding quantitative bar charts; values are the mean $\pm$ SEM $*p < .05$, assessed by Mann-Whitney test. F- Real-time PCR of osteocyte markers expression in flushed long bones of both genotype values are the mean $\pm$ SEM $*p < .05$, and $**p < .01$ assessed by Mann-Whitney test.

F

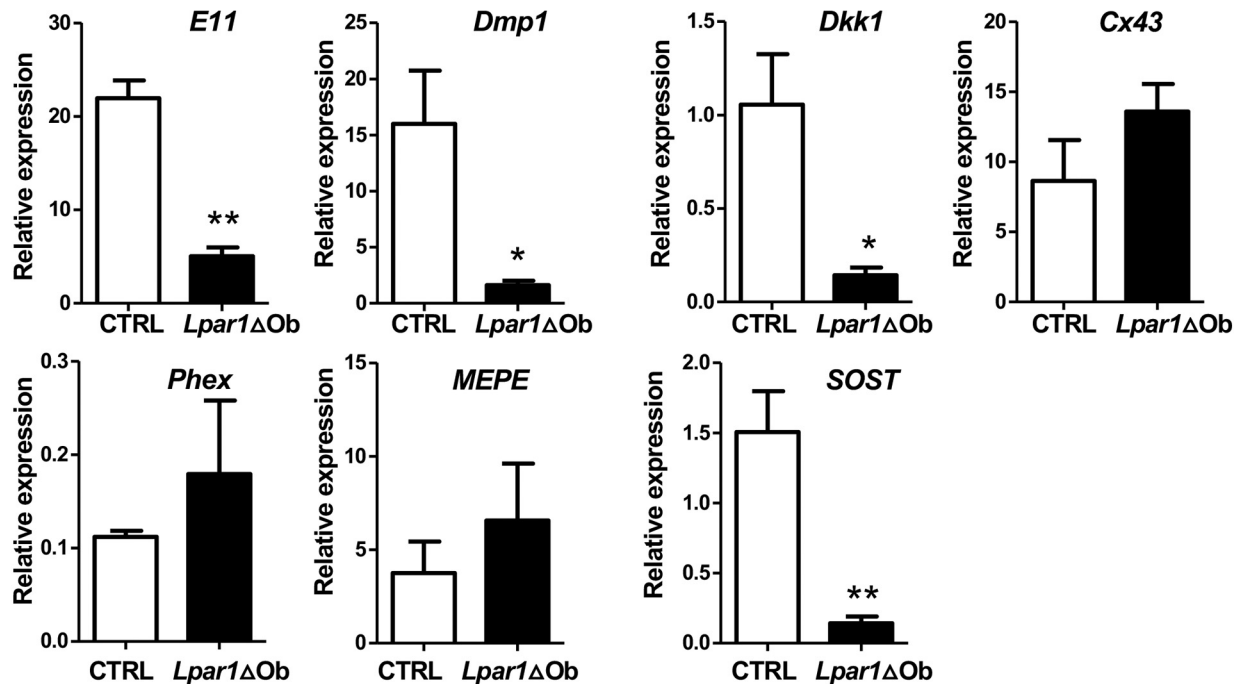


Fig. 4. (continued)

and interactions with the vasculature and bone endosteum [35]. Fibroblastic growth factor 2 (FGF2) is known to induce dendrite extension from osteoblasts *in vitro* [36]. We therefore decided to explore the osteocyte dendrite pattern in c11-Ob-*Lpar1*^{-/-} cells through labeled actin filament under FGF2 treatment. As anticipated, FGF2 promoted filament extensions in *Lpar1*^{fl/fl} cells but almost no dendrite extensions in c11-Ob-*Lpar1*^{-/-} cell culture (Fig. 5A). Similar experiments were performed on primary osteoblasts from CTRL and *Lpar1*ΔOb mice. In these conditions FGF2 induced the formation of a dense dendrite network in CTRL cells, that was absent in *Lpar1*ΔOb cells (Fig. 5B). In agreement with these findings FGF2 failed to upregulate the expression of the E11 osteocyte marker, both at the transcriptional (Fig. 5C) and protein (Fig. 5D) levels in c11-Ob-*Lpar1*^{-/-} cells compared to Ob-*Lpar1*^{fl/fl} cells. Confocal analyses showed that osteocyte dendrite numbers/mm³ was significantly decreased in the cortical bone of *Lpar1*ΔOb mice compared to CTRL mice (Fig. 5E). Altogether, these results revealed a major role for LPA₁ in dendrite formation and osteocyte maturation.

4. Conclusions

LPA is a lipid mediator that controls bone homeostasis by exerting complex effects on all types of bone cells as well as bone marrow and vascular cells [8]. Previous studies from our laboratories and others have shown that LPA through its receptor LPA₁ promotes both bone formation and bone resorption [9,10]. As a consequence, despite their extent, *in vivo* analyses of the *Lpar1*^{-/-} mouse bone phenotype failed to unravel the specific role of LPA₁ in bone homeostasis. In this study, we have investigated the specific role of the LPA/LPA₁ pathway in bone-forming cells *in vivo* by generating *Lpar1*ΔOb mice by conditional deletion of *Lpar1* in osteoblastic cell lineage.

*Lpar1*ΔOb mice showed a milder deterioration of the bone microstructure than *Lpar1*^{-/-} mice that exhibit strong osteoporosis [15]. In addition, *Lpar1*^{-/-} mice reveal a strong alteration in growth that is not observed in *Lpar1*ΔOb mice at the same age although these mice had a significant moderate reduction in size of the femurs and L5 vertebrae. The differences between these two genetically modified mouse lines

may have multiple causes as LPA₁ is the most ubiquitous of all LPA receptors. *Lpar1*^{-/-} mice have major defects in the nervous and adipose systems and in metabolic functions controlling glucose tolerance, which may significantly impair the mouse growth [14–16] but which should not be affected in *Lpar1*ΔOb mice. Cranio-facial, sternal and costal abnormalities are characteristics of *Lpar1*^{-/-} animal phenotype which are due to impaired chondrocyte activity and endochondral ossification [9]. Unexpectedly, these characteristics were not found in *Lpar1*ΔOb mice although *Osx*-cre:GFP expression is also detected in hypertrophic chondrocyte zone at the growth plate [37]. Nevertheless, the absence of morphogenic defects in *Lpar1*ΔOb mice might reinforce previous hypothesis claiming the essential role of LPA₁ in chondrocytes [9,13]. Nevertheless, *Lpar1*^{-/-} and *Lpar1*ΔOb mice revealed a series of similar bone defects such as decrease in cortical thickness and mineralization, which are associated with decreased osteogenesis of bone marrow mesenchymal cells and expression of bone markers (Col1, Bglap) compared to WT and control animals, respectively. As a new observation, our results in *Lpar1*ΔOb mice highlighted the essential role of LPA₁ in osteocytogenesis and on organization of the osteocyte dendrite network.

Osteoblasts derived from *Lpar1*ΔOb bone marrow mesenchymal cells displayed a lower ability to generate colony-forming-units (both in size and number) *in vitro* suggesting a cell proliferation defect in early progenitors. This hypothesis agrees with the proliferative and pro-survival action of LPA via LPA₁ in murine and human bone marrow mesenchymal cells [8,38]. In addition, immortalized c11-Ob-*Lpar1*^{-/-} osteoblasts revealed a significant decrease in cell survival associated with a significant decrease in the YAP nuclear/cytoplasmic ratio. YAP/TAZ activation is required for the expression of some LPA-induced genes and plays a critical role in cell proliferation in response to LPA [30]. These results suggest that deregulation of the YAP pathway may be a major cause of reduced cell survival of osteoblastic cells deficient in LPA₁. Deletion of YAP or its co-activator TAZ from osteoblast-lineage cells causes lethality in mice due to skeletal fragility [39]. Recently, the co-deletion of YAP/TAZ was shown to increase osteocyte apoptosis and to impair osteocyte perilacunar/canalicular remodeling by reducing canalicular network density, length, and branching [40]. *Lpar1*ΔOb

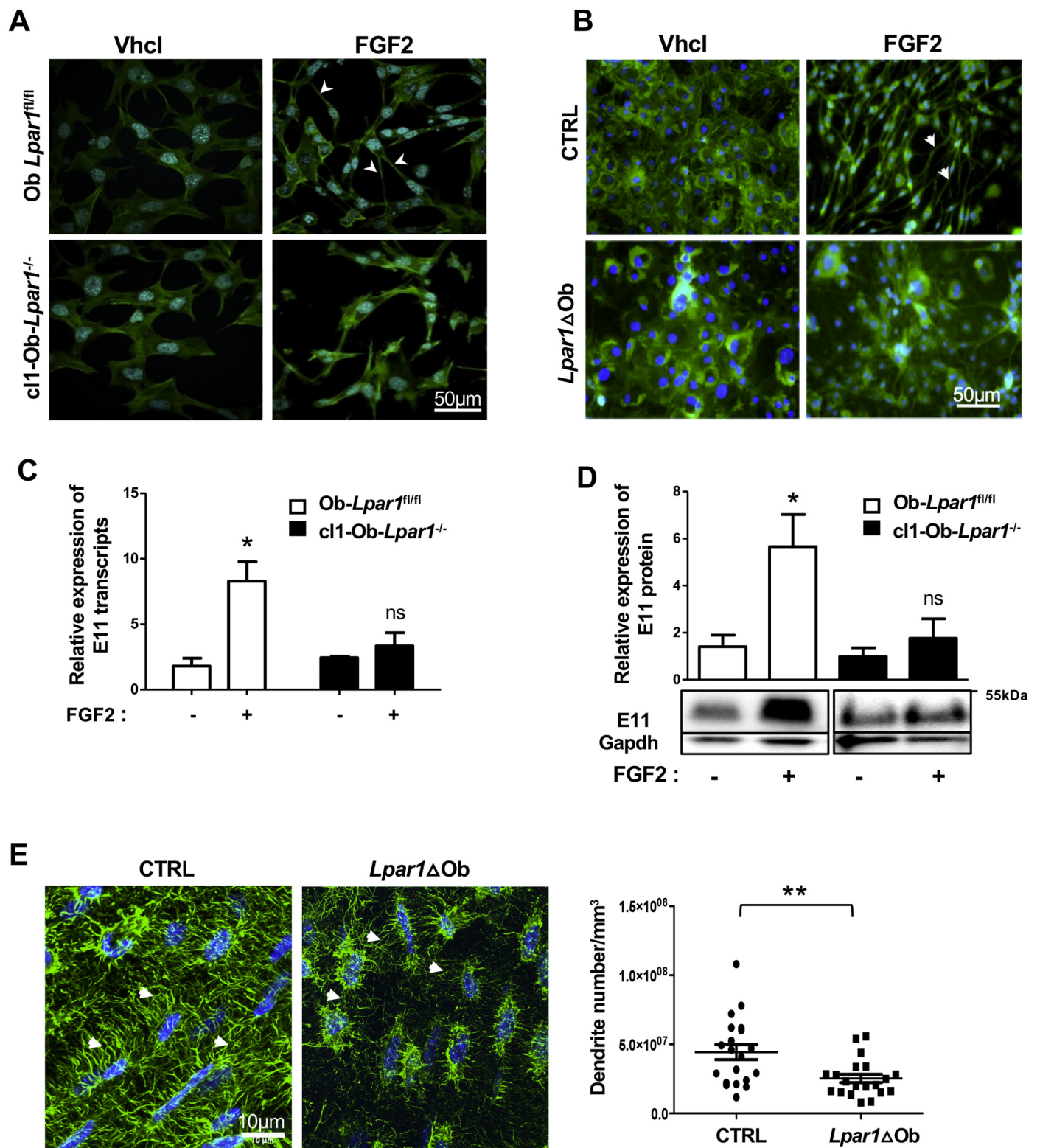


Fig. 5. *Lpar1* deletion impairs osteocyte dendrite formation

A- Representative micrographs of immortalized clones Cl1-Ob-*Lpar1*^{-/-} and B- Ob-*Lpar1*^{fl/fl} primary CTRL and *Lpar1*ΔOb osteoblasts treated with FGF2 (10 ng/ml) for 3 days and stained for actin filament visualization (Alexa Fluor 488 Phalloidin, arrowheads) and for nuclei (Hoechst, bleu). C- Real-time PCR for E11 in Cl1-Ob-*Lpar1*^{-/-} and Ob-*Lpar1*^{fl/fl} clones after FGF2 (10 ng/ml) challenge for 4 h compared to vehicle. D- Representative Western blot and quantification showing E11 protein expression in immortalized clones Cl1-Ob-*Lpar1*^{-/-} and Ob-*Lpar1*^{fl/fl} after 24 h challenge, where (+) is FGF2 treated cells, and (-) is vehicle treated control. Results were normalized by the GAPDH protein for loading control. E- 3D-Deconvoluted Z stack images of cortical bone, were analyzed for quantification of dendrites/mm³ (arrowheads) *n* = 3 mice per genotype and 2 zones of 3 sections/mice were measured; values are the mean ± SEM **p* < .05, and ***p* < 0.01 assessed by Mann-Whitney test.

mouse osteocytes exhibited *in vivo* similar profound increase in apoptosis rate and impaired canalicular network density suggesting that LPA/LPA₁ axis may contribute to YAP/TAZ osteocytogenesis activity. Other types of LPA receptors expressed in osteoblasts are also known to activate YAP/TAZ especially in different cellular contexts such as LPA₄ through Gα_{12/13} that promotes developmental angiogenesis [41]. As opposed to the osteoporotic phenotype of *Lpar1*^{-/-} mice, *Lpar4*^{-/-} mice exhibit an osteopetrotic bone phenotype [42]. Both LPA receptors activate Gα_{12/13} [5]. In this respect inactivation of one of the receptors should be compensated, at least partially, by expression of the other. This was not observed in clone c11-Ob-*Lpar1*^{-/-} osteoblasts. However, the shift from a Gα_{i/o} pathway induced by LPA₁ to a Gα_s pathway induced by LPA₄ in osteoblasts has been proposed to contribute to the opposing bone phenotypes of global knockout animals [43]. The Gα_s signaling pathway activates Lats1/2 which blocks downstream YAP/TAZ activation [30]. Our data therefore support the notion of a prevalence of the LPA/LPA₄/Gα_s pathway in osteoblasts in the absence of LPA₁ expression.

Lpar1 deficiency in osteoblasts leads to an alteration in osteogenic maturation reflected by increased expression of BSP, ALP transcription and activity. Poor mineralization is also associated with high levels of mRNA and ALP activity in osteoblasts of hypophosphatemic (Hyp) mice due to loss of PheX function [44], but as such, increased ALP cannot explain the reduction in mineralization. Therefore, the primary defect responsible for osteoblast hypomineralization phenotype in *Lpar1*ΔOb mice is not fully understood. Collagen fibril deposition, assembly and maturation are essential for initiation of mineralization [45,46]. Intriguingly, reduced expression of Col I was also observed in *Lpar1*ΔOb mouse osteoblasts and in clone c11-Ob-*Lpar1*^{-/-} osteoblasts that may contribute to insufficient mineralization. Moreover, the expression of matrix proteins Col I, BGLAP and OPN in c11-Ob-*Lpar1*^{-/-} cells and Dmp1 in *Lpar1*ΔOb bone explants are significantly down-regulated. Interestingly, the temporal shift of increase in ALP and BSP transcripts and decay in the level of bone matrix proteins (Col I, OPN, Dmp1) is found in aging and senescent osteoblasts [47,48]. Our data suggest that *Lpar1*-deficient osteoblasts are prematurely engaged in an aging program. Aging has a remarkable influence on bone quality, as shown by a decrease in cortical thickness associated with an increase in cortical porosity which is characteristic of the bone quality during aging in women [49]. MicroCT, microradiography and histological analyses of the long bones of *Lpar1*ΔOb mice reveal a significant reduction in cortical thickness and an increase in cortical porosity, confirming the idea that *Lpar1* deficiency in osteoblasts may promote premature bone aging.

Unbalanced expression of bone matrix proteins in osteoblasts could lead to poor quality of bone mineralization [50]. Indeed, c11-Ob-*Lpar1*^{-/-} cells cultured under osteogenic conditions showed diminution of Alizarin Red staining indicating alteration of cell mineralization capacity *in vitro*. This defect is likely to explain several bone characteristics of *Lpar1*ΔOb mice that displayed a low cortical bone mineral density assessed by μCT, a low degree of mineralization assessed by microradiography and a significant decrease in the mineral index/organic ratio determined by FTIRM analysis. Overall, *Lpar1*ΔOb mice presented a marked hypo-mineralization phenotype.

Besides poor mineralization impairing bone quality, hypo-mineralization has also been shown to affect osteocyte perilacunal and canalicular remodeling as detected in the Hyp-mouse model of X-linked hypophosphatemia [51]. Osteocytes are the most abundant cells in bone representing > 90% of total bone cells [52]. These cells correspond to the terminal stage of osteoblast differentiation that eventually become embedded into their own bone matrix [52]. Osteocytes are mechanosensor cells that inhibit bone formation under steady state conditions [32]. In the context of hypo-mineralization observed in *Lpar1*ΔOb mice, histological sections of *Lpar1*ΔOb cortical bone display augmented osteocyte apoptosis and larger lacunar cavities. In agreement with previous findings showing that the LPA/LPA₁ axis is

important for osteoblast cell lineage survival [53,54] our study suggests that the LPA/LPA₁ axis could also potentially impact on osteocyte survival through bone mineralization. Osteocyte markers such as Dmp1, and the wnt pathway inhibitors Dkk1 and Sost are decreased in bone explants of *Lpar1*ΔOb mice. This result was rather unexpected because *Lpar1*ΔOb mice exhibited only a mild bone loss phenotype with a decrease in cortical bone thickness, whereas Sost-deficient mice have a strong osteopetrotic phenotype [55]. Moreover, targeting SOST with romosozumab has recently been validated as a novel therapy for osteoporosis [56]. Nevertheless, our data agree with recent reports showing that despite a drastic decrease of osteocytic markers including Sost, *Ppargc1a/b* conditional knockout mice osteoblasts and osteocytes exhibit an osteopenic bone phenotype [57] indicating that miss-regulation of multi-gene programs both in osteoblasts and osteocytes, such as in *Ppargc1a/b* conditional knockout mice or *Lpar1*ΔOb mice, may affect wnt inhibitor production but without promoting bone formation.

Nonetheless, another osteocyte marker E11 or podoplanin is downregulated in bone explants from *Lpar1*ΔOb mice. E11 is an important autocrine osteocyte factor, which starts to be expressed at the time the osteoblast is embedded in the organic matrix. E11 expression is later required for the process of dendritic projection and branching during osteocyte differentiation [35]. LPA has been shown to induce dendrite outgrowth in MLO-Y4 osteocytic cells that is inhibited by Ki16425, a non-selective inhibitor of LPA₁/LPA₃ receptors and pertussis toxin which inhibits the Gα_i pathway [11]. In contrast to CTRL osteoblasts, E11-dependent induction of dendrite extensions by FGF2 is abrogated in *Lpar1*ΔOb and c11-Ob-*Lpar1*^{-/-} osteoblasts. Experiments carried out with MLO-Y4 cells showed that LPA induced-dendritogenesis is a membrane- and cytoskeleton-driven process with actin dynamics playing a critical role [58]. Our results suggest that LPA₁ triggers actin cytoskeleton remodeling that promotes membrane extensions through E11 activation during osteocyte differentiation.

In conclusion, our study shows for the first time that expression of LPA₁ in osteoblastic cell lineage controls bone mineralization and osteocyte specification. Our study raises caution about long term inhibition of LPA₁ activation that could potentially favor premature bone aging.

Credit author statement

Candide A. Alioli and Léa Demesmay: animal experimentation, cell biology and histology, Sara Laurencin-Dalacieu: design experiments, Nicolas Beton: genotyping and QRT-PCR, Delphine Farlay and Helene Follet: FTIRM and bone histology, Amri Saber: QRT-PCR, François Duboeuf: microCT, Jerold Chun and Richard Rivera: animal generation, characterization, reviewing and editing, Daniel Bouvard: Cell immortalization, YAP/Rac1 experiments, reviewing and editing, Irma Machuca-Gayet: Confocal imaging, writing and editing, Jean-Pierre Salles: Reviewing and editing, Isabelle Gennero and Olivier Peyruchaud: Oversight of the project, writing- reviewing and editing.

Funding sources

This work was supported by grants from the Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale, the Université Claude Bernard Lyon 1, the Agence Nationale de la Recherche (Grant LYSBONE No. ANR-15-CE14-0010), the Région d'Occitanie (grant Rbio N°15065647), Ipsen Pharma France, Lilly France and Pfizer France.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

The authors would like to thank Rachel Balouzat and the staff members of the animal care facility US006/CREFRE (Toulouse, France) for technical assistance in animal experiments. The authors would like to thank the technical assistance of Florence Capilla and the staff members of the histology core facility in CPTP (US006 CREFRE) and the Odontology technical platform PLTRO in Toulouse and Denis Ressnikoff from the CICLE platform (Lyon, France) for technical assistance on imaging.

References

- [1] K. Burton, N. Kendall, Musculoskeletal Disorders, the BMJ, (2014), <https://doi.org/10.1136/bmj.g1076>.
- [2] S.J. Duffield, B.M. Ellis, N. Goodson, K. Walker-Bone, P.G. Conaghan, T. Margham, T. Loftis, The contribution of musculoskeletal disorders in multimorbidity: implications for practice and policy, Best Pract. Res. Clin. Rheumatol. (2017), <https://doi.org/10.1016/j.berh.2017.09.004>.
- [3] L.J. Raggatt, N.C. Partridge, Cellular and Molecular Mechanisms of Bone Remodeling, The J. Biol. Chem., 2010, <https://doi.org/10.1074/jbc.R109.041087>.
- [4] A.J. Houben, W.H. Moolenaar, Autotaxin and LPA Receptor Signaling in Cancer, Cancer Metastasis Rev. (2011), <https://doi.org/10.1007/s10555-011-9319-7>.
- [5] Y.C. Yung, N.C. Stoddard, J. Chun, LPA receptor signaling: pharmacology, physiology, and pathophysiology, J. Lipid Res. (2014), <https://doi.org/10.1194/jlr.R046458>.
- [6] M. David, E. Wanneq, F. Descotes, S. Jansen, B. Deux, J. Ribeiro, C.M. Serre, S. Gres, N. Bendriss-Vermare, M. Bollen, S. Saez, J. Aoki, J.S. Saulnier-Blache, P. Clezardin, O. Peyruchaud, Cancer Cell Expression of Autotaxin Controls Bone Metastasis Formation in Mouse through Lysophosphatidic Acid-Dependent Activation of Osteoclasts, PLoS One, (2010), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009741>.
- [7] A. Boucharaba, C.-M. Serre, S. Gres, J.S. Saulnier-Blache, J.-C. Bordet, J. Guglielmi, P. Clezardin, O. Peyruchaud, Platelet-derived lysophosphatidic acid supports the progression of osteolytic bone metastases in breast cancer, J. Clin. Invest. (2004), <https://doi.org/10.1172/JCI22123>.
- [8] X. Wu, Y. Ma, N. Su, J. Shen, H. Zhang, H. Wang, Lysophosphatidic Acid: Its Role in Bone Cell Biology and Potential for Use in Bone Regeneration, Prostaglandins Other Lipid Mediat. (2019), <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2019.106335>.
- [9] I. Gennaro, S. Laurencin-Dalieu, F. Conte-Auriol, F. Briand-Mesange, D. Laurencin, J. Rue, N. Beton, N. Malet, M. Mus, A. Tokumura, P. Bourin, L. Vico, G. Brunel, R.O. Oreffo, J. Chun, J.P. Salles, Absence of the Lysophosphatidic Acid Receptor LPA1 Results in Abnormal Bone Development and Decreased Bone Mass, Bone, (2011), <https://doi.org/10.1016/j.bone.2011.04.018>.
- [10] M. David, I. Machuca-Gayet, J. Kikuta, P. Ottewill, F. Mima, R. Leblanc, E. Bonnelly, J. Ribeiro, I. Holen, R.L. Vales, P. Jurdic, J. Chun, P. Clezardin, M. Ishii, O. Peyruchaud, Lysophosphatidic acid receptor type 1 (LPA1) plays a functional role in osteoclast differentiation and Bone Resorption activity, J. Biol. Chem. (2014), <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.533232>.
- [11] S.A. Karagiosis, N.J. Karin, Lysophosphatidic acid induces osteocyte dendrite outgrowth, Biochem. Biophys. Res. Commun. (2007), <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.03.121>.
- [12] S. An, T. Bleu, O.G. Hallmark, E.J. Goetzl, Characterization of a novel subtype of human G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid, J. Biol. Chem. (1998), <https://doi.org/10.1074/jbc.273.14.7906>.
- [13] T. Nishioka, N. Arima, K. Kano, K. Hama, E. Itai, H. Yukiura, R. Kise, A. Inoue, S.H. Kim, L. Solnica-Krezel, W.H. Moolenaar, J. Chun, J. Aoki, ATX-LPA1 axis contributes to proliferation of chondrocytes by regulating fibronectin assembly leading to proper cartilage formation, Sci. Rep. (2016), <https://doi.org/10.1038/srep23433>.
- [14] S.M. Harrison, C. Reavill, G. Brown, J.T. Brown, J.E. Cluderay, B. Crook, C.H. Davies, L.A. Dawson, E. Grau, C. Heidbreder, P. Hemmati, G. Hervieu, A. Howarth, Z.A. Hughes, A.J. Hunter, J. Latham, S. Pickering, P. Pugh, D.C. Rogers, C.S. Shilliam, P.R. Maycox, LPA1 receptor-deficient mice have phenotypic changes observed in psychiatric disease, Mol. Cell. Neurosci. (2003), <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2003.09.001>.
- [15] J.J.A. Contos, N. Fukushima, J.A. Weiner, D. Kaushal, J. Chun, Requirement for the LPA1 Lysophosphatidic Acid Receptor Gene in Normal Suckling Behavior, PNAS, (2000), <https://doi.org/10.1073/pnas.97.24.13384>.
- [16] R. Dusaulcy, D. Daviaud, J.P. Pradere, S. Gres, P. Valet, J.S. Saulnier-Blache, Altered food consumption in mice lacking lysophosphatidic acid receptor-1, J. Physiol. Biochem. (2009), <https://doi.org/10.1007/BF03185929>.
- [17] G. Karsenty, Convergence between Bone and Energy Homeostases: Leptin Regulation of Bone Mass, Cell Metab. (2006), <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.10.008>.
- [18] R.R. Rivera, M.-E. Lin, E.C. Bornhop, J. Chun, Conditional Lpar1 gene targeting identifies cell types mediating neuropathic pain, bioRxiv (2020), <https://doi.org/10.1101/2020.02.02.931212>.
- [19] S.J. Rodda, A.P. McMahon, Distinct Roles for Hedgehog and Canonical Wnt Signaling in Specification, Differentiation and Maintenance of Osteoblast Progenitors, Development, (2006), <https://doi.org/10.1242/dev.02480>.
- [20] F. Montagner, V. Kaftandjian, D. Farlay, D. Brau, G. Boivin, H. Follet, Validation of a Novel Microradiography Device for Characterization of Bone Mineralization, J. Xray Sci, Technol, 2015, <https://doi.org/10.3233/xst-150481>.
- [21] D. Farlay, M.E. Duclos, E. Gineyts, C. Bertholon, S. Viguet-Carrin, J. Nallala, G.D. Sockalingum, D. Bertrand, T. Roger, D.J. Hartmann, R. Chapurlat, G. Boivin, The Ratio 1660/1690 cm^{-1} Measured by Infrared Microspectroscopy Is Not Specific of Enzymatic Collagen Cross-Links in Bone Tissue, PLoS One, (2011), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028736>.
- [22] D. Farlay, G. Pancer, C. Rey, P.D. Delmas, G. Boivin, Mineral maturity and crystallinity index are distinct characteristics of bone mineral, J. Bone Miner. Metab. (2010), <https://doi.org/10.1007/s00774-009-0146-7>.
- [23] M. Gardegarant, D. Farlay, O. Peyruchaud, H. Follet, Automation of the Peak Fitting Method in Bone FTIR Microspectroscopy Spectrum Analysis: Human and Mice Bone Study, Journal of Spectrometry (2018), <https://doi.org/10.1155/2018/4131029>.
- [24] E.P. Paschalis, E. DiCarlo, F. Betts, P. Sherman, R. Mendelsohn, A.L. Boskey, FTIR microspectroscopic analysis of human osteonal bone, Calcif. Tissue Int. (1996), <https://doi.org/10.1007/bf00369214>.
- [25] H. Sabra, M. Brunner, V. Mandati, B. Wehrle-Haller, D. Lallemand, A.S. Ribba, G. Chevalier, P. Guardiola, M.R. Block, D. Bouvard, beta1 integrin-dependent Rac/ group I PAK signaling mediates YAP activation of Yes-associated protein 1 (YAP1) via NF2/merlin, J. Biol. Chem. (2017), <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.808063>.
- [26] R.O. Oreffo, S. Romberg, A.S. Viridi, C.J. Joyner, S. Berven, J.T. Triffitt, Effects of interferon alpha on human osteoprogenitor cell growth and differentiation in vitro, J. Cell. Biochem. (1999), [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4644\(19990901\)74:3<372::aid-jcb6>3.3.co;2-8](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4644(19990901)74:3<372::aid-jcb6>3.3.co;2-8).
- [27] A.D. Bakker, J. Klein-Nulend, Osteoblast isolation from murine calvaria and long bones, Methods Mol. Biol. (2012), https://doi.org/10.1007/978-1-61779-415-5_2.
- [28] J.Y. Li, M. Yu, A.M. Tyagi, C. Vaccaro, E. Hsu, J. Adams, T. Bellido, M.N. Weitzmann, R. Pacifici, IL-17 Receptor Signaling in Osteoblasts/Osteocytes Mediates PTH-Induced Bone Loss and Enhances Osteocytic RANKL Production, J. Bone Miner. Res. (2019), <https://doi.org/10.1002/jbmr.3600>.
- [29] M. Brunner, A. Millon-Fremillon, G. Chevalier, I.A. Nakhchbandi, D. Mosher, M.R. Block, C. Albiges-Rizo, D. Bouvard, Osteoblast mineralization requires beta1 integrin/ICAP-1-dependent fibronectin deposition, J. Cell Biol. (2011), <https://doi.org/10.1083/jcb.201007108>.
- [30] F.X. Yu, B. Zhao, N. Panupinthu, J.L. Jewell, I. Lian, L.H. Wang, J. Zhao, H. Yuan, K. Tumaneng, H. Li, X.D. Fu, G.B. Mills, K.L. Guan, Regulation of the Hippo-YAP Pathway by G-Protein-Coupled Receptor Signaling, Cell, (2012), <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.037>.
- [31] J.X. Pan, L. Xiong, K. Zhao, P. Zeng, B. Wang, F.L. Tang, D. Sun, H.H. Guo, X. Yang, S. Cui, W.F. Xia, L. Mei, W.C. Xiong, YAP Promotes Osteogenesis and Suppresses Adipogenic Differentiation by Regulating β -Catenin Signaling, Bone Res. (2018), <https://doi.org/10.1038/s41413-018-0018-7>.
- [32] L.F. Bonewald, The role of the osteocyte in bone and nonbone disease, Endocrinol. Metab. Clin. N. Am. (2017), <https://doi.org/10.1016/j.eccl.2016.09.003>.
- [33] K.A. Staines, B. Javaheri, P. Hohenstein, R. Fleming, E. Ikpegbu, E. Unger, M. Hopkinson, D.J. Buttle, A.A. Pitsillides, C. Farquharson, Hypomorphic conditional deletion of E11/Podoplanin reveals a role in osteocyte dendrite elongation, J. Cell. Physiol. (2017), <https://doi.org/10.1002/jcp.25999>.
- [34] M. Ai, S.L. Holmen, W. Van Hul, B.O. Williams, M.L. Warman, Reduced affinity to and inhibition by DKK1 form a common mechanism by which high bone mass-associated missense mutations in LRP5 affect canonical Wnt signaling, Mol. Cell. Biol. (2005), <https://doi.org/10.1128/mcb.25.12.4946-4955.2005>.
- [35] S.L. Dallas, M. Prideaux, L.F. Bonewald, The osteocyte: an endocrine cell ... and more, Endocr. Rev. (2013), <https://doi.org/10.1210/er.2012-1026>.
- [36] E. Ikpegbu, L. Basta, D.N. Clements, R. Fleming, T.L. Vincent, D.J. Buttle, A.A. Pitsillides, K.A. Staines, C. Farquharson, FGF-2 promotes osteocyte differentiation through increased E11/podoplanin expression, J. Cell. Physiol. (2018), <https://doi.org/10.1002/jcp.26345>.
- [37] J. Chen, Y. Shi, J. Regan, K. Karupiah, D.M. Ormiz, F. Long, Osx-Cre Targets Multiple Cell Types besides Osteoblast Lineage in Postnatal Mice, PLoS One, (2014), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085161>.
- [38] J.P. Mansell, M. Nowghani, M. Pabbruwe, I.C. Paterson, A.J. Smith, A.W. Blom, Lysophosphatidic Acid and Calcitriol Co-Operate to Promote Human Osteoblastogenesis: Requirement of Albumin-Bound LPA, Prostaglandins Other Lipid Mediat. (2011), <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2011.05.003>.
- [39] C.D. Kegelman, D.E. Mason, J.H. Dawahare, D.J. Horan, G.D. Vigil, S.S. Howard, A.G. Robling, T.M. Bellido, J.D. Boerckel, Skeletal Cell YAP and TAZ Combinatorially Promote Bone Development, FASEB J. (2018), <https://doi.org/10.1096/fj.201700872R>.
- [40] C.D. Kegelman, J.C. Coulombe, K.M. Jordan, D.J. Horan, L. Qin, A.G. Robling, V.L. Ferguson, T.M. Bellido, J.D. Boerckel, YAP and TAZ Mediate Osteocyte Perilacunar/Canalicular Remodeling, J. Bone Miner. Res. (2020), <https://doi.org/10.1002/jbmr.3876>.
- [41] D. Yasuda, D. Kobayashi, N. Akahoshi, T. Ohto-Nakanishi, K. Yoshioka, Y. Takuwa, S. Mizuno, S. Takahashi, S. Ishii, Lysophosphatidic acid-induced YAP/TAZ activation promotes developmental angiogenesis by repressing notch ligand Dll4, J. Clin. Invest. (2019), <https://doi.org/10.1172/jci121955>.
- [42] Y.B. Liu, Y. Kharode, P.V. Bodine, P.J. Yaworsky, J.A. Robinson, J. Billiard, LPA induces osteoblast differentiation through interplay of two receptors: LPA1 and LPA4, J. Cell. Biochem. (2010), <https://doi.org/10.1002/jcb.22471>.
- [43] J.P. Salles, S. Laurencin-Dalieu, F. Conte-Auriol, F. Briand-Mesange, I. Gennaro, Bone defects in LPA receptor genetically modified mice, Biochim. Biophys. Acta (2013), <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2012.07.018>.
- [44] S.K. Murali, O. Andrukhova, E.L. Clinkenbeard, K.E. White, R.G. Erben, Excessive osteocytic Fgf23 secretion contributes to pyrophosphate accumulation and mineralization defect in Hyp Mice, PLoS Biol. (2016), <https://doi.org/10.1371/journal>.

- pbio.1002427.
- [45] D.R. Eyre, M.A. Weis, Bone collagen: new clues to its mineralization mechanism from recessive osteogenesis imperfecta, *Calcif. tissue Int.* (2013), <https://doi.org/10.1007/s00223-013-9723-9>.
- [46] D.B. Burr, Changes in Bone Matrix Properties with Aging, *Bone*, (2019), <https://doi.org/10.1016/j.bone.2018.10.010>.
- [47] M.H. Sheng, D.J. Baylink, W.G. Beamer, L.R. Donahue, C.J. Rosen, K.H. Lau, J.E. Wergedal, Histomorphometric Studies Show that Bone Formation and Bone Mineral Apposition Rates Are Greater in C3H/HeJ (High-Density) than C57BL/6J (Low-Density) Mice during Growth, *Bone*, (1999), [https://doi.org/10.1016/s8756-3282\(99\)00184-2](https://doi.org/10.1016/s8756-3282(99)00184-2).
- [48] J.N. Farr, D.G. Fraser, H. Wang, K. Jaehn, M.B. Ogradnik, M.M. Weivoda, M.T. Drake, T. Tchkonja, N.K. LeBrasseur, J.L. Kirkland, L.F. Bonewald, R.J. Pignolo, D.G. Monroe, S. Khosla, Identification of Senescent Cells in the Bone Microenvironment, *J. Bone. Miner. Res.*, 2016, <https://doi.org/10.1002/jbmr.2892>.
- [49] C.M. Andreasen, J.M. Delaisse, B.C.J. van der Eerden, J. van Leeuwen, M. Ding, T.L. Andersen, Understanding Age-Induced Cortical Porosity in Women: Is a Negative BMU Balance in Quiescent Osteons a Major Contributor? *Bone*, (2018), <https://doi.org/10.1016/j.bone.2018.09.011>.
- [50] W. Bouleftour, L. Juignet, G. Bouet, R.N. Granito, A. Vanden-Bossche, N. Laroche, J.E. Aubin, M.H. Lafage-Proust, L. Vico, L. Malaval, The Role of the SIBLING, Bone Sialoprotein in Skeletal Biology - Contribution of Mouse Experimental Genetics, *Matrix Biol.*, (2016), <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.12.011>.
- [51] D. Tokarz, J.S. Martins, E.T. Petit, C.P. Lin, M.B. Demay, E.S. Liu, Hormonal Regulation of Osteocyte Perilacunar and Canalicular Remodeling in the Hyp Mouse Model of X-Linked Hypophosphatemia, *J. Bone. Miner. Res.*, 2018, <https://doi.org/10.1002/jbmr.3327>.
- [52] L.F. Bonewald, The Amazing Osteocyte, *J. Bone. Miner. Res.*, 2011, <https://doi.org/10.1002/jbmr.320>.
- [53] A. Grey, Q. Chen, K. Callon, X. Xu, I.R. Reid, J. Cornish, The Phospholipids Sphingosine-1-Phosphate and Lysophosphatidic Acid Prevent Apoptosis in Osteoblastic Cells Via a Signaling Pathway Involving G(I) Proteins and Phosphatidylinositol-3 Kinase, *Endocrinol.*, (2002), <https://doi.org/10.1210/en.2002-220347>.
- [54] S. Yao, Y. Zhang, X. Wang, F. Zhao, M. Sun, X. Zheng, H. Dong, K. Guo, Pigment epithelium-derived factor (PEDF) protects Osteoblastic cell line from glucocorticoid-induced apoptosis via PEDF-R, *Int. J. Mol. Sci.* (2016), <https://doi.org/10.3390/ijms17050730>.
- [55] X. Li, M.S. Ominsky, Q.T. Niu, N. Sun, B. Daugherty, D. D'Agostin, C. Kurahara, Y. Gao, J. Cao, J. Gong, F. Asuncion, M. Barrero, K. Warmington, D. Dwyer, M. Stolina, S. Morony, I. Sarosi, P.J. Kostenuik, D.L. Lacey, W.S. Simonet, H.Z. Ke, C. Paszty, Targeted Deletion of the Sclerostin Gene in Mice Results in Increased Bone Formation and Bone Strength, *J. Bone. Miner. Res.*, 2008, <https://doi.org/10.1359/jbmr.080216>.
- [56] P. Chavassieux, R. Chapurlat, N. Portero-Muzy, J.P. Roux, P. Garcia, J.P. Brown, C. Libanati, R.W. Boyce, A. Wang, A. Grauer, Bone-Forming and Antiresorptive Effects of Romosozumab in Postmenopausal Women with Osteoporosis: Bone Histomorphometry and Microcomputed Tomography Analysis after 2 and 12 Months of Treatment, *J. Bone. Miner. Res.*, 2019, <https://doi.org/10.1002/jbmr.3735>.
- [57] C. Sanchez-de-Diego, N. Artigas, C. Pimenta-Lopes, J.A. Valer, B. Torrejon, P. Gama-Perez, J.A. Villena, P.M. Garcia-Roves, J.L. Rosa, F. Ventura, Glucose Restriction Promotes Osteocyte Specification by Activating a PGC-1alpha-Dependent Transcriptional Program, *iScience*, (2019), <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.04.015>.
- [58] K.M. Waters, J.M. Jacobs, M.A. Gritsenko, N.J. Karin, Regulation of Gene Expression and Subcellular Protein Distribution in MLO-Y4 Osteocytic Cells by Lysophosphatidic Acid: Relevance to Dendrite Outgrowth, *Bone*, (2011), <https://doi.org/10.1016/j.bone.2011.02.020>.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

En développant au laboratoire plusieurs nouvelles approches expérimentales histologiques, cellulaires, biochimiques ou moléculaires, j'ai pu mettre en évidence un rôle spécifique *in vivo* et *in vitro* du récepteur LPA1 sur la lignée ostéoblastique tant dans l'ostéoblastogenèse que dans l'ostéocytogenèse. L'évaluation fine du phénotype des souris *Lpar1ΔOb* en collaboration avec l'équipe d'Oliver Peyruchaud à Lyon m'a permis de montrer un rôle majeur dans la différenciation et la minéralisation des ostéoblastes matures. Le LPA1 intervient surtout au niveau cortical avec un impact profond sur les ostéocytes emmurés dans le tissu osseux.

Une exploration originale des ostéocytes, d'une part à partir d'un modèle *ex vivo* de culture d'explants d'os enrichis en ostéocytes, et d'autre part à partir d'un modèle d'ostéocytogenèse *in vitro* en utilisant des ostéoblastes m'a permis d'analyser l'expression des principaux marqueurs ostéocytaires et de mettre en évidence l'importance de la présence du récepteur LPA1 dans les phases précoces de la différenciation ostéocytaire, tant morphologiquement que moléculairement.

Dans cette discussion je vais apporter quelques notions et commentaires relatifs aux travaux publiés, pour compléter la discussion de l'article BBA. Je vais aussi présenter quelques résultats complémentaires non publiés, et les replacer dans le contexte du modèle de la souris *Lpar1ΔOb* et dans le champ des connaissances de la littérature sur l'ostéoblastogenèse et l'ostéocytogenèse. Enfin, je discuterai l'intérêt de la signalisation du LPA en physiopathologie osseuse, sur la base des données de la littérature et de quelques données préliminaires, relatives à l'implication du LPA dans la physiopathologie de la scoliose idiopathique de l'adolescent.

1. Implication du récepteur LPA1 au cours de l'ostéoblastogenèse

L'acide lysophosphatidique est un médiateur lipidique naturel dont les fonctions biologiques affectent de nombreux organes dont le tissu osseux, tissu dans lequel le récepteur LPA1 semble jouer le rôle majeur (367,369). Notre équipe a mis en évidence la participation du LPA1 dans l'ostéogenèse dans un modèle murin *Lpar1^{-/-}* dans lequel l'expression de ce récepteur a été désactivée de façon globale. Ces travaux publiés en 2011 ont pu montrer qu'en absence du récepteur LPA1, les animaux présentent un défaut de

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

croissance et un phénotype ostéoporotique sévère avec des anomalies de maturations des vertèbres et des côtes (376).

Au cours de mes travaux, j'ai généré des souris *Lpar1ΔOb* dont l'expression du récepteur LPA1 a été spécifiquement désactivée dans la lignée ostéoblastique grâce à la stratégie d'inactivation conditionnelle Cre/Loxp, dépendante du promoteur du facteur de transcription Osterix (382). Les souris *Lpar1ΔOb* analysées à 4 semaines, présentent une altération du développement du squelette modérée par rapport à celle des souris *Lpar1^{-/-}*. En effet, les souris *Lpar1^{-/-}* présentaient 20% de réduction au niveau de la longueur des fémurs contre 6% pour les souris *Lpar1ΔOb* (figure 1 de l'article BBA). De plus, les souris *Lpar1ΔOb* n'ont pas montré d'anomalies majeures du développement vertébral, mais présentent une réduction de 11% de la longueur de la vertèbre L5 (figure 1 de l'article BBA). Ces différences de phénotype sont probablement liées à la spécificité ostéoblastique du modèle de souris *Lpar1ΔOb*. En effet, la recombinaison Cre est sous le contrôle du gène osterix qui n'est pas exprimé dans les chondrocytes de la zone proliférative de la plaque de croissance. Ainsi, le récepteur LPA1 serait toujours exprimé dans cette zone et stimulerait une activité normale de la plaque de croissance. L'importance du récepteur dans les chondrocytes prolifératifs a déjà été soulignée par l'étude Nishioka et al, qui a montré par des modèles murins et zebrafish, que l'axe ATX-LPA-LPA1 contribuait à la prolifération des chondrocytes en régulant l'assemblage de la fibronectine, permettant une bonne formation du cartilage de croissance (362). Il faut tout de même noter qu'osterix est présent dans la zone hypertrophique de la plaque de croissance et qu'un impact de cette zone sur la taille finale des fémurs ou des vertèbres ne peut pas être exclu.

Le phénotype des souris *Lpar1ΔOb* est logiquement plus représentatif du rôle du récepteur LPA1 dans le tissu osseux. Les souris *Lpar1ΔOb* ont révélé une baisse de la minéralisation osseuse et une réduction de l'épaisseur de l'os cortical (figure 1 et 3 de l'article BBA), défauts retrouvés également chez les souris *Lpar1^{-/-}*. En revanche, au niveau de l'os trabéculaire, les souris *Lpar1ΔOb* n'ont pas montré les mêmes défauts que les souris *Lpar1^{-/-}*. Ces dernières avaient présenté une réduction du volume trabéculaire osseux de 81% et de 77% respectivement au niveau de réduction vertébrale et fémorale, avec d'importantes altérations dans le nombre, l'épaisseur et les connectivités des travées osseuses (376). Les souris *Lpar1ΔOb* ne présentent aucune altération significative de la masse osseuse au niveau trabéculaire même si l'analyse du microCT semble indiquer une tendance plutôt à la baisse des valeurs du BV/TV (figure 1 de l'article BBA). J'ai donc

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

poursuivi l'analyse de l'os trabéculaire par une analyse histologique de coupes de fémurs et de tibia des souris, dans le but d'explorer la présence de potentielles anomalies qui impacteraient particulièrement la morphologie du tissu osseux trabéculaire. Comme indiqué par coloration HE des coupes à la figure 25 (A, B), aucune différence majeure n'est ressortie de cette approche entre les souris *Lpar1* Δ Ob et les CTRL. Au niveau moléculaire, j'ai réalisé une exploration des principaux marqueurs de la formation osseuse par RT-qPCR à partir de morceaux d'os de fémur et de tibia. Comme indiqué à la figure 25 (C), aucune différence significative n'a été observée au niveau de l'expression osseuse des marqueurs Col1, BSP, OPN, PAL, OPG, et BGLAP chez les souris *Lpar1* Δ Ob à 4 semaines de croissance comparativement aux souris CTRL. Ces résultats pourraient s'expliquer par l'impureté des prélèvements de tissus osseux, qui représente d'ailleurs l'un des inconvénients de cette approche de qPCR sur tissu total. En effet, malgré le rinçage et l'élimination de la moelle, les prélèvements comportent un mélange d'os trabéculaire, d'os cortical et de cellules périphériques qui peuvent soit fournir des informations similaires ou opposées, car étant différenciellement impactés par l'invalidation. L'ensemble de ces résultats confirme tout de même les observations du microCT, et indique que l'absence du récepteur LPA1 dans la lignée ostéoblastique n'impacte pas de façon drastique le développement osseux des souris à 4 semaines, et n'affecte pas le tissu osseux trabéculaire.

Ces données sont intéressantes pour discuter la dualité de l'activité du LPA à la fois dans les ostéoblastes et les ostéoclastes. Le LPA a été rapporté notamment par les travaux du Dr Peyruchaud comme étant impliqué dans l'activité des ostéoclastes, avec une action importante du récepteur LPA1 (367). En l'absence du LPA1 dans les cellules ostéoformatrices, on aurait pu s'attendre à ce que la diminution potentielle de la formation osseuse induise une activité accrue des ostéoclastes, une résorption osseuse plus importante, et par conséquent un phénotype ostéoporotique sévère. Or, dans notre modèle de souris *Lpar1* Δ Ob, on ne retrouve pas ce phénotype « attendu ». De plus, l'exploration de certains marqueurs de l'activité des ostéoclastes comme la TRAP a été réalisée par l'équipe du Dr Peyruchaud dans le tissu osseux des souris *Lpar1* Δ Ob, n'a révélé aucune différence par rapport aux souris CTRL. Ceci confirme l'absence d'une résorption osseuse supérieure. Il faut tout de même noter que les travaux du Dr Peyruchaud montrant l'activité fonctionnelle du LPA1 dans les ostéoclastes, ont été réalisés dans un modèle de souris ostéoporotique, où l'activité ostéoclastique est particulièrement importante. Dans notre modèle, les souris *Lpar1* Δ Ob sont en pleine croissance, où l'activité ostéoblastique, du fait du modelage de l'os,

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

est prioritaire sur la résorption osseuse, ce qui pourrait expliquer qu'il n'y ait pas eu une suractivation des ostéoclastes. Des explorations complémentaires seraient intéressantes notamment sur des souris *Lpar1* Δ Ob plus âgées (3 et 6 mois) ou induites en ostéoporose, afin de mieux comprendre le couplage entre activités ostéoblastique et ostéoclastique en absence du récepteur LPA1.

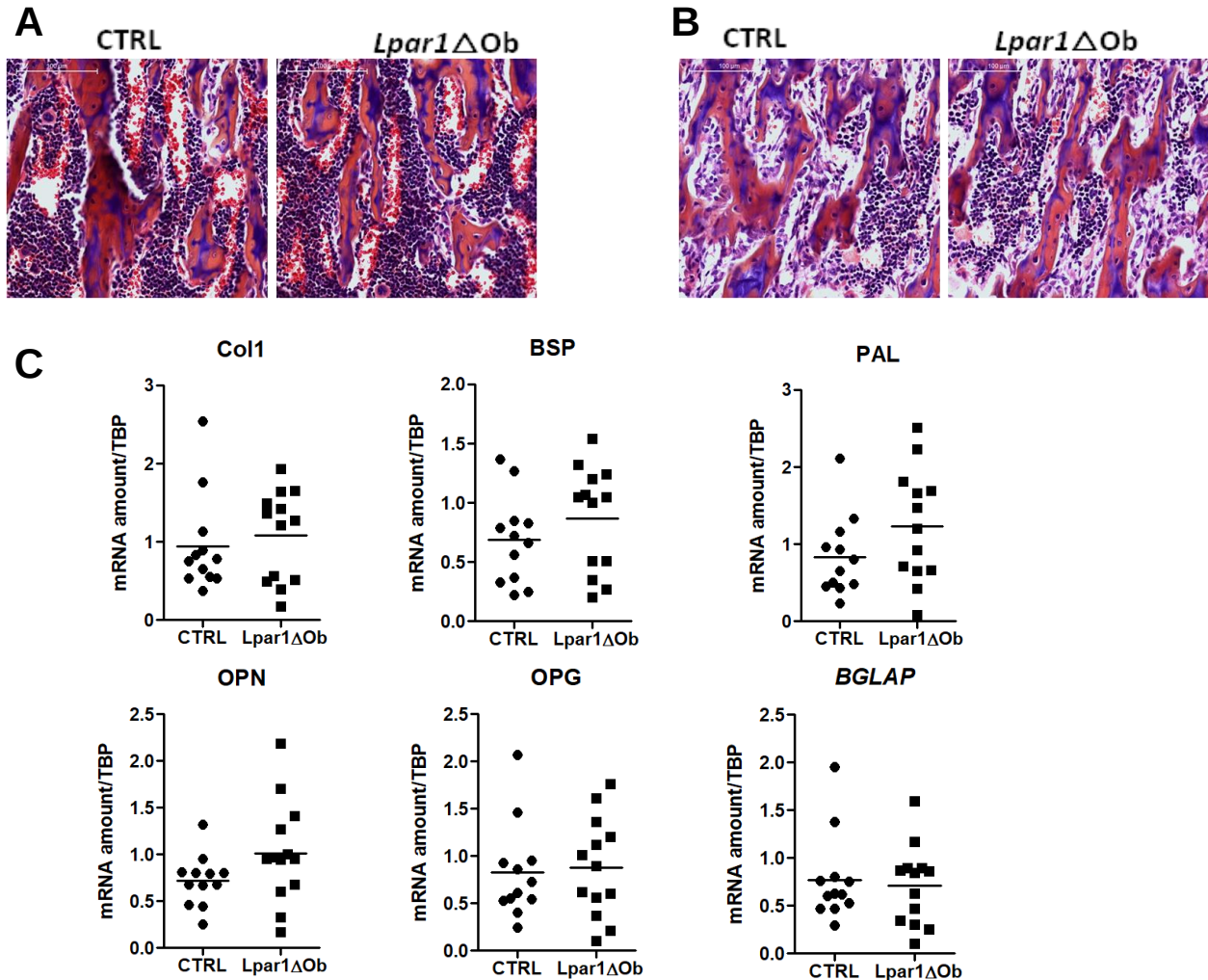


Figure 25 : Résultats complémentaires sur le phénotype osseux des souris *Lpar1* Δ Ob. (A, B) Images représentatives de coupes histologiques d'os trabéculaire de fémurs (A) et de tibia (B) des souris CTRL et *Lpar1* Δ Ob, colorées à l'hématoxyline éosine. (C) Expression relative des marqueurs ostéogéniques par RT-qPCR à partir de prélèvements d'os entier des souris CTRL et *Lpar1* Δ Ob récupérés et séparés de la moelle osseuse.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Au cours de cette étude, j'ai également mis en évidence des altérations dans l'ostéogenèse avec différentes approches *in vitro*.

D'abord, les CFU (colonies forming unit) que j'ai obtenues à partir des cultures de cellules stromales mésenchymateuses des souris *Lpar1* Δ Ob, ont montré un défaut de prolifération et de différenciation (figure 2 de l'article BBA). Ces données sont en accord avec celles rapportées précédemment dans le modèle de souris *Lpar1*^{-/-}, ainsi qu'avec les données de la littérature (303,372,383). J'ai pu également mettre en évidence un défaut de prolifération cellulaire, ainsi qu'une altération dans l'expression des principaux marqueurs du programme de différenciation ostéogénique des ostéoblastes immortalisés. Ainsi, l'expression du collagène de type 1, de l'ostéocalcine et de l'ostéopontine a été retrouvée diminuée, tandis que celle de la PAL et de la BSP a été retrouvée augmentée dans les cellules cl1-Ob-*Lpar1*^{-/-} comparativement aux cellules contrôles. Les cellules cl1-Ob-*Lpar1*^{-/-} ont également présenté un retard et une diminution dans le processus de minéralisation. Ces altérations globales de la différenciation cellulaire et de la minéralisation, provoquée par l'absence du récepteur LPA1 ont été retrouvées dans différents travaux déjà publiés. En effet, le LPA a largement été décrit pour ses effets positifs sur le développement du squelette, avec une implication particulièrement importante du récepteur LPA1 (218,339,376,383). En revanche, l'augmentation de l'activité PAL retrouvée dans les cellules cl1-Ob-*Lpar1*^{-/-} n'est pas en adéquation avec les données de Liu et al qui avaient clairement rapporté que le LPA stimulait l'activité PAL et la minéralisation. Dans leur modèle de cellules mésenchymateuses humaines immortalisées hBMSC-TERT traitées ou non avec le ki16425, ils avaient associé cet effet du LPA à l'expression du récepteur LPA1 (384,385). De même, Dziak et al avaient montré en utilisant la lignée cellulaire MG63, que l'application de 100 μ M de LPA double quasiment l'activité PAL après 3 et 5 jours de traitement (386). Cette augmentation de l'activité PAL paraît encore plus inattendue si on l'interprète de façon associée à la diminution de la minéralisation. Dans la littérature, très peu de données pathologiques décrivent une augmentation de la PAL dans un contexte d'hypominéralisation. Le cas le plus spectaculaire qui a été décrit est le modèle de la souris hypophosphatémique (Hyp) dont le gène *Phex* est dysfonctionnel, et qui présente non seulement une production ostéocytaire accrue de FGF23, mais également une expression ostéoblastique accrue de la PAL ainsi qu'une hypominéralisation (387). En plus de l'hypominéralisation et de la PAL, d'autres travaux ont rapporté dans ce modèle, des similitudes très intéressantes avec notre modèle murin *Lpar1* Δ Ob, comme une augmentation de la taille des lacunes ostéocytaires et

une altération de leur réseau dendritique (387,388). En conclusion, l'absence du récepteur LPA1 dans la lignée ostéoblastique a révélé *in vitro*, des altérations sur plusieurs processus cellulaires de l'ostéogenèse, allant de la prolifération des progéniteurs à la maturation complète des ostéoblastes. Cependant *in vivo*, ces altérations n'ont pas montré un impact significatif sur le développement de l'os trabéculaire des souris *Lpar1ΔOb* à 4 semaines de vie.

2. Implication du récepteur LPA1 au cours de l'ostéocytogenèse

Les souris *Lpar1ΔOb* ont présenté une hypominéralisation de l'os cortical, une apoptose élevée des ostéocytes et une altération sévère du réseau lacuno-canaliculaire. Les ostéocytes de la matrice présentaient des lacunes plus larges et des dendrites ostéocytaires moins nombreuses, ainsi qu'une diminution de l'expression d'importants marqueurs à savoir E11, Dmp1, Dkk1 et SOST. Dans la littérature, de telles anomalies ont été rapportées dans plusieurs études, de façon corrélée pour la plupart. La diminution de la minéralisation et la réduction de l'épaisseur de l'os cortical ont été souvent corrélées à l'altération du réseau lacuno-canaliculaire des ostéocytes, et retrouvées dans les modèles d'os âgés, sénescents, et ostéoporotique (389–392). De même, McKenzie et al ont récemment rapporté un lien entre survie des ostéocytes, porosité corticale et masse osseuse. En effet, dans leur modèle de souris invalidées conditionnellement pour les récepteurs FGFR1 et FGFR2 dans les ostéoblastes matures et les ostéocytes, ils ont mis en évidence une augmentation de la mort ostéocytaire et une augmentation de la taille des lacunes ostéocytaires dès 3 semaines de croissance (393). En revanche, à partir de 6 semaines les souris ont développé une croissance osseuse accrue, mais immature avec une altération des propriétés mécaniques. Par ailleurs, des défauts de différenciation et de maturation des cellules ostéoblastiques peuvent résulter en une mort cellulaire accrue des ostéocytes, une perte de masse osseuse et une augmentation des risques de fractures (391). Ainsi, les travaux de Piemontese et al ont par exemple rapporté une diminution de la masse osseuse, une réduction de l'épaisseur corticale, une proportion importante de lacunes ostéocytaires vides et une altération dans le réseau ostéocytaire dans leur modèle de souris *Osx1-Cre/Atg7ΔOb* déficientes pour l'autophagie dans les ostéoblastes (figure 26) (394). Ce modèle est d'autant plus intéressant car l'autophagie est un processus de différenciation important dans la lignée ostéoblastique

(395). Tous ces différents modèles semblent présenter des mécanismes similaires avec notre modèle de souris *Lpar1* Δ Ob, en particulier au niveau des ostéocytes et de l'os cortical.

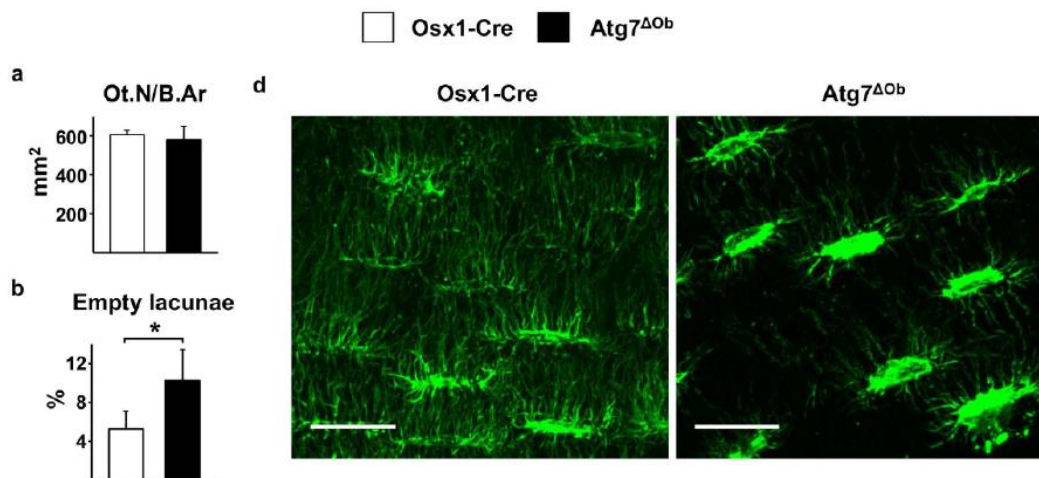


Figure 26 : Altérations du réseau d'ostéocytes chez les souris invalidées pour l'autophagie dans les cellules de la lignée des ostéoblastes. a) Mesures histomorphométriques de la densité des ostéocytes (Ot.N / B.Ar, nombre d'ostéocytes par zone osseuse) dans l'os cortical tibial des souris *Osx-cre* ($n = 4$) et *Atg7* Δ Ob ($n = 5$). b) Mesure histomorphométriques des lacunes ostéocytaires vides dans l'os cortical tibial des mêmes souris décrites en a. (d) Images représentatives du marquage à la phalloïdine des coupes de tibia. Toutes les mesures ont été effectuées sur des portées de 6 mois (394).

Enfin, dans le modèle de la souris hypophosphatémique que j'évoquais précédemment, et dont le gène *Phex* est dysfonctionnel, des similitudes très intéressantes sont retrouvées par rapport aux souris *Lpar1* Δ Ob (figure 27). En effet, comme indiqué à la figure 14, les souris Hyp présentent un os cortical poreux, avec une altération de l'organisation des ostéocytes (388). L'ensemble de ces données semble indiquer que la chaîne de causalité démarre par un défaut de différenciation et/ou de minéralisation des ostéoblastes, qui pourrait découler en une mort cellulaire anormale des ostéoblastes et/ou des ostéocytes. Comme nous avons vu en introduction, la minéralisation est un élément important dans la maturation terminale de l'ostéocyte (51). Par conséquent, un défaut de minéralisation pourrait impacter sa survie et provoquer une altération dans l'organisation de la matrice osseuse.

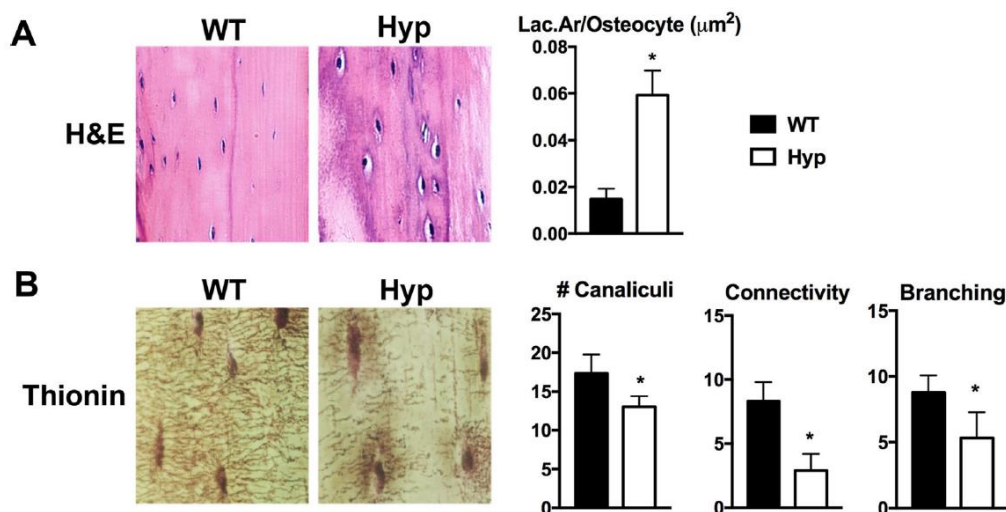


Figure 27 : Altérations de l'os cortical et du réseau d'ostéocytes chez les souris Hyp, déficientes pour le gène Phex. (A) Coloration H&E des cortex tibiaux des souris WT et Hyp. Quantification histomorphométrique de l'aire des lacunes ostéocytaires normalisée par le nombre d'ostéocytes (Lac.Ar/osteocyte); (B) Coloration à la thionine du réseau canaliculaire dans les cortex tibiaux des souris WT et Hyp. Quantification du nombre de canalicules / ostéocytes, des connectivités canaliculaires et des ramifications canaliculaires. Les données sont représentatives de celles obtenues à partir de 3 souris par génotype. $p < 0,05$ (388).

Dans le modèle *Lpar1* Δ Ob, on pourrait donc supposer que le LPA via son récepteur LPA1 contrôle l'homéostasie osseuse, par son action précoce dans la prolifération, la survie et la minéralisation de l'ostéoblaste, et que l'absence de cette action a pu provoquer ou aggraver les effets sur l'ostéocyte. De plus, il a récemment été démontré que le LPA via son récepteur LPA1 était impliqué dans la production du FGF23 dans le tissu osseux (314). Sachant que le FGF23 est un acteur hormonal absolument crucial pour le control de l'homéostasie du phosphate, on pourrait aussi supposer que l'absence du LPA1 impacte de façon indirecte le processus de minéralisation. Ces nouvelles données représentent une perspective très intéressante d'exploration de la relation entre LPA, FGF23 et métabolisme phosphocalcique.

Nous avons montré *in vitro* que le LPA, par l'intermédiaire du LPA1, exerce une action spécifique sur l'ostéocytogenèse et sur la formation des dendrites grâce aux stimulations par le FGF2. Ces données sont en accord avec la littérature, le LPA ayant déjà été rapporté comme stimulant l'élongation des dendrites dans la lignée ostéocytaire MLOY-4 par un mécanisme dépendant du couplage Gi (380). Le réseau des dendrites faisant partie intégrante de la machinerie de communication cellulaire et d'échange de nutriments, on peut

supposer que la taille réduite des dendrites ostéocytaires des souris *Lpar1* Δ Ob a pu induire leur entrée en apoptose plus précocement.

L'ensemble de ces observations laissent penser que le phénotype des souris *Lpar1* Δ Ob serait une résultante des impacts causés sur l'ostéoblastogenèse et la minéralisation osseuse, ainsi que sur l'ostéocytogenèse. Pour différencier ces deux processus, il serait probablement intéressant d'étudier l'importance du récepteur LPA1 dans un modèle d'inactivation spécifique dans l'ostéocyte, comme les modèles basés sur l'expression de la recombinaison CRE sous le contrôle de *Dmp1* ou de *Sost* (393,396,397). De plus, cela pourrait permettre de mieux élucider les voies de signalisations impliquées en aval et leurs cibles moléculaires.

3. Signalisation impliquée dans les défauts d'ostéoblastogenèse et d'ostéocytogenèse dans le modèle *Lpar1* Δ Ob.

Le LPA via son récepteur LPA1 est capable de déclencher diverses cascades de signalisation dépendantes du couplage à différentes protéines G, à savoir Gai, G α 12/13 ou Gq. Dans le contexte du développement osseux, notamment au cours de l'ostéoblastogenèse, certains de ces couplages ont particulièrement été mis en évidence, tels que récapitulés par Blackburn J et Mansell JP (voir figure 28) (398).

Ainsi, le LPA a largement été décrit dans la littérature comme activant majoritairement une signalisation Gi, aboutissant à l'activation de la cascade des MAP kinases notamment ERK. Cette signalisation via ERK, est connue depuis très longtemps comme une voie majeure de la signalisation LPA, en raison de ses effets sur la prolifération et la survie cellulaire et la différenciation des ostéoblastes. Elle stimule notamment l'expression de la PAL (figure 28). Par contre, l'action de Gi sur l'activité de l'adénylate cyclase, qui reste un effet important de l'axe Gi, est encore mal connue dans les ostéoblastes. Au niveau de l'ostéocytogenèse, le couplage Gi a également été rapporté de même qu'une implication du récepteur LPA1.

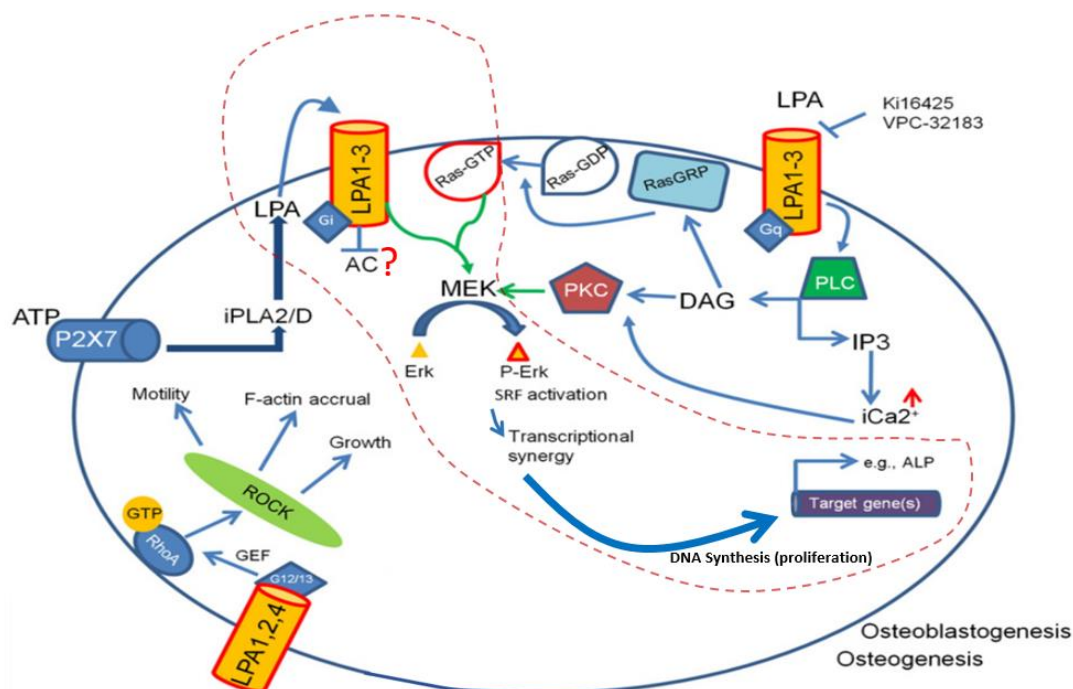


Figure 28 : Aperçu des voies de signalisation du LPA dans les ostéoblastes (Adapté de Blackburn et Mansell, 2012). Plusieurs voies de signalisation sont à l'origine des réponses cellulaires des ostéoblastes sous l'action du LPA. L'activation de G12/13 induit une activation de ROCK et stimule un remaniement du cytosquelette. L'activation de G_i, le plus souvent associé au LPA1 (entouré en rouge) induit une activation de MEK, une augmentation de la phosphorylation de ERK et stimule la prolifération cellulaire et l'expression de la PAL dans les ostéoblastes. L'action sur la régulation de l'adénylate cyclase n'est pas connue. Le LPA a également été rapporté comme stimulant la minéralisation en réponse à l'action de la signalisation purinergique via les récepteurs P2X7; dans ce cas, le LPA généré peut rétroagir et / ou influencer les cellules voisines de manière autocrine. Enfin, une activation de PKC via G_q également rapportée par le LPA1-3, avec un effet potentialisateur sur l'activation de ERK (398).

Au cours de mes travaux je me suis particulièrement intéressé à la signalisation G_i via le récepteur LPA1. J'ai tout d'abord exploré l'impact de LPA1/G_i sur l'activité de l'adénylate cyclase, et donc sur la production de l'AMPc cyclique. Plusieurs hypothèses sont possibles. D'abord, en absence du récepteur LPA1 et de son couplage G_i, il pourrait y avoir une perte totale du signal G_i et une augmentation de la production de l'AMPc intracellulaire (suractivation intrinsèque). Comme deuxième hypothèse, si le signal G_i n'est pas perdu, et qu'il persiste, il pourrait s'agir d'une compensation par d'autres récepteurs au LPA (LPA 2,3, et 4) capables d'activer G_i. La troisième possibilité est que le signal G_i du récepteur LPA1 n'ait absolument aucun impact sur l'adénylate cyclase et sur la production d'AMPc.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Pour étudier ces hypothèses, j'ai utilisé le modèle *in vitro* des ostéoblastes immortalisés Ob-Lpar1fl/fl et cl1-Ob-Lpar1^{-/-} indifférenciés et je me suis intéressé à l'axe Gi/AMPc. En lysant les cellules, il est possible de doser l'AMPc par une méthode ELISA. Cette approche peut être réalisée au repos, en absence de ligand. Ensuite, pour évaluer la stimulation de Gi, il est possible d'activer chimiquement l'adénylate cyclase par la Forskoline (agent pharmacologique) pour augmenter le taux d'AMPc intracellulaire. En stimulant dans un second temps les cellules par des agonistes Gi comme le LPA, on évalue le taux d'inhibition de la production d'AMPc. Comme indiqué à la figure 29A, le niveau basal d'AMPc intracellulaire est plus bas dans les cellules cl1-Ob-Lpar1^{-/-} comparé aux cellules contrôles. Après stimulation par 10μM de FSK, et 1 ou 10μM de LPA, les cellules Ob-Lpar1fl/fl et cl1-Ob-Lpar1^{-/-} ont présenté une diminution similaire de l'AMPc accumulé après 30min de l'ordre de 50% (figure 29B).

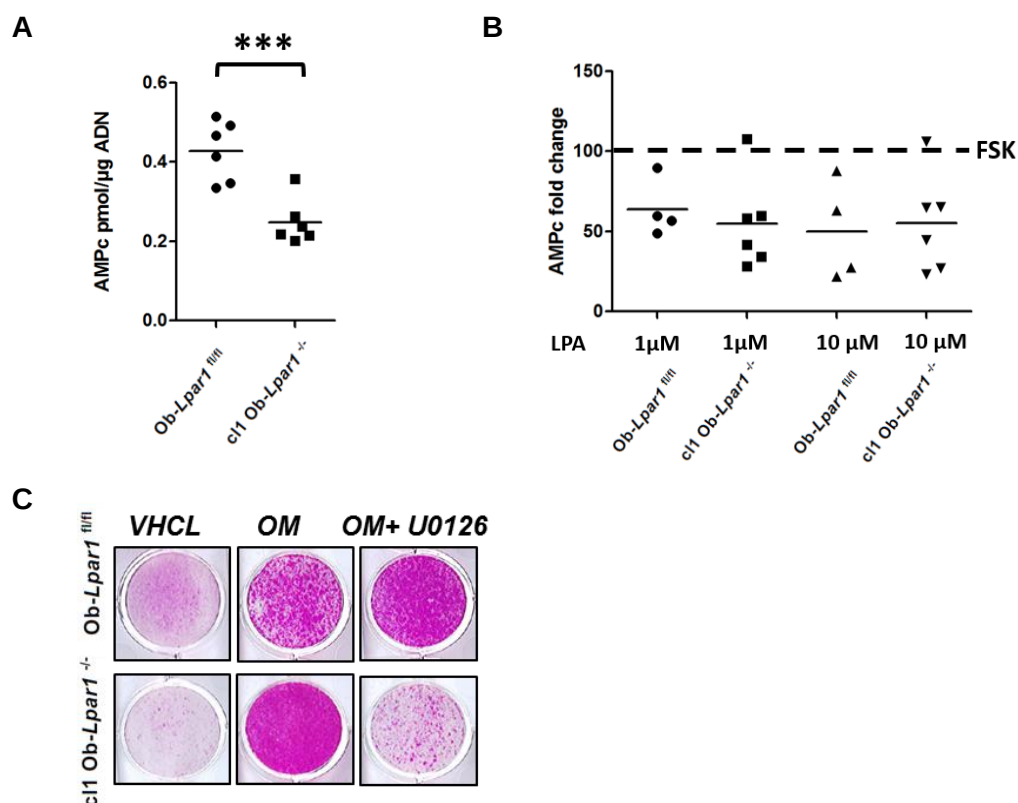


Figure 29 : Exploration de l'activité Gi/AMPc/ERK en absence du récepteur LPA1 dans les ostéoblastes *in vitro*. (A, B) Les clones cl1-Ob-Lpar1^{-/-} et Ob-Lpar1fl/fl ont été ensemencés dans le milieu de culture 10% SVF, passés en milieu 0% SVF pendant 24h, traités pendant 1h à l'IBMX, puis stimulés ou non par 10μM de

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

*Forskoline +/- 1ou 10µM de LPA pendant 30 minutes. Les cellules ont ensuite été lysées dans du HCL à 0,1M, puis l'AMPc intracellulaire a été dosé par réaction colorimétrique ELISA (Enzo life sciences). La valeur du dosage a été normalisée par la quantité d'ADN cellulaire. (A) AMPc dosé sur les cellules au repos. (B) AMPc dosé sur les cellules stimulées (C) Coloration de la PAL réalisée sur les clones cl1-Ob-Lpar1^{-/-} et Ob-Lpar1^{fl/fl} cultivés dans le milieu ostéogénique pendant 14 jours avec ou sans U0126 (10µM). Les valeurs sont la moyenne ± SEM * p <0,05, ** p <0,01 évaluée par le test de Mann-Whitney.*

Un résultat similaire a été obtenu sur les cellules différenciées pendant 21 jours en milieu ostéogénique. Pour expliquer ces résultats, on peut émettre comme hypothèses que soit il y a une activation basale de l'axe Gi/AMPc dans les cellules cl1-Ob-Lpar1^{-/-}, soit une activité constitutive Gs/AMPc du récepteur LPA1, les deux revenant à la normale en présence d'une forte stimulation de l'AMPc. Dans le premier cas, il pourrait s'agir d'une activité Gi constitutive de l'un ou des récepteurs LPA 2,3 et 4. Dans la littérature cette hypothèse n'a jamais été clairement vérifiée. Le terme «activité constitutive des RCPG» a même été associé dans certains cas à un artefact expérimental généré par la liaison de ligands endogènes qui ne sont pas retirés de leurs sites de liaison au RCPG pendant les processus de pré-incubation (399). Ceci pourrait particulièrement être vrai dans le cas du LPA qui peut être produit localement au niveau des membranes cellulaires (294,307).

Dans un second temps, je me suis intéressé à l'activité de Gi/ERK. Des cellules ont été cultivées en milieu ostéogénique avec ou sans traitement par le U0126, un inhibiteur de ERK1/2. Au cours de cette approche, le LPA est « supposé » apporté par la présence de sérum dans le milieu de la même façon pour les cellules contrôle que les cl1-Ob-Lpar1^{-/-}. Cette fois-ci, je me suis directement intéressé à l'évaluation de l'activité PAL, comme étant un effecteur de la signalisation ERK dans les ostéoblastes. L'activité PAL a été retrouvée augmentée au bout de 14 jours de différenciation dans les cellules cl1-Ob-Lpar1^{-/-}, confirmant nos précédents résultats (figure 29C). En revanche, en présence d'U0126, on obtient une diminution importante de la PAL dans les cellules cl1-Ob-Lpar1^{-/-} tandis qu'aucune variation n'est retrouvée dans les cellules contrôle. Même si ces expériences restent insuffisantes, on pourrait supposer qu'en présence du récepteur LPA1, l'activité de la PAL est assurée par un autre couplage de signalisation que Gi/ERK, et que cette autre voie est probablement majoritaire. En absence du récepteur LPA1, l'excès de production de PAL semble être lié à une suractivité du signal Gi/ERK, provenant potentiellement de l'activation d'un autre ou d'autres récepteurs ou encore d'un mécanisme inconnu. Si les résultats de

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

l'AMPC sont surprenants, ceux-ci, quoique contre-intuitifs, vont également dans le sens d'une activité supérieure de Gi. Sur le plan physiopathologique, la surexpression de Gi a été rapportée dans des données *in vivo* comme étant associée à une diminution de l'ostéogenèse (217). Des expériences complémentaires seraient utiles pour décrypter l'implication d'un tel mécanisme chez les souris *Lpar1ΔOb*.

Comme évoqué précédemment, en absence du LPA1, trois autres récepteurs sont susceptibles d'être impliqués dans une activité Gi, à savoir les récepteurs LPA 2,3 et 4. Je me suis donc intéressé à l'expression de ces récepteurs dans les cellules cl1-Ob-*Lpar1-/-* et contrôle. J'ai déterminé par qPCR le profil d'expression de ces récepteurs au cours de la différenciation des ostéoblastes immortalisés. Comme indiqué à la figure 30, aucune modification statistiquement significative n'a été retrouvée chez les cellules cl1-Ob-*Lpar1-/-*, hormis une tendance à la diminution du LPA3 et à une augmentation du LPA4 en fin de différenciation. Il importe toutefois de noter que cette expression n'est pas un critère exclusif d'exploration de la signalisation, leur cinétique d'action ainsi que leur expression protéique pouvant influencer tout autant le résultat.

Il paraît donc clair que nous n'avons pas assez d'éléments pour trancher en faveur de l'hypothèse d'une suractivation de la voie Gi/ERK pour expliquer tout au moins les défauts d'ostéoblastogenèse dans le modèle *Lpar1ΔOb*.

Ceci étant, l'expression du récepteur LPA4 est particulièrement intéressante à discuter, et doit être replacé dans son contexte au niveau osseux. En effet, une balance de signalisation entre le LPA1 (via Gi) et le LPA4 (via Gs) a longtemps été suggérée dans la littérature sans démonstration définitive (384). L'équilibre des signaux issus de ces deux récepteurs seraient déterminantes pour optimiser la prolifération et la différenciation cellulaires au cours de l'ostéogenèse (218). Pour rappel, les souris *Lpar4-/-* présentent une augmentation du volume osseux trabéculaire, du nombre et de l'épaisseur des travées (384). Comme vu en introduction, un mécanisme a récemment été rapporté, stipulant que le LPA4 inhibe l'ostéogenèse en bloquant la signalisation RhoA / ROCK1 / β -caténine, favorisant au bout du compte une différenciation adipocytaire (379). Dans le cadre de notre modèle de souris *Lpar1ΔOb*, on pourrait ainsi émettre l'hypothèse que l'action du récepteur LPA1 pendant l'ostéoblastogenèse, passe par une promotion de la voie RhoA / ROCK1 / β -caténine, et donc un couplage G12/13. Au cours de mes travaux, je n'ai pas pu explorer l'action des couplages G12/13, ni Gq. Il serait donc intéressant à l'occasion de projets futurs

d'analyser l'importance de ces couplages non seulement pendant l'ostéoblastogenèse, mais également au cours de l'ostéocytogenèse, un des processus sévèrement impacté chez les souris *Lpar1* Δ Ob.

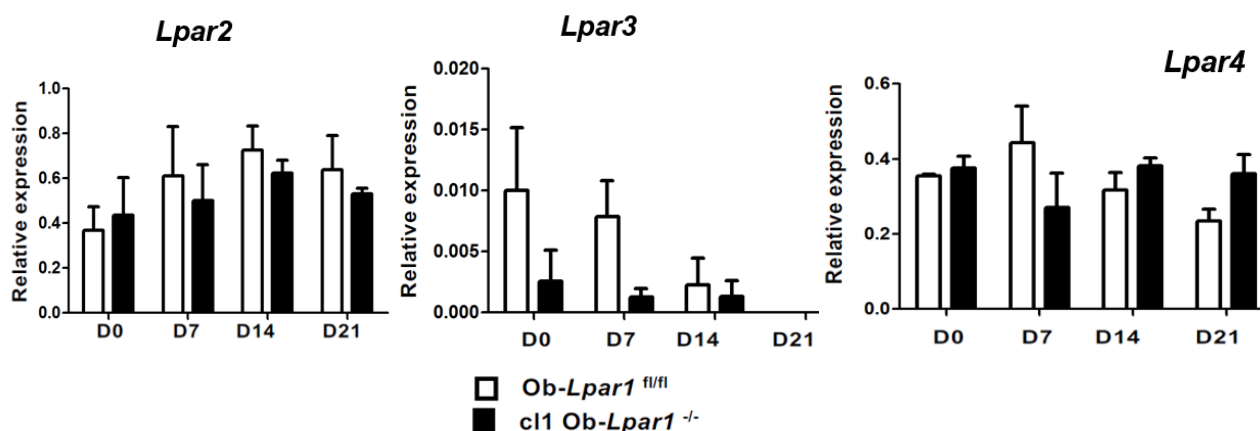


Figure 30 : Expression relative par RT-qPCR des récepteurs LPA2, 3, et 4 au cours de la différenciation ostéoblastique *in vitro*. Les clones cl1-Ob-*Lpar1*^{-/-} et Ob-*Lpar1*^{fl/fl} ont été cultivés dans le milieu ostéogénique et les échantillons d'ARN ont été récoltés au fur et à mesure pour la RT-qPCR. Les valeurs sont la moyenne $\pm$ SEM * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ évaluée par le test de Mann-Whitney.

Les altérations observées sur l'ostéocytogenèse *in vitro* et *in vivo* dans notre modèle *Lpar1* Δ Ob méritent également d'être discuté du point de vue de la signalisation. Depuis l'étude de Karagiosis et al, montrant que le LPA stimule la formation de dendrites sur les cellules de type ostéocytaires MLO-Y4 par un mécanisme Gi dépendant, aucune autre donnée n'existe dans la littérature (380).

Au cours de cette thèse, je me suis intéressé à la signalisation Gi du LPA1 dans le modèle d'ostéocytogenèse. En effet, j'ai d'abord prétraité les cellules contrôle Ob-*Lpar1*^{fl/fl} par le ki16425 (10 μ M), un inhibiteur sélectif des récepteurs LPA1 et LPA3 avant de les stimuler par le FGF2. Comme indiqué à la figure 31A, le blocage pharmacologique des récepteurs LPA1 et 3 dans les cellules contrôles n'inhibe pas l'expression de E11 au niveau messager. Dans ces conditions, cela pourrait signifier que la présence du récepteur LPA1 est requise pour médier l'expression et/ou l'activité de E11 suite à une stimulation par FGF2. Cependant, cette approche peut présenter des limites. Il est tout aussi possible que la dose d'inhibiteur utilisée soit insuffisante, et que la durée du traitement ne soit pas optimale. De

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

même l'utilisation du ki16425 impacte aussi le récepteur LPA3 dont le rôle dans ce modèle, et le rôle dans l'activité du récepteur LPA1 n'est pas connu.

En utilisant les mêmes conditions de culture, je me suis intéressé à l'expression des récepteurs LPA 2,3 et 4. Comme indiqué à la figure 31b, aucune modification majeure n'a été observée dans les cellules contrôles ni dans les cl1-Ob-*Lpar1*^{-/-}. On note tout de même une tendance pour le LPA4 à diminuer laissant penser qu'il pourrait être plus important dans l'ostéoblastogenèse que dans l'ostéocytogenèse. Aucune donnée de la littérature ne permet d'appuyer cette hypothèse, hormis le fait que dans l'étude de Karagiosis et al, une expression quasi nulle du LPA4 ait été retrouvée dans les lignées ostéocytaires MLOY4.

En somme, même si nous n'avons pas tous les éléments pour comprendre les mécanismes moléculaires supprimés ou induits par l'absence du récepteur LPA1, nous avons pu discuter quelques hypothèses, et leur possible implication dans les processus d'ostéoblastogenèse et d'ostéocytogenèse. Ces expériences préliminaires sont tout de même des pistes très intéressantes pour la suite du travail sur le récepteur LPA1.

Pour poursuivre ce travail, il serait intéressant de restaurer ou de surexprimer le récepteur LPA1 dans les cellules ostéoblastiques afin d'étudier les voies de signalisations impliquées au cours de l'ostéocytogenèse. Il serait également intéressant d'étudier l'importance du récepteur LPA1 dans un modèle d'invalidation spécifique à l'ostéocyte.

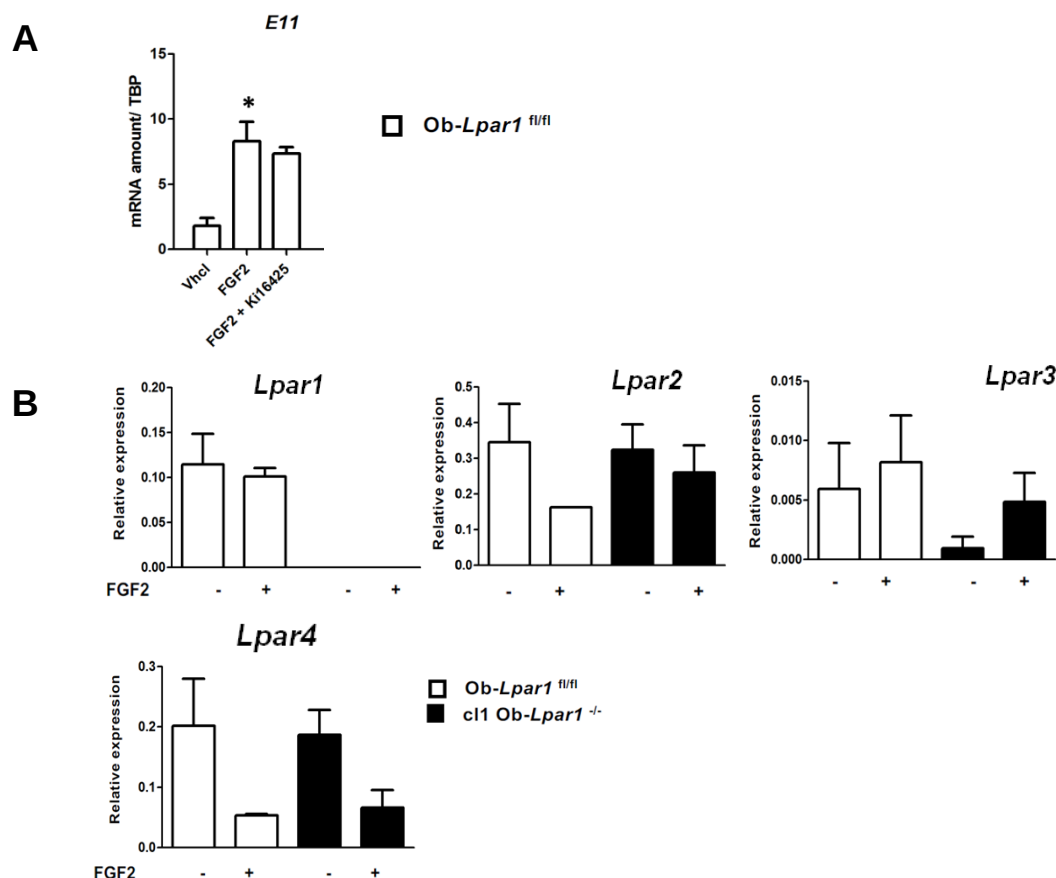


Figure 31 : Exploration de l'implication des récepteurs au LPA associés au couplage Gi au cours de l'ostéocytogenèse in vitro. Les clones cl1-Ob-*Lpar1*^{-/-} et Ob-*Lpar1*^{fl/fl} ont été stimulés avec 10ng/ml de FGF2 seul ou après prétraitement avec 10μM de Ki16425 dans le milieu. Les échantillons d'ARN ont été récoltés 4 heures après la stimulation pour la RT-qPCR. Les valeurs sont la moyenne ± SEM * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ évaluée par le test de Mann-Whitney. (A) Expression relative de *E11* dans les cellules Ob-*Lpar1*^{fl/fl} avec ou sans Ki16425. (B) Expression relative des récepteurs associés au couplage Gi du LPA.

4. Perspectives sur l'intérêt du LPA en physiopathologie osseuse

L'étude réalisée sur le modèle de souris *Lpar1*^{ΔOb} a permis de montrer que le LPA1 était un acteur majeur dans le processus de minéralisation osseuse et dans le processus d'ostéocytogenèse et dans la survie des ostéocytes. Ces données laissent penser que le LPA pourrait être une cible intéressante au niveau osseux. Ceci ouvre donc des perspectives pour répondre à des problématiques de minéralisation osseuse, par exemple dans le contexte des approches de génération tissulaire par optimisation de biomatériaux. De plus en plus d'études sont réalisées dans ce domaine afin de mieux moduler la réparation de l'os

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

dans les cas de fractures sévères. Ainsi, une étude récemment publiée par Yu et al, a montré que des analogues du LPA (LPA fluoré) permettaient une régénération osseuse efficace (400).

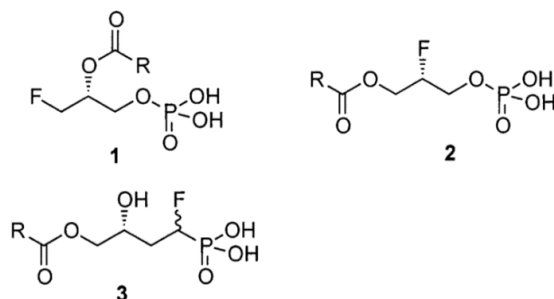


Figure 32 : Structures d'analogues monofluorés du LPA (401).

En effet, Yu et al ont utilisé un modèle murin d'ostéotomie, où est induite une ablation critique de l'os au niveau fémoral. Ensuite, ils ont remplacé le tissu osseux par un biomatériau dégradable, le chitosan/beta-tricalcium, contenant soit du PBS, soit du LPA, soit un analogue du LPA. Au bout de 10 semaines, le matériau imbibé d'analogue du LPA a permis une réparation totale de l'os comme indiqué par les analyses de micro CT et d'histologie à la figure 33.

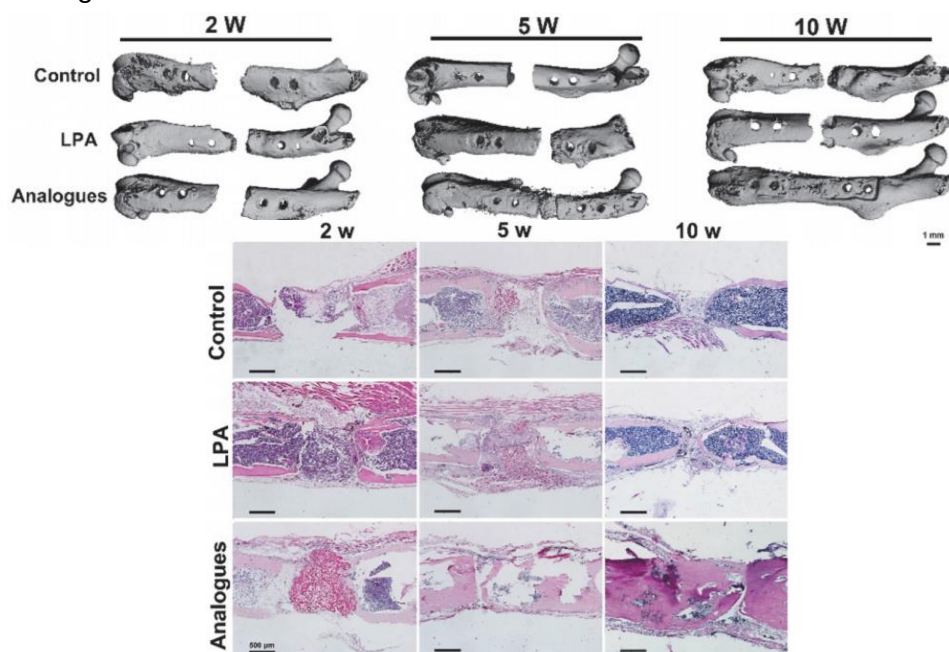


Figure 33 : L'analogue du LPA permet une régénération osseuse chez la souris ostéotomisée contrairement au LPA (400) (micro CT et coloration Hématoxyline éosine des coupes d'os 2, 5 et 10 semaines après la chirurgie)

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Yu et al, ont clairement attribué l'absence d'effet *in vivo* du LPA à son instabilité moléculaire, l'analogue utilisé, lui possédant une excellente stabilité. Cette approche pourrait donc potentiellement être utilisée chez l'homme pour régénérer l'os, ou comme traitement de l'ostéoporose.

Les résultats obtenus sur l'ostéocytogenèse dans le modèle *Lpar1ΔOb* ouvrent des pistes intéressantes pour explorer le rôle du LPA dans les mécanismes cellulaires impliqués dans la physiopathologie de la scoliose idiopathique de l'adolescent (AIS).

Les patients AIS sont associés à une faible masse osseuse, et un volume osseux cortical et trabéculaire plus faible avec des propriétés mécaniques affectées (402,403). La physiopathologie de cette maladie n'est pas clairement établie. Les différentes études tendent à indiquer qu'il s'agit d'une pathologie multifactorielle dans laquelle plusieurs paramètres anormaux coexistent (219). Des anomalies ont entre autres été rapportées dans la littérature aux niveaux génétique et hormonal (219). Ainsi, une résistance à la signalisation Gi de certains RCPGs a été rapportée parmi les mécanismes moléculaires affectés dans les ostéoblastes des patients AIS. Comme nous avons vu en introduction, les récepteurs de la sérotonine, de la mélatonine et de la ghréline sont des acteurs importants dans le control de l'ostéogenèse. En 2004, l'équipe du Pr Moreau au Canada a rapporté que la voie Gi/mélatonine est dérégulée dans les ostéoblastes matures de patients AIS (287). Récemment, il a été publié dans le laboratoire une étude montrant que la ghréline induit la différenciation des ostéoblastes humains matures via la voie GHS-R1a/Gi/AMPC et que cette voie de la ghréline est altérée chez les patients AIS (404). De même, nous avons mis en évidence au laboratoire, une résistance de la signalisation LPA via Gi sur la production d'AMPC sur 42% des AIS étudiés, résistance retrouvée chez seulement 18% des témoins. Il semble donc que le LPA pourrait jouer un rôle majeur dans l'AIS.

Sur la base de mon travail, nous avons émis l'hypothèse que le LPA pourrait être impliqué dans certains dysfonctionnements chez les AIS, potentiellement via une résistance Gi/AMPC ou plutôt par une résistance de l'axe Gi/ERK du LPA. Une telle résistance de la signalisation du LPA dans les ostéoblastes AIS, pourrait causer des anomalies cellulaires au niveau des ostéoblastes mais aussi au niveau des ostéocytes.

D'ailleurs, au niveau des mécanismes cellulaires, des études récentes chez des patients AIS, ont rapporté des anomalies ostéocytaires similaires à celles retrouvées dans le modèle *Lpar1ΔOb*. Les ostéocytes de ces patients présentaient des dendrites moins

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

nombreuses et moins longues que les témoins (405,406). De plus les mêmes études ont montré un défaut de minéralisation et une diminution des principaux marqueurs de l'activité des ostéocytes (figure 34) (405,406).

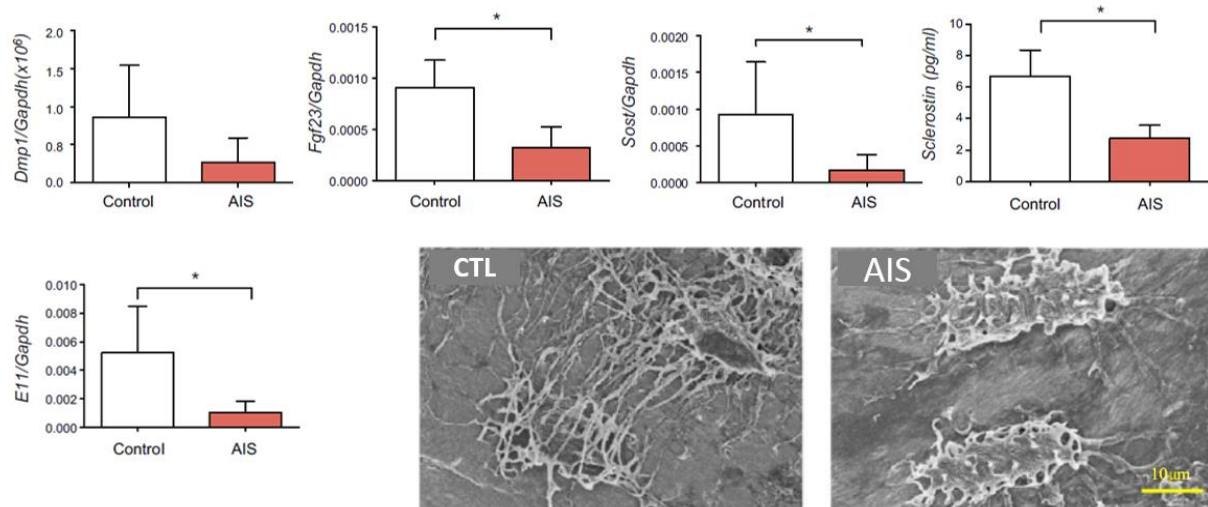


Figure 34 : Altérations ostéocytaires chez les patients AIS : RT-qPCR montrant les principaux marqueurs ostéocytaires sur des ostéocytes primaires de patients AIS et images de microscopie électronique à balayage de coupes de biopsies de tissus osseux (au niveau de la crête iliaque) montrant les altérations du réseau dendritiques des ostéocytes AIS. Figure modifiée à partir des références (405,406).

L'ensemble de ces résultats a été retrouvé dans notre modèle de souris *Lpar1ΔOb*. Cependant ils demeurent insuffisants pour établir une corrélation entre la physiopathologie et le LPA. D'où la nécessité d'investiguer d'avantage les mécanismes moléculaires du LPA chez les AIS.

Une exploration fine de la signature moléculaire du LPA dans les ostéoblastes AIS par RNA sequencing apparaît comme une approche intéressante. Ceci permettrait entre autres d'explorer une potentielle altération du programme de minéralisation et différenciation ostéocytaire et de déterminer de potentiels marqueurs de cette résistance au LPA. Pour réaliser cette exploration en continuité avec ce projet de thèse, l'équipe a obtenu un financement de la part de la région Occitanie (projet RBIO). Grâce à ce financement j'ai pu initier les premières expériences sur des ostéoblastes primaires humains provenant de patients AIS et témoins. J'ai stimulé ces ostéoblastes avec du LPA, puis les ARNs ont été extraits et analysés par RNAseq. L'analyse de ces données permettra potentiellement de d'identifier des cibles du LPA dans les ostéoblastes humains et de déterminer si la résistance au LPA altère le profil l'expression de ces cibles dans les ostéoblastes des patients AIS.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Oury J, Oury F. L'os, un organe pas si inerte.... médecine/sciences. 2018 Jan 1;34(1):54–62.
2. Takahashi N, Yamana H, Yoshiki S, Roodman GD, Mundy GR, Jones SJ, et al. Osteoclast-like cell formation and its regulation by osteotropic hormones in mouse bone marrow cultures. *Endocrinology*. 1988 Apr;122(4):1373–82.
3. Quinn JM, Neale S, Fujikawa Y, McGee JO, Athanasou NA. Human osteoclast formation from blood monocytes, peritoneal macrophages, and bone marrow cells. *Calcif Tissue Int*. 1998 Jun;62(6):527–31.
4. Rubin J, Fan X, Thornton D, Bryant R, Biskobing D. Regulation of murine osteoblast macrophage colony-stimulating factor production by 1,25(OH)2D3. *Calcif Tissue Int*. 1996 Oct;59(4):291–6.
5. Tanaka S, Takahashi N, Udagawa N, Tamura T, Akatsu T, Stanley ER, et al. Macrophage colony-stimulating factor is indispensable for both proliferation and differentiation of osteoclast progenitors. *J Clin Invest*. 1993 Jan;91(1):257–63.
6. Jimi E, Nakamura I, Duong LT, Ikebe T, Takahashi N, Rodan GA, et al. Interleukin 1 induces multinucleation and bone-resorbing activity of osteoclasts in the absence of osteoblasts/stromal cells. *Exp Cell Res*. 1999 Feb 25;247(1):84–93.
7. Dougall WC, Glaccum M, Charrier K, Rohrbach K, Brasel K, De Smedt T, et al. RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev*. 1999 Sep 15;13(18):2412–24.
8. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*. 1997 Nov 13;390(6656):175–9.
9. Kong YY, Feige U, Sarosi I, Bolon B, Tafuri A, Morony S, et al. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature*. 1999 Nov 18;402(6759):304–9.
10. Lee K, Chung YH, Ahn H, Kim H, Rho J, Jeong D. Selective Regulation of MAPK Signaling Mediates RANKL-dependent Osteoclast Differentiation. *Int J Biol Sci*. 2016 Jan 1;12(2):235–45.
11. Franzoso G, Carlson L, Xing L, Poljak L, Shores EW, Brown KD, et al. Requirement for NF-kappaB in osteoclast and B-cell development. *Genes Dev*. 1997 Dec 15;11(24):3482–96.
12. Naito A, Azuma S, Tanaka S, Miyazaki T, Takaki S, Takatsu K, et al. Severe osteopetrosis, defective interleukin-1 signalling and lymph node organogenesis in TRAF6-deficient mice. *Genes Cells Devoted Mol Cell Mech*. 1999 Jun;4(6):353–62.
13. Kurachi T, Morita I, Murota S. Involvement of adhesion molecules LFA-1 and ICAM-1 in osteoclast development. *Biochim Biophys Acta*. 1993 Sep 13;1178(3):259–66.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

14. Nicholson GC, Moseley JM, Sexton PM, Mendelsohn FA, Martin TJ. Abundant calcitonin receptors in isolated rat osteoclasts. Biochemical and autoradiographic characterization. *J Clin Invest.* 1986 Aug;78(2):355–60.
15. Everts V, Delaissé JM, Korper W, Niehof A, Vaes G, Beertsen W. Degradation of collagen in the bone-resorbing compartment underlying the osteoclast involves both cysteine-proteinases and matrix metalloproteinases. *J Cell Physiol.* 1992 Feb;150(2):221–31.
16. Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev.* 1999 Jun;20(3):345–57.
17. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Mar 31;95(7):3597–602.
18. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, et al. osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev.* 1998 May 1;12(9):1260–8.
19. Min H, Morony S, Sarosi I, Dunstan CR, Capparelli C, Scully S, et al. Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis. *J Exp Med.* 2000 Aug 21;192(4):463–74.
20. Tare RS, Babister JC, Kanczler J, Oreffo ROC. Skeletal stem cells: phenotype, biology and environmental niches informing tissue regeneration. *Mol Cell Endocrinol.* 2008 Jun 25;288(1–2):11–21.
21. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999 Apr 2;284(5411):143–7.
22. Dennis JE, Charbord P. Origin and differentiation of human and murine stroma. *Stem Cells Dayt Ohio.* 2002;20(3):205–14.
23. Bianco P, Cossu G. Uno, nessuno e centomila: searching for the identity of mesodermal progenitors. *Exp Cell Res.* 1999 Sep 15;251(2):257–63.
24. Aubin JE. Regulation of Osteoblast Formation and Function. *Rev Endocr Metab Disord.* 2001 Jan 1;2(1):81–94.
25. 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.
26. Schmitt JM, Hwang K, Winn SR, Hollinger JO. Bone morphogenetic proteins: an update on basic biology and clinical relevance. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc.* 1999 Mar;17(2):269–78.
27. Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, et al. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell.* 1997 May 30;89(5):755–64.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

28. Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, et al. *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell*. 1997 May 30;89(5):765–71.
29. Xiao ZS, Hinson TK, Quarles LD. *Cbfa1* isoform overexpression upregulates osteocalcin gene expression in non-osteoblastic and pre-osteoblastic cells. *J Cell Biochem*. 1999 Sep 15;74(4):596–605.
30. Harada H, Tagashira S, Fujiwara M, Ogawa S, Katsumata T, Yamaguchi A, et al. *Cbfa1* isoforms exert functional differences in osteoblast differentiation. *J Biol Chem*. 1999 Mar 12;274(11):6972–8.
31. Collins FL, Rios-Arce ND, Schepper JD, Parameswaran N, McCabe LR. The Potential of Probiotics as a Therapy for Osteoporosis. *Microbiol Spectr*. 2017;5(4).
32. Oh J-H, Park S-Y, de Crombrughe B, Kim J-E. Chondrocyte-specific ablation of Osterix leads to impaired endochondral ossification. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Feb 24;418(4):634–40.
33. Xing W, Godwin C, Pourteymoor S, Mohan S. Conditional disruption of the osterix gene in chondrocytes during early postnatal growth impairs secondary ossification in the mouse tibial epiphysis. *Bone Res*. 2019 Aug 5;7(1):1–8.
34. Singh M, Del Carpio-Cano FE, Monroy MA, Popoff SN, Safadi FF. Homeodomain transcription factors regulate BMP-2-induced osteoactivin transcription in osteoblasts. *J Cell Physiol*. 2012 Jan;227(1):390–9.
35. Lee M-H, Kim Y-J, Kim H-J, Park H-D, Kang A-R, Kyung H-M, et al. BMP-2-induced Runx2 expression is mediated by *Dlx5*, and TGF-beta 1 opposes the BMP-2-induced osteoblast differentiation by suppression of *Dlx5* expression. *J Biol Chem*. 2003 Sep 5;278(36):34387–94.
36. Dodig M, Tadic T, Kronenberg MS, Dacic S, Liu YH, Maxson R, et al. Ectopic *Msx2* overexpression inhibits and *Msx2* antisense stimulates calvarial osteoblast differentiation. *Dev Biol*. 1999 May 15;209(2):298–307.
37. Acampora D, Merlo GR, Paleari L, Zerega B, Postiglione MP, Mantero S, et al. Craniofacial, vestibular and bone defects in mice lacking the Distal-less-related gene *Dlx5*. *Dev Camb Engl*. 1999 Sep;126(17):3795–809.
38. Johnson ML. LRP5 and bone mass regulation: Where are we now? *BoneKEy Rep*. 2012;1:1.
39. Zhang J, Tu Q, Chen J. Applications of Transgenics in Studies of Bone Sialoprotein. *J Cell Physiol*. 2009 Jul;220(1):30–4.
40. Haylock DN, Nilsson SK. Osteopontin: a bridge between bone and blood. *Br J Haematol*. 2006;134(5):467–74.
41. Yoshitake H, Rittling SR, Denhardt DT, Noda M. Osteopontin-deficient mice are resistant to ovariectomy-induced bone resorption. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Jul 6;96(14):8156–60.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

42. Price PA, Otsuka AA, Poser JW, Kristaponis J, Raman N. Characterization of a gamma-carboxyglutamic acid-containing protein from bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1976 May;73(5):1447–51.
43. van de Loo PG, Soute BA, van Haarlem LJ, Vermeer C. The effect of Gla-containing proteins on the precipitation of insoluble salts. *Biochem Biophys Res Commun*. 1987 Jan 15;142(1):113–9.
44. Rosen CJ. Bone remodeling, energy metabolism, and the molecular clock. *Cell Metab*. 2008 Jan;7(1):7–10.
45. Lee NK, Karsenty G. Reciprocal regulation of bone and energy metabolism. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2008 Dec;8(4):351.
46. Orimo H. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J Nippon Med Sch Nippon Ika Daigaku Zasshi*. 2010 Feb;77(1):4–12.
47. Wennberg C, Hessel L, Lundberg P, Mauro S, Narisawa S, Lerner UH, et al. Functional characterization of osteoblasts and osteoclasts from alkaline phosphatase knockout mice. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2000 Oct;15(10):1879–88.
48. Caetano-Lopes J, Lopes A, Rodrigues A, Fernandes D, Perpétuo IP, Monjardino T, et al. Upregulation of Inflammatory Genes and Downregulation of Sclerostin Gene Expression Are Key Elements in the Early Phase of Fragility Fracture Healing. *PLOS ONE*. 2011 Feb 11;6(2):e16947.
49. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev*. 2000 Apr;21(2):115–37.
50. Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Parfitt AM, Manolagas SC. Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 1998 May;13(5):793–802.
51. Dallas SL, Prideaux M, Bonewald LF. The Osteocyte: An Endocrine Cell ... and More. *Endocr Rev*. 2013 Oct 1;34(5):658–90.
52. Robling AG, Bonewald LF. The Osteocyte: New Insights. *Annu Rev Physiol*. 2020;82(1):485–506.
53. Dudley HR, Spiro D. THE FINE STRUCTURE OF BONE CELLS. *J Biophys Biochem Cytol*. 1961 Dec 1;11(3):627–49.
54. Kamioka H, Sugawara Y, Honjo T, Yamashiro T, Takano-Yamamoto T. Terminal differentiation of osteoblasts to osteocytes is accompanied by dramatic changes in the distribution of actin-binding proteins. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2004 Mar;19(3):471–8.
55. Knothe Tate ML, Adamson JR, Tami AE, Bauer TW. The osteocyte. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Jan;36(1):1–8.
56. Bonewald LF. Osteocytes as dynamic multifunctional cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2007 Nov;1116:281–90.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

57. Bonewald LF. Mechanosensation and Transduction in Osteocytes. *BoneKey Osteovision*. 2006 Oct;3(10):7–15.
58. Holmbeck K, Bianco P, Pidoux I, Inoue S, Billingham RC, Wu W, et al. The metalloproteinase MT1-MMP is required for normal development and maintenance of osteocyte processes in bone. *J Cell Sci*. 2005 Jan 1;118(Pt 1):147–56.
59. Okada S, Yoshida S, Ashrafi SH, Schraufnagel DE. The canalicular structure of compact bone in the rat at different ages. *Microsc Microanal Off J Microsc Soc Am Microbeam Anal Soc Microsc Soc Can*. 2002 Apr;8(2):104–15.
60. Hemmatian H, Bakker AD, Klein-Nulend J, van Lenthe GH. Aging, Osteocytes, and Mechanotransduction. *Curr Osteoporos Rep*. 2017;15(5):401–11.
61. Tiede-Lewis LM, Dallas SL. Changes in the Osteocyte Lacunocanalicular Network with Aging. *Bone*. 2019 May;122:101–13.
62. Schulze E, Witt M, Kasper M, Löwik CW, Funk RH. Immunohistochemical investigations on the differentiation marker protein E11 in rat calvaria, calvaria cell culture and the osteoblastic cell line ROS 17/2.8. *Histochem Cell Biol*. 1999 Jan;111(1):61–9.
63. Wetterwald A, Hoffstetter W, Cecchini MG, Lanske B, Wagner C, Fleisch H, et al. Characterization and cloning of the E11 antigen, a marker expressed by rat osteoblasts and osteocytes. *Bone*. 1996 Feb;18(2):125–32.
64. Ohizumi I, Harada N, Taniguchi K, Tsutsumi Y, Nakagawa S, Kaiho S, et al. Association of CD44 with OTS-8 in tumor vascular endothelial cells. *Biochim Biophys Acta*. 2000 Jul 21;1497(2):197–203.
65. Zhang K, Barragan-Adjemian C, Ye L, Kotha S, Dallas M, Lu Y, et al. E11/gp38 Selective Expression in Osteocytes: Regulation by Mechanical Strain and Role in Dendrite Elongation. *Mol Cell Biol*. 2006 Jun;26(12):4539–52.
66. Martín-Villar E, Megías D, Castel S, Yurrita MM, Vilaró S, Quintanilla M. Podoplanin binds ERM proteins to activate RhoA and promote epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Sci*. 2006 Nov 1;119(Pt 21):4541–53.
67. Kunita A, Kashima TG, Ohazama A, Grigoriadis AE, Fukayama M. Podoplanin Is Regulated by AP-1 and Promotes Platelet Aggregation and Cell Migration in Osteosarcoma. *Am J Pathol*. 2011 Aug;179(2):1041–9.
68. Fen JQ, Zhang J, Dallas SL, Lu Y, Chen S, Tan X, et al. Dentin matrix protein 1, a target molecule for Cbfa1 in bone, is a unique bone marker gene. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2002 Oct;17(10):1822–31.
69. Feng JQ, Ward LM, Liu S, Lu Y, Xie Y, Yuan B, et al. Loss of DMP1 causes rickets and osteomalacia and identifies a role for osteocytes in mineral metabolism. *Nat Genet*. 2006 Nov;38(11):1310–5.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

70. Strom TM, Francis F, Lorenz B, Böddrich A, Econs MJ, Lehrach H, et al. Pex gene deletions in Gy and Hyp mice provide mouse models for X-linked hypophosphatemia. *Hum Mol Genet.* 1997 Feb;6(2):165–71.
71. Igarashi M, Kamiya N, Ito K, Takagi M. In situ localization and in vitro expression of osteoblast/osteocyte factor 45 mRNA during bone cell differentiation. *Histochem J.* 2002 May;34(5):255–63.
72. Liu S, Rowe PSN, Vierthaler L, Zhou J, Quarles LD. Phosphorylated acidic serine-aspartate-rich MEPE-associated motif peptide from matrix extracellular phosphoglycoprotein inhibits phosphate regulating gene with homologies to endopeptidases on the X-chromosome enzyme activity. *J Endocrinol.* 2007 Jan;192(1):261–7.
73. Balemans W, Ebeling M, Patel N, Van Hul E, Olson P, Dioszegi M, et al. Increased bone density in sclerosteosis is due to the deficiency of a novel secreted protein (SOST). *Hum Mol Genet.* 2001 Mar 1;10(5):537–43.
74. Brunkow ME, Gardner JC, Van Ness J, Paeper BW, Kovacevich BR, Proll S, et al. Bone dysplasia sclerosteosis results from loss of the SOST gene product, a novel cystine knot-containing protein. *Am J Hum Genet.* 2001 Mar;68(3):577–89.
75. Poole KES, van Bezooijen RL, Loveridge N, Hamersma H, Papapoulos SE, Löwik CW, et al. Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2005 Nov;19(13):1842–4.
76. Yamashita T, Yoshioka M, Itoh N. Identification of a novel fibroblast growth factor, FGF-23, preferentially expressed in the ventrolateral thalamic nucleus of the brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Oct 22;277(2):494–8.
77. Riminucci M, Collins MT, Fedarko NS, Cherman N, Corsi A, White KE, et al. FGF-23 in fibrous dysplasia of bone and its relationship to renal phosphate wasting. *J Clin Invest.* 2003 Sep;112(5):683–92.
78. Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten PE. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat.* 2006 Jan;235(1):176–90.
79. Mason JJ, Williams BO. SOST and DKK: Antagonists of LRP Family Signaling as Targets for Treating Bone Disease. *J Osteoporos.* 2010 Jul 1;2010.
80. Baron R, Hesse E. Update on bone anabolics in osteoporosis treatment: rationale, current status, and perspectives. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012 Feb;97(2):311–25.
81. Loots GG, Kneissel M, Keller H, Baptist M, Chang J, Collette NM, et al. Genomic deletion of a long-range bone enhancer misregulates sclerostin in Van Buchem disease. *Genome Res.* 2005 Jul;15(7):928–35.
82. Plotkin LI, Bellido T. From inside your bones: Osteocytic signaling pathways as therapeutic targets for bone fragility. *Nat Rev Endocrinol.* 2016 Oct;12(10):593–605.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

83. Riddle RC, Clemens TL. Bone Cell Bioenergetics and Skeletal Energy Homeostasis. *Physiol Rev*. 2017 Apr;97(2):667–98.
84. Hirao M, Hashimoto J, Yamasaki N, Ando W, Tsuboi H, Myoui A, et al. Oxygen tension is an important mediator of the transformation of osteoblasts to osteocytes. *J Bone Miner Metab*. 2007 Sep 1;25(5):266–76.
85. Guo D, Keightley A, Guthrie J, Veno PA, Harris SE, Bonewald LF. Identification of osteocyte-selective proteins. *PROTEOMICS*. 2010;10(20):3688–98.
86. Sánchez-de-Diego C, Artigas N, Pimenta-Lopes C, Valer JA, Torrejon B, Gama-Pérez P, et al. Glucose Restriction Promotes Osteocyte Specification by Activating a PGC-1 α -Dependent Transcriptional Program. *iScience*. 2019 May 31;15:79–94.
87. Hardie DG. Keeping the home fires burning: AMP-activated protein kinase. *J R Soc Interface*. 2018;15(138).
88. Villena JA. New insights into PGC-1 coactivators: redefining their role in the regulation of mitochondrial function and beyond. *FEBS J*. 2015 Feb;282(4):647–72.
89. Kogawa M, Khalid KA, Wijenayaka AR, Ormsby RT, Evdokiou A, Anderson PH, et al. Recombinant sclerostin antagonizes effects of ex vivo mechanical loading in trabecular bone and increases osteocyte lacunar size. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 2018 Jan 1;314(1):C53–61.
90. Xiao Z, Zhang S, Mahlios J, Zhou G, Magenheimer BS, Guo D, et al. Cilia-like structures and polycystin-1 in osteoblasts/osteocytes and associated abnormalities in skeletogenesis and Runx2 expression. *J Biol Chem*. 2006 Oct 13;281(41):30884–95.
91. Xiao Z, Dallas M, Qiu N, Nicoletta D, Cao L, Johnson M, et al. Conditional deletion of Pkd1 in osteocytes disrupts skeletal mechanosensing in mice. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2011 Jul;25(7):2418–32.
92. Hughes DE, Salter DM, Simpson R. CD44 expression in human bone: a novel marker of osteocytic differentiation. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 1994 Jan;9(1):39–44.
93. Batra N, Burra S, Siller-Jackson AJ, Gu S, Xia X, Weber GF, et al. Mechanical stress-activated integrin $\alpha 5 \beta 1$ induces opening of connexin 43 hemichannels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Feb 28;109(9):3359–64.
94. Bivi N, Condon KW, Allen MR, Farlow N, Passeri G, Brun LR, et al. Cell autonomous requirement of connexin 43 for osteocyte survival: consequences for endocortical resorption and periosteal bone formation. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2012 Feb;27(2):374–89.
95. Yang W, Lu Y, Kalajzic I, Guo D, Harris MA, Gluhak-Heinrich J, et al. Dentin matrix protein 1 gene cis-regulation: use in osteocytes to characterize local responses to mechanical loading in vitro and in vivo. *J Biol Chem*. 2005 May 27;280(21):20680–90.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

96. Gluhak-Heinrich J, Ye L, Bonewald LF, Feng JQ, MacDougall M, Harris SE, et al. Mechanical loading stimulates dentin matrix protein 1 (DMP1) expression in osteocytes in vivo. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2003 May;18(5):807–17.
97. Gluhak-Heinrich J, Pavlin D, Yang W, MacDougall M, Harris SE. MEPE expression in osteocytes during orthodontic tooth movement. *Arch Oral Biol*. 2007 Jul;52(7):684–90.
98. Kartsogiannis V, Zhou H, Horwood NJ, Thomas RJ, Hards DK, Quinn JM, et al. Localization of RANKL (receptor activator of NF kappa B ligand) mRNA and protein in skeletal and extraskeletal tissues. *Bone*. 1999 Nov;25(5):525–34.
99. Silvestrini G, Ballanti P, Patacchioli F, Leopizzi M, Gualtieri N, Monnazzi P, et al. Detection of osteoprotegerin (OPG) and its ligand (RANKL) mRNA and protein in femur and tibia of the rat. *J Mol Histol*. 2005 Feb;36(1–2):59–67.
100. Al-Dujaili SA, Lau E, Al-Dujaili H, Tsang K, Guenther A, You L. Apoptotic osteocytes regulate osteoclast precursor recruitment and differentiation in vitro. *J Cell Biochem*. 2011 Sep;112(9):2412–23.
101. Zhao S, Zhang YKY, Harris S, Ahuja SS, Bonewald LF. MLO-Y4 osteocyte-like cells support osteoclast formation and activation. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2002 Nov;17(11):2068–79.
102. Kurata K, Heino TJ, Higaki H, Väänänen HK. Bone marrow cell differentiation induced by mechanically damaged osteocytes in 3D gel-embedded culture. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2006 Apr;21(4):616–25.
103. Kulkarni RN, Bakker AD, Everts V, Klein-Nulend J. Inhibition of osteoclastogenesis by mechanically loaded osteocytes: involvement of MEPE. *Calcif Tissue Int*. 2010 Nov;87(5):461–8.
104. Ikeda T, Utsuyama M, Hirokawa K. Expression profiles of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand, receptor activator of nuclear factor kappaB, and osteoprotegerin messenger RNA in aged and ovariectomized rat bones. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2001 Aug;16(8):1416–25.
105. Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-Hora M, Feng JQ, et al. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med*. 2011 Sep 11;17(10):1231–4.
106. Xiong J, Onal M, Jilka RL, Weinstein RS, Manolagas SC, O'Brien CA. Matrix-embedded cells control osteoclast formation. *Nat Med*. 2011 Sep 11;17(10):1235–41.
107. Kogianni G, Mann V, Noble BS. Apoptotic bodies convey activity capable of initiating osteoclastogenesis and localized bone destruction. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2008 Jun;23(6):915–27.
108. Wergedal JE, Baylink DJ. Distribution of acid and alkaline phosphatase activity in undemineralized sections of the rat tibial diaphysis. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc*. 1969 Dec;17(12):799–806.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

109. Nakano Y, Toyosawa S, Takano Y. Eccentric Localization of Osteocytes Expressing Enzymatic Activities, Protein, and mRNA Signals for Type 5 Tartrate-resistant Acid Phosphatase (TRAP). *J Histochem Cytochem*. 2004 Nov;52(11):1475–82.
110. Qing H, Ardeshirpour L, Pajevic PD, Dusevich V, Jähn K, Kato S, et al. Demonstration of osteocytic perilacunar/canalicular remodeling in mice during lactation. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2012 May;27(5):1018–29.
111. Lotinun S, Ishihara Y, Nagano K, Kiviranta R, Carpentier VT, Neff L, et al. Cathepsin K-deficient osteocytes prevent lactation-induced bone loss and parathyroid hormone suppression. *J Clin Invest*. 2019 21;129(8):3058–71.
112. Qing H, Ardeshirpour L, Pajevic PD, Dusevich V, Jähn K, Kato S, et al. Demonstration of osteocytic perilacunar/canalicular remodeling in mice during lactation. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2012 May;27(5):1018–29.
113. Elmardi AS, Katchburian MV, Katchburian E. Electron microscopy of developing calvaria reveals images that suggest that osteoclasts engulf and destroy osteocytes during bone resorption. *Calcif Tissue Int*. 1990 Apr;46(4):239–45.
114. Novo-Rodríguez C, García-Fontana B, Castillo JDDL-D, Andújar-Vera F, Ávila-Rubio V, García-Fontana C, et al. Circulating levels of sclerostin are associated with cardiovascular mortality. *PLOS ONE*. 2018 Jun 21;13(6):e0199504.
115. Kim SP, Frey JL, Li Z, Kushwaha P, Zoch ML, Tomlinson RE, et al. Sclerostin influences body composition by regulating catabolic and anabolic metabolism in adipocytes. *Proc Natl Acad Sci*. 2017 Dec 26;114(52):E11238–47.
116. Holdsworth G, Roberts SJ, Ke HZ. Novel actions of sclerostin on bone. *J Mol Endocrinol*. 2019 01;62(2):R167–85.
117. Han Y, You X, Xing W, Zhang Z, Zou W. Paracrine and endocrine actions of bone-the functions of secretory proteins from osteoblasts, osteocytes, and osteoclasts. *Bone Res*. 2018;6:16.
118. Horton WA, Degnin CR. FGFs in endochondral skeletal development. *Trends Endocrinol Metab TEM*. 2009 Sep;20(7):341–8.
119. Karsenty G. Chondrogenesis just ain't what it used to be. *J Clin Invest*. 2001 Feb;107(4):405–7.
120. Zelzer E, Olsen BR. The genetic basis for skeletal diseases. *Nature*. 2003 May 15;423(6937):343–8.
121. Day TF, Yang Y. Wnt and hedgehog signaling pathways in bone development. *J Bone Joint Surg Am*. 2008 Feb;90 Suppl 1:19–24.
122. Jr MMC. The new bone biology: Pathologic, molecular, and clinical correlates. *Am J Med Genet A*. 2006;140A(23):2646–706.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

123. Knothe Tate ML, Falls TD, McBride SH, Atit R, Knothe UR. Mechanical Modulation of Osteochondroprogenitor Cell Fate. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(12):2720–38.
124. Gerstenfeld LC, Cho TJ, Kon T, Aizawa T, Cruceta J, Graves BD, et al. Impaired intramembranous bone formation during bone repair in the absence of tumor necrosis factor- α signaling. *Cells Tissues Organs.* 2001;169(3):285–94.
125. Yang Y-Q, Tan Y-Y, Wong R, Wenden A, Zhang L-K, Rabie ABM. The role of vascular endothelial growth factor in ossification. *Int J Oral Sci.* 2012 Jun;4(2):64–8.
126. Mackie EJ, Ahmed YA, Tatarczuch L, Chen K-S, Mirams M. Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(1):46–62.
127. Karsenty G. Transcriptional control of skeletogenesis. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2008;9:183–96.
128. Foster JW, Dominguez-Steglich MA, Guioli S, Kwok C, Weller PA, Stevanović M, et al. Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature.* 1994 Dec 8;372(6506):525–30.
129. Wagner T, Wirth J, Meyer J, Zabel B, Held M, Zimmer J, et al. 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.
130. Kronenberg HM. Developmental regulation of the growth plate. *Nature.* 2003 May 15;423(6937):332–6.
131. Kronenberg HM. PTHrP and skeletal development. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Apr;1068:1–13.
132. Govindarajan V, Overbeek PA. FGF9 can induce endochondral ossification in cranial mesenchyme. *BMC Dev Biol.* 2006 Feb 20;6:7.
133. Desoutter J, Mentaverri R, Brazier M, Kamel S. Le remodelage osseux normal et pathologique. *Rev Francoph Lab.* 2012 Nov 1;2012(446):33–42.
134. Alos N, Rauch F. Acquisition de la masse osseuse chez l'enfant : physiopathologie et évaluation. *Arch Pédiatrie.* 2009 Jun 1;16(6):591–3.
135. Javaid MK, Cooper C. Prenatal and childhood influences on osteoporosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2002 Jun;16(2):349–67.
136. Nusse R, Clevers H. Wnt/ β -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell.* 2017 Jun 1;169(6):985–99.
137. Baron R, Kneissel M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat Med.* 2013 Feb;19(2):179–92.
138. Maeda K, Takahashi N, Kobayashi Y. Roles of Wnt signals in bone resorption during physiological and pathological states. *J Mol Med Berl Ger.* 2013 Jan;91(1):15–23.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

139. Karner CM, Long F. Wnt signaling and cellular metabolism in osteoblasts. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2017;74(9):1649–57.
140. Katoh M. Multi-layered prevention and treatment of chronic inflammation, organ fibrosis and cancer associated with canonical WNT/ β -catenin signaling activation (Review). *Int J Mol Med*. 2018 Aug;42(2):713–25.
141. Pai SG, Carneiro BA, Mota JM, Costa R, Leite CA, Barroso-Sousa R, et al. Wnt/beta-catenin pathway: modulating anticancer immune response. *J Hematol Oncol J Hematol Oncol*. 2017 05;10(1):101.
142. Endo M, Nishita M, Fujii M, Minami Y. Insight into the role of Wnt5a-induced signaling in normal and cancer cells. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2015;314:117–48.
143. Bennett CN, Longo KA, Wright WS, Suva LJ, Lane TF, Hankenson KD, et al. Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. *Proc Natl Acad Sci*. 2005 Mar 1;102(9):3324–9.
144. Bennett CN, Ouyang H, Ma YL, Zeng Q, Gerin I, Sousa KM, et al. Wnt10b increases postnatal bone formation by enhancing osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2007 Dec;22(12):1924–32.
145. Visweswaran M, Pohl S, Arfuso F, Newsholme P, Dilley R, Pervaiz S, et al. Multi-lineage differentiation of mesenchymal stem cells - To Wnt, or not Wnt. *Int J Biochem Cell Biol*. 2015 Nov;68:139–47.
146. Nakanishi R, Akiyama H, Kimura H, Otsuki B, Shimizu M, Tsuboyama T, et al. Osteoblast-targeted expression of Sfrp4 in mice results in low bone mass. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2008 Feb;23(2):271–7.
147. Kato M, Patel MS, Levasseur R, Lobov I, Chang BH-J, Glass DA, et al. Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. *J Cell Biol*. 2002 Apr 15;157(2):303–14.
148. Sapir-Koren R, Livshits G. Osteocyte control of bone remodeling: is sclerostin a key molecular coordinator of the balanced bone resorption-formation cycles? *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA*. 2014 Dec;25(12):2685–700.
149. O'Brien CA, Nakashima T, Takayanagi H. Osteocyte control of osteoclastogenesis. *Bone*. 2013 Jun;54(2):258–63.
150. Goldring SR. The osteocyte: key player in regulating bone turnover. *RMD Open*. 2015;1(Suppl 1):e000049.
151. Okamoto K, Nakashima T, Shinohara M, Negishi-Koga T, Komatsu N, Terashima A, et al. Osteoimmunology: The Conceptual Framework Unifying the Immune and Skeletal Systems. *Physiol Rev*. 2017 Aug 16;97(4):1295–349.
152. Glass DA, Bialek P, Ahn JD, Starbuck M, Patel MS, Clevers H, et al. Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev Cell*. 2005 May;8(5):751–64.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

153. Cui Y, Niziolek PJ, MacDonald BT, Zylstra CR, Alenina N, Robinson DR, et al. Lrp5 functions in bone to regulate bone mass. *Nat Med*. 2011 Jun;17(6):684–91.
154. Bonewald LF, Johnson ML. Osteocytes, Mechanosensing and Wnt Signaling. *Bone*. 2008 Apr;42(4):606–15.
155. Kim J, Kim J, Kim DW, Ha Y, Ihm MH, Kim H, et al. Wnt5a Induces Endothelial Inflammation via β -Catenin–Independent Signaling. *J Immunol*. 2010 Jul 15;185(2):1274–82.
156. Regard JB, Zhong Z, Williams BO, Yang Y. Wnt Signaling in Bone Development and Disease: Making Stronger Bone with Wnts. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012 Jan 12;4(12):a007997.
157. Enomoto M, Hayakawa S, Itsukushima S, Ren DY, Matsuo M, Tamada K, et al. Autonomous regulation of osteosarcoma cell invasiveness by Wnt5a/Ror2 signaling. *Oncogene*. 2009 Sep;28(36):3197–208.
158. Smolen JS, Landewé R, Bijlsma J, Burmester G, Chatzidionysiou K, Dougados M, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update. *Ann Rheum Dis*. 2017 Jun 1;76(6):960–77.
159. MacLauchlan S, Zuriaga MA, Fuster JJ, Cuda CM, Jonason J, Behzadi F, et al. Genetic deficiency of Wnt5a diminishes disease severity in a murine model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2017 Jul 19;19(1):166.
160. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science*. 1965 Nov 12;150(3698):893–9.
161. Katagiri T, Watabe T. Bone Morphogenetic Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016 Jun 1;8(6).
162. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*. 1988 Dec 16;242(4885):1528–34.
163. Celeste AJ, Iannazzi JA, Taylor RC, Hewick RM, Rosen V, Wang EA, et al. Identification of transforming growth factor beta family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Dec;87(24):9843–7.
164. Tk S, Jc M, Pv H, Wk J, H S, Rf T, et al. Recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1) induces new bone formation in vivo with a specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein and stimulates osteoblast proliferation and differentiation in vitro. *J Biol Chem*. 1992 Oct 1;267(28):20352–62.
165. Wolfman NM, Hattersley G, Cox K, Celeste AJ, Nelson R, Yamaji N, et al. Ectopic induction of tendon and ligament in rats by growth and differentiation factors 5, 6, and 7, members of the TGF-beta gene family. *J Clin Invest*. 1997 Jul 15;100(2):321–30.
166. Steinert A, Weber M, Dimmler A, Julius C, Schütze N, Nöth U, et al. Chondrogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells encapsulated in ultrahigh-viscosity alginate. *J Orthop Res*. 2003;21(6):1090–7.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

167. Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO, Pittenger MF. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng.* 1998;4(4):415–28.
168. Miljkovic ND, Cooper GM, Marra KG. Chondrogenesis, bone morphogenetic protein-4 and mesenchymal stem cells. *Osteoarthritis Cartilage.* 2008 Oct;16(10):1121–30.
169. Bandyopadhyay A, Tsuji K, Cox K, Harfe BD, Rosen V, Tabin CJ. Genetic analysis of the roles of BMP2, BMP4, and BMP7 in limb patterning and skeletogenesis. *PLoS Genet.* 2006 Dec;2(12):e216.
170. Tsuji K, Cox K, Bandyopadhyay A, Harfe BD, Tabin CJ, Rosen V. BMP4 Is Dispensable for Skeletogenesis and Fracture-Healing in the Limb. *JBJS.* 2008 Feb;90(Supplement_1):14–18.
171. Tsuji K, Bandyopadhyay A, Harfe BD, Cox K, Kakar S, Gerstenfeld L, et al. BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. *Nat Genet.* 2006 Dec;38(12):1424–9.
172. Cheng H, Jiang W, Phillips FM, Haydon RC, Peng Y, Zhou L, et al. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am.* 2003 Aug;85(8):1544–52.
173. Canalis E, Economides AN, Gazzerro E. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr Rev.* 2003 Apr;24(2):218–35.
174. Miyazono K. Signal transduction by bone morphogenetic protein receptors: functional roles of Smad proteins. *Bone.* 1999 Jul;25(1):91–3.
175. Nohe A, Keating E, Knaus P, Petersen NO. Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors. *Cell Signal.* 2004 Mar;16(3):291–9.
176. Vukicevic S, Oppermann H, Verbanac D, Jankolija M, Popek I, Curak J, et al. The clinical use of bone morphogenetic proteins revisited: a novel biocompatible carrier device OSTEOGROW for bone healing. *Int Orthop.* 2014 Mar;38(3):635–47.
177. Kuro-o M. The Klotho proteins in health and disease. *Nat Rev Nephrol.* 2019 Jan;15(1):27–44.
178. Wiedemann M, Trueb B. Characterization of a novel protein (FGFRL1) from human cartilage related to FGF receptors. *Genomics.* 2000 Oct 15;69(2):275–9.
179. Eswarakumar VP, Monsonego-Ornan E, Pines M, Antonopoulou I, Morriss-Kay GM, Lonai P. The Il1c alternative of Fgfr2 is a positive regulator of bone formation. *Dev Camb Engl.* 2002 Aug;129(16):3783–93.
180. Ornitz DM, Marie PJ. FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. *Genes Dev.* 2002 Jun 15;16(12):1446–65.
181. Yu K, Xu J, Liu Z, Susic D, Shao J, Olson EN, et al. Conditional inactivation of FGF receptor 2 reveals an essential role for FGF signaling in the regulation of osteoblast function and bone growth. *Dev Camb Engl.* 2003 Jul;130(13):3063–74.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

182. Jacob AL, Smith C, Partanen J, Ornitz DM. Fibroblast growth factor receptor 1 signaling in the osteo-chondrogenic cell lineage regulates sequential steps of osteoblast maturation. *Dev Biol*. 2006 Aug 15;296(2):315–28.
183. Lazarus JE, Hegde A, Andrade AC, Nilsson O, Baron J. Fibroblast growth factor expression in the postnatal growth plate. *Bone*. 2007 Mar;40(3):577–86.
184. Karolak MR, Yang X, Elefteriou F. FGFR1 signaling in hypertrophic chondrocytes is attenuated by the Ras-GAP neurofibromin during endochondral bone formation. *Hum Mol Genet*. 2015 May 1;24(9):2552–64.
185. Horton WA, Hall JG, Hecht JT. Achondroplasia. *Lancet Lond Engl*. 2007 Jul 14;370(9582):162–72.
186. Dailey L, Laplantine E, Priore R, Basilico C. A network of transcriptional and signaling events is activated by FGF to induce chondrocyte growth arrest and differentiation. *J Cell Biol*. 2003 Jun 23;161(6):1053–66.
187. Hung IH, Yu K, Lavine KJ, Ornitz DM. FGF9 regulates early hypertrophic chondrocyte differentiation and skeletal vascularization in the developing stylopod. *Dev Biol*. 2007 Jul 15;307(2):300–13.
188. Liu Z, Lavine KJ, Hung IH, Ornitz DM. FGF18 is required for early chondrocyte proliferation, hypertrophy and vascular invasion of the growth plate. *Dev Biol*. 2007 Feb 1;302(1):80–91.
189. Iwata T, Chen L, Li C, Ovchinnikov DA, Behringer RR, Francomano CA, et al. A neonatal lethal mutation in FGFR3 uncouples proliferation and differentiation of growth plate chondrocytes in embryos. *Hum Mol Genet*. 2000 Jul 1;9(11):1603–13.
190. Iwata T, Li CL, Deng CX, Francomano CA. Highly activated Fgfr3 with the K644M mutation causes prolonged survival in severe dwarf mice. *Hum Mol Genet*. 2001 Jun 1;10(12):1255–64.
191. Montero A, Okada Y, Tomita M, Ito M, Tsurukami H, Nakamura T, et al. Disruption of the fibroblast growth factor-2 gene results in decreased bone mass and bone formation. *J Clin Invest*. 2000 Apr;105(8):1085–93.
192. Miraoui H, Oudina K, Petite H, Tanimoto Y, Moriyama K, Marie PJ. Fibroblast Growth Factor Receptor 2 Promotes Osteogenic Differentiation in Mesenchymal Cells via ERK1/2 and Protein Kinase C Signaling. *J Biol Chem*. 2009 Feb 20;284(8):4897–904.
193. Park O-J, Kim H-J, Woo K-M, Baek J-H, Ryoo H-M. FGF2-activated ERK Mitogen-activated Protein Kinase Enhances Runx2 Acetylation and Stabilization. *J Biol Chem*. 2010 Feb 5;285(6):3568–74.
194. Yoon W-J, Cho Y-D, Kim W-J, Bae H-S, Islam R, Woo K-M, et al. Prolyl Isomerase Pin1-mediated Conformational Change and Subnuclear Focal Accumulation of Runx2 Are Crucial for Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2)-induced Osteoblast Differentiation. *J Biol Chem*. 2014 Mar 28;289(13):8828–38.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

195. Xiao G, Jiang D, Gopalakrishnan R, Franceschi RT. Fibroblast growth factor 2 induction of the osteocalcin gene requires MAPK activity and phosphorylation of the osteoblast transcription factor, Cbfa1/Runx2. *J Biol Chem*. 2002 Sep 27;277(39):36181–7.
196. Hamidouche Z, Fromigué O, Nuber U, Vaudin P, Pages J-C, Ebert R, et al. Autocrine fibroblast growth factor 18 mediates dexamethasone-induced osteogenic differentiation of murine mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol*. 2010 Aug;224(2):509–15.
197. Kyono A, Avishai N, Ouyang Z, Landreth GE, Murakami S. FGF and ERK signaling coordinately regulate mineralization-related genes and play essential roles in osteocyte differentiation. *J Bone Miner Metab*. 2012 Jan;30(1):19–30.
198. Ikpegbu E, Basta L, Clements DN, Fleming R, Vincent TL, Buttle DJ, et al. FGF-2 promotes osteocyte differentiation through increased E11/podoplanin expression. *J Cell Physiol*. 2018;233(7):5334–47.
199. Liu X-Y, Li X, Bai M-R, Chen X, Wang C-L, Xie J, et al. FGF-7 Dictates Osteocyte Cell Processes Through Beta-Catenin Transduction. *Sci Rep*. 2018 Oct 4;8(1):14792.
200. Kawaguchi H, Pilbeam CC, Gronowicz G, Abreu C, Fletcher BS, Herschman HR, et al. Transcriptional induction of prostaglandin G/H synthase-2 by basic fibroblast growth factor. *J Clin Invest*. 1995 Aug;96(2):923–30.
201. Kawaguchi H, Chikazu D, Nakamura K, Kumegawa M, Hakeda Y. Direct and indirect actions of fibroblast growth factor 2 on osteoclastic bone resorption in cultures. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2000 Mar;15(3):466–73.
202. Chikazu D, Hakeda Y, Ogata N, Nemoto K, Itabashi A, Takato T, et al. Fibroblast growth factor (FGF)-2 directly stimulates mature osteoclast function through activation of FGF receptor 1 and p42/p44 MAP kinase. *J Biol Chem*. 2000 Oct 6;275(40):31444–50.
203. Chikazu D, Katagiri M, Ogasawara T, Ogata N, Shimoaka T, Takato T, et al. Regulation of osteoclast differentiation by fibroblast growth factor 2: stimulation of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand/osteoclast differentiation factor expression in osteoblasts and inhibition of macrophage colony-stimulating factor function in osteoclast precursors. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2001 Nov;16(11):2074–81.
204. Shimoaka T, Ogasawara T, Yonamine A, Chikazu D, Kawano H, Nakamura K, et al. Regulation of osteoblast, chondrocyte, and osteoclast functions by fibroblast growth factor (FGF)-18 in comparison with FGF-2 and FGF-10. *J Biol Chem*. 2002 Mar 1;277(9):7493–500.
205. Bosetti M, Leigheb M, Brooks RA, Boccafroschi F, Cannas MF. Regulation of osteoblast and osteoclast functions by FGF-6. *J Cell Physiol*. 2010;225(2):466–71.
206. Long F, Ornitz DM. Development of the Endochondral Skeleton. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013 Jan 1;5(1):a008334.
207. Schiöth HB, Fredriksson R. The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. *Gen Comp Endocrinol*. 2005 May 15;142(1–2):94–101.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

208. Hermans E. Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther.* 2003 Jul;99(1):25–44.
209. Kobilka BK. G protein coupled receptor structure and activation. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Apr;1768(4):794–807.
210. Lefkowitz RJ. The superfamily of heptahelical receptors. *Nat Cell Biol.* 2000 Jul;2(7):E133–136.
211. McCudden CR, Hains MD, Kimple RJ, Siderovski DP, Willard FS. G-protein signaling: back to the future. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 2005 Mar;62(5):551–77.
212. Milligan G, Rees S. Chimaeric G alpha proteins: their potential use in drug discovery. *Trends Pharmacol Sci.* 1999 Mar;20(3):118–24.
213. Hauser AS, Attwood MM, Rask-Andersen M, Schiöth HB, Gloriam DE. Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. *Nat Rev Drug Discov.* 2017 Dec;16(12):829–42.
214. Santos R, Ursu O, Gaulton A, Bento AP, Donadi RS, Bologa CG, et al. A comprehensive map of molecular drug targets. *Nat Rev Drug Discov.* 2017;16(1):19–34.
215. Teplyuk NM, Galindo M, Teplyuk VI, Pratap J, Young DW, Lapointe D, et al. Runx2 regulates G protein-coupled signaling pathways to control growth of osteoblast progenitors. *J Biol Chem.* 2008 Oct 10;283(41):27585–97.
216. Luo J, Sun P, Siwko S, Liu M, Xiao J. The role of GPCRs in bone diseases and dysfunctions. *Bone Res.* 2019;7:19.
217. Peng J, Bencsik M, Louie A, Lu W, Millard S, Nguyen P, et al. Conditional expression of a Gi-coupled receptor in osteoblasts results in trabecular osteopenia. *Endocrinology.* 2008 Mar;149(3):1329–37.
218. Salles JP, Laurencin-Dalicioux S, Conte-Auriol F, Briand-Mésange F, Gennero I. Bone defects in LPA receptor genetically modified mice. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids.* 2013 Jan 1;1831(1):93–8.
219. Peng Y, Wang S-R, Qiu G-X, Zhang J-G, Zhuang Q-Y. Research progress on the etiology and pathogenesis of adolescent idiopathic scoliosis. *Chin Med J (Engl).* 2020 Feb 20;133(4):483–93.
220. Silva BC, Bilezikian JP. Parathyroid hormone: anabolic and catabolic actions on the skeleton. *Curr Opin Pharmacol.* 2015 Jun;22:41–50.
221. Egbuna OI, Brown EM. Hypercalcaemic and hypocalcaemic conditions due to calcium-sensing receptor mutations. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2008 Mar 1;22(1):129–48.
222. Bilezikian JP, Brandi ML, Eastell R, Silverberg SJ, Udelsman R, Marcocci C, et al. Guidelines for the Management of Asymptomatic Primary Hyperparathyroidism: Summary Statement from the Fourth International Workshop. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014 Oct 1;99(10):3561–9.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

223. Silverberg SJ, Clarke BL, Peacock M, Bandeira F, Boutroy S, Cusano NE, et al. Current Issues in the Presentation of Asymptomatic Primary Hyperparathyroidism: Proceedings of the Fourth International Workshop. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014 Oct 1;99(10):3580–94.
224. Rubin MR, Bilezikian JP, McMahon DJ, Jacobs T, Shane E, Siris E, et al. The Natural History of Primary Hyperparathyroidism with or without Parathyroid Surgery after 15 Years. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 Sep 1;93(9):3462–70.
225. Stein EM, Silva BC, Boutroy S, Zhou B, Wang J, Udesky J, et al. Primary hyperparathyroidism is associated with abnormal cortical and trabecular microstructure and reduced bone stiffness in postmenopausal women. *J Bone Miner Res.* 2013;28(5):1029–40.
226. Hansen S, Jensen J-EB, Rasmussen L, Hauge EM, Brixen K. Effects on bone geometry, density, and microarchitecture in the distal radius but not the tibia in women with primary hyperparathyroidism: A case-control study using HR-pQCT. *J Bone Miner Res.* 2010;25(9):1941–7.
227. Dobnig H, Turner RT. The effects of programmed administration of human parathyroid hormone fragment (1-34) on bone histomorphometry and serum chemistry in rats. *Endocrinology.* 1997 Nov;138(11):4607–12.
228. Sharma S, Mahalingam CD, Das V, Jamal S, Levi E, Rishi AK, et al. Cell Cycle and Apoptosis Regulatory Protein (CARP)-1 is Expressed in Osteoblasts and Regulated by PTH. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 Jul 12;436(4):607–12.
229. Ishizuya T, Yokose S, Hori M, Noda T, Suda T, Yoshiki S, et al. Parathyroid hormone exerts disparate effects on osteoblast differentiation depending on exposure time in rat osteoblastic cells. *J Clin Invest.* 1997 Jun 15;99(12):2961–70.
230. Jilka RL. Molecular and cellular mechanisms of the anabolic effect of intermittent PTH. *Bone.* 2007 Jun 1;40(6):1434–46.
231. Onyia JE, Helvering LM, Gelbert L, Wei T, Huang S, Chen P, et al. Molecular profile of catabolic versus anabolic treatment regimens of parathyroid hormone (PTH) in rat bone: An analysis by DNA microarray. *J Cell Biochem.* 2005;95(2):403–18.
232. Guo J, Liu M, Yang D, Buxsein ML, Thomas CC, Schipani E, et al. Phospholipase C signaling via the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor is essential for normal bone responses to PTH. *Endocrinology.* 2010 Aug;151(8):3502–13.
233. Yu B, Zhao X, Yang C, Crane J, Xian L, Lu W, et al. Parathyroid hormone induces differentiation of mesenchymal stromal/stem cells by enhancing bone morphogenetic protein signaling. *J Bone Miner Res.* 2012;27(9):2001–14.
234. Keller H, Kneissel M. SOST is a target gene for PTH in bone. *Bone.* 2005 Aug 1;37(2):148–58.
235. Bellido T, Ali AA, Gubrij I, Plotkin LI, Fu Q, O'Brien CA, et al. Chronic Elevation of Parathyroid Hormone in Mice Reduces Expression of Sclerostin by Osteocytes: A Novel Mechanism for Hormonal Control of Osteoblastogenesis. *Endocrinology.* 2005 Nov 1;146(11):4577–83.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

236. Wein MN, Liang Y, Goransson O, Sundberg TB, Wang J, Williams EA, et al. SIKs control osteocyte responses to parathyroid hormone. *Nat Commun.* 2016 19;7:13176.
237. Wein MN, Spatz J, Nishimori S, Doench J, Root D, Babij P, et al. HDAC5 Controls MEF2C-Driven Sclerostin Expression in Osteocytes. *J Bone Miner Res.* 2015;30(3):400–11.
238. Koide M, Kobayashi Y. Regulatory mechanisms of sclerostin expression during bone remodeling. *J Bone Miner Metab.* 2019 Jan 1;37(1):9–17.
239. Baertschi S, Baur N, Lueders-Lefevre V, Voshol J, Keller H. Class I and IIa Histone Deacetylases Have Opposite Effects on Sclerostin Gene Regulation. *J Biol Chem.* 2014 May 9;289(36):24995–5009.
240. Kulkarni NH, Halladay DL, Miles RR, Gilbert LM, Frolik CA, Galvin RJS, et al. Effects of parathyroid hormone on Wnt signaling pathway in bone. *J Cell Biochem.* 2005;95(6):1178–90.
241. Ma YL, Cain RL, Halladay DL, Yang X, Zeng Q, Miles RR, et al. Catabolic effects of continuous human PTH (1--38) in vivo is associated with sustained stimulation of RANKL and inhibition of osteoprotegerin and gene-associated bone formation. *Endocrinology.* 2001 Sep;142(9):4047–54.
242. Huang JC, Sakata T, Pflieger LL, Bencsik M, Halloran BP, Bikle DD, et al. PTH differentially regulates expression of RANKL and OPG. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* 2004 Feb;19(2):235–44.
243. Lee SK, Lorenzo JA. Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acid expression in murine bone marrow cultures: correlation with osteoclast-like cell formation. *Endocrinology.* 1999 Aug;140(8):3552–61.
244. Lee S-K, Lorenzo JA. Regulation of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin mRNA expression by parathyroid hormone is predominantly mediated by the protein kinase α pathway in murine bone marrow cultures. *Bone.* 2002 Jul 1;31(1):252–9.
245. Kondo H, Guo J, Bringhurst FR. Cyclic Adenosine Monophosphate/Protein Kinase A Mediates Parathyroid Hormone/Parathyroid Hormone-Related Protein Receptor Regulation of Osteoclastogenesis and Expression of RANKL and Osteoprotegerin mRNAs by Marrow Stromal Cells. *J Bone Miner Res.* 2002;17(9):1667–79.
246. Saini V, Marengi DA, Barry KJ, Fulzele KS, Heiden E, Liu X, et al. Parathyroid Hormone (PTH)/PTH-related Peptide Type 1 Receptor (PPR) Signaling in Osteocytes Regulates Anabolic and Catabolic Skeletal Responses to PTH. *J Biol Chem.* 2013 Dec 7;288(28):20122–34.
247. Bellido T, Saini V, Pajevic PD. Effects of PTH on osteocyte function. *Bone.* 2013 Jun 1;54(2):250–7.
248. Rhee Y, Allen MR, Condon K, Lezcano V, Ronda AC, Galli C, et al. PTH receptor signaling in osteocytes governs periosteal bone formation and intracortical remodeling. *J Bone Miner Res.* 2011;26(5):1035–46.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

249. O'Brien CA, Plotkin LI, Galli C, Goellner JJ, Gortazar AR, Allen MR, et al. Control of Bone Mass and Remodeling by PTH Receptor Signaling in Osteocytes. *PLOS ONE*. 2008 Aug 13;3(8):e2942.
250. Xiong J, Piemontese M, Thostenson JD, Weinstein RS, Manolagas SC, O'Brien CA. Osteocyte-derived RANKL is a critical mediator of the increased bone resorption caused by dietary calcium deficiency. *Bone*. 2014 Sep 1;66:146–54.
251. Weinstein LS. G(s)alpha mutations in fibrous dysplasia and McCune-Albright syndrome. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2006 Dec;21 Suppl 2:P120-124.
252. Erspamer V, Asero B. Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine. *Nature*. 1952 May 10;169(4306):800–1.
253. Yadav VK, Oury F, Suda N, Liu Z-W, Gao X-B, Confavreux C, et al. A serotonin-dependent mechanism explains the leptin regulation of bone mass, appetite, and energy expenditure. *Cell*. 2009 Sep 4;138(5):976–89.
254. Oury F, Yadav VK, Wang Y, Zhou B, Liu XS, Guo XE, et al. CREB mediates brain serotonin regulation of bone mass through its expression in ventromedial hypothalamic neurons. *Genes Dev*. 2010 Oct 15;24(20):2330–42.
255. Motyl KJ, Rosen CJ. Understanding leptin-dependent regulation of skeletal homeostasis. *Biochimie*. 2012 Oct;94(10):2089–96.
256. Dimitri P, Rosen C. The Central Nervous System and Bone Metabolism: An Evolving Story. *Calcif Tissue Int*. 2017;100(5):476–85.
257. de Vernejoul M-C, Collet C, Chabbi-Achengli Y. Serotonin: good or bad for bone. *BoneKEy Rep*. 2012;1:120.
258. Kode A, Mosialou I, Silva BC, Rached M-T, Zhou B, Wang J, et al. FOXO1 orchestrates the bone-suppressing function of gut-derived serotonin. *J Clin Invest*. 2012 Oct;122(10):3490–503.
259. Blizotes M. Update in Serotonin and Bone. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010 Sep;95(9):4124–32.
260. Yadav VK, Balaji S, Suresh PS, Liu XS, Lu X, Li Z, et al. Pharmacological inhibition of gut-derived serotonin synthesis is a potential bone anabolic treatment for osteoporosis. *Nat Med*. 2010 Mar;16(3):308–12.
261. Pawlak D, Domaniewski T, Sieklucka B, Jakuc M, Pawlak K. Inhibition of peripheral serotonin synthesis by LP533401 and disturbances in calciotropic hormones attenuated excessive osteoblastogenesis with simultaneous improvement of bone mineral status in 5/6 nephrectomized rats. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2019 Nov 1;1865(11):165528.
262. Camiña JP. Cell Biology of the Ghrelin Receptor. *J Neuroendocrinol*. 2006;18(1):65–76.
263. Kim SW, Choi OK, Jung JY, Yang J-Y, Cho SW, Shin CS, et al. Ghrelin inhibits early osteogenic differentiation of C3H10T1/2 cells by suppressing Runx2 expression and enhancing PPAR γ and C/EBP α expression. *J Cell Biochem*. 2009;106(4):626–32.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

264. Caminos JE, Gualillo O, Lago F, Otero M, Blanco M, Gallego R, et al. The endogenous growth hormone secretagogue (ghrelin) is synthesized and secreted by chondrocytes. *Endocrinology*. 2005 Mar;146(3):1285–92.
265. Gómez R, Lago F, Gómez-Reino JJ, Dieguez C, Gualillo O. Expression and modulation of ghrelin O-acyltransferase in cultured chondrocytes. *Arthritis Rheum*. 2009;60(6):1704–9.
266. Delhanty PJD, van der Eerden BCJ, van Leeuwen JPTM. Ghrelin and bone. *BioFactors Oxf Engl*. 2014 Feb;40(1):41–8.
267. Fukushima N, Hanada R, Teranishi H, Fukue Y, Tachibana T, Ishikawa H, et al. Ghrelin directly regulates bone formation. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2005 May;20(5):790–8.
268. Deng F, Ling J, Ma J, Liu C, Zhang W. Stimulation of intramembranous bone repair in rats by ghrelin. *Exp Physiol*. 2008;93(7):872–9.
269. Kim SW, Her SJ, Park SJ, Kim D, Park KS, Lee HK, et al. Ghrelin stimulates proliferation and differentiation and inhibits apoptosis in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Bone*. 2005 Sep;37(3):359–69.
270. Delhanty PJD, van der Eerden BCJ, van der Velde M, Gauna C, Pols H a. P, Jahr H, et al. Ghrelin and unacylated ghrelin stimulate human osteoblast growth via mitogen-activated protein kinase (MAPK)/phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathways in the absence of GHS-R1a. *J Endocrinol*. 2006 Jan;188(1):37–47.
271. Wang D-H, Hu Y-S, Du J-J, Hu Y-Y, Zhong W-D, Qin W-J. Ghrelin stimulates proliferation of human osteoblastic TE85 cells via NO/cGMP signaling pathway. *Endocrine*. 2009 Feb 1;35(1):112–7.
272. Costa JL, Naot D, Lin J-M, Watson M, Callon KE, Reid IR, et al. Ghrelin is an Osteoblast Mitogen and Increases Osteoclastic Bone Resorption In Vitro. *Int J Pept*. 2011;2011:605193.
273. van der Velde M, van der Eerden BCJ, Sun Y, Almering JMM, van der Lely A-J, Delhanty PJD, et al. An age-dependent interaction with leptin unmasks ghrelin's bone-protective effects. *Endocrinology*. 2012 Aug;153(8):3593–602.
274. Li T, Jiang S, Lu C, Yang W, Yang Z, Hu W, et al. Melatonin: Another avenue for treating osteoporosis? *J Pineal Res*. 2019 Mar;66(2):e12548.
275. Macchi MM, Bruce JN. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Front Neuroendocrinol*. 2004 Dec;25(3–4):177–95.
276. Sharan K, Lewis K, Furukawa T, Yadav VK. Regulation of bone mass through pineal-derived melatonin-MT2 receptor pathway. *J Pineal Res*. 2017 Sep;63(2).
277. Wang B, Wen H, Smith W, Hao D, He B, Kong L. Regulation effects of melatonin on bone marrow mesenchymal stem cell differentiation. *J Cell Physiol*. 2019;234(2):1008–15.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

278. Gao W, Lin M, Liang A, Zhang L, Chen C, Liang G, et al. Melatonin enhances chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Pineal Res.* 2014 Jan;56(1):62–70.
279. Dong P, Gu X, Zhu G, Li M, Ma B, Zi Y. Melatonin Induces Osteoblastic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells and Promotes Fracture Healing in a Rat Model of Femoral Fracture via Neuropeptide Y/Neuropeptide Y Receptor Y1 Signaling. *Pharmacology.* 2018;102(5–6):272–80.
280. Rafat A, Mohammadi Roushandeh A, Alizadeh A, Hashemi-Firouzi N, Golipoor Z. Comparison of The Melatonin Preconditioning Efficacy between Bone Marrow and Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Cell J Yakhteh.* 2019;20(4):450–8.
281. Zaminy A, Ragerdi Kashani I, Barbarestani M, Hedayatpour A, Mahmoudi R, Farzaneh Nejad A. Osteogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells: melatonin as a differentiation factor. *Iran Biomed J.* 2008;12(3):133–41.
282. Maria S, Samsonraj RM, Munmun F, Glas J, Silvestros M, Kotlarczyk MP, et al. Biological effects of melatonin on osteoblast/osteoclast cocultures, bone, and quality of life: Implications of a role for MT2 melatonin receptors, MEK1/2, and MEK5 in melatonin-mediated osteoblastogenesis. *J Pineal Res.* 2018 Apr;64(3).
283. Han Y, Kim Y-M, Kim HS, Lee KY. Melatonin promotes osteoblast differentiation by regulating Osterix protein stability and expression. *Sci Rep.* 2017 18;7(1):5716.
284. Zhu G, Ma B, Dong P, Shang J, Gu X, Zi Y. Melatonin promotes osteoblastic differentiation and regulates PDGF/AKT signaling pathway. *Cell Biol Int.* 2020;44(2):402–11.
285. Reppert SM, Weaver DR. Melatonin madness. *Cell.* 1995 Dec 29;83(7):1059–62.
286. Godson C, Reppert SM. The Mel1a melatonin receptor is coupled to parallel signal transduction pathways. *Endocrinology.* 1997 Jan;138(1):397–404.
287. Moreau A, Wang DS, Forget S, Azeddine B, Angeloni D, Fraschini F, et al. Melatonin signaling dysfunction in adolescent idiopathic scoliosis. *Spine.* 2004 Aug 15;29(16):1772–81.
288. Kim HJ, Kim HJ, Bae M-K, Kim Y-D. Suppression of Osteoclastogenesis by Melatonin: A Melatonin Receptor-Independent Action. *Int J Mol Sci.* 2017 May 26;18(6).
289. Koyama H, Nakade O, Takada Y, Kaku T, Lau KHW. Melatonin at pharmacologic doses increases bone mass by suppressing resorption through down-regulation of the RANKL-mediated osteoclast formation and activation. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* 2002 Jul;17(7):1219–29.
290. Cardinali DP, Ladizesky MG, Boggio V, Cutrera RA, Mautalen C. Melatonin effects on bone: experimental facts and clinical perspectives. *J Pineal Res.* 2003;34(2):81–7.
291. Lian C, Wu Z, Gao B, Peng Y, Liang A, Xu C, et al. Melatonin reversed tumor necrosis factor- α -inhibited osteogenesis of human mesenchymal stem cells by stabilizing SMAD1 protein. *J Pineal Res.* 2016;61(3):317–27.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

292. St Hilaire MA, Rahman SA, Gooley JJ, Witt-Enderby PA, Lockley SW. Relationship between melatonin and bone resorption rhythms in premenopausal women. *J Bone Miner Metab.* 2019 Jan;37(1):60–71.
293. Amstrup AK, Sikjaer T, Heickendorff L, Mosekilde L, Rejnmark L. Melatonin improves bone mineral density at the femoral neck in postmenopausal women with osteopenia: a randomized controlled trial. *J Pineal Res.* 2015 Sep;59(2):221–9.
294. Choi JW, Herr DR, Noguchi K, Yung YC, Lee C-W, Mutoh T, et al. LPA receptors: subtypes and biological actions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2010;50:157–86.
295. Vogt W. Pharmacologically active acidic phospholipids and glycolipids. *Biochem Pharmacol.* 1963 Apr;12:415–20.
296. Gaits F, Fourcade O, Le Balle F, Gueguen G, Gaigé B, Gassama-Diagne A, et al. Lysophosphatidic acid as a phospholipid mediator: pathways of synthesis. *FEBS Lett.* 1997 Jun 23;410(1):54–8.
297. Moolenaar WH. LPA: a novel lipid mediator with diverse biological actions. *Trends Cell Biol.* 1994 Jun 1;4(6):213–9.
298. Moolenaar WH. Lysophosphatidic acid, a multifunctional phospholipid messenger. *J Biol Chem.* 1995 Jun 2;270(22):12949–52.
299. Pagès C, Simon MF, Valet P, Saulnier-Blache JS. Lysophosphatidic acid synthesis and release. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2001 Apr;64(1–4):1–10.
300. Eichholtz T, Jalink K, Fahrenfort I, Moolenaar WH. The bioactive phospholipid lysophosphatidic acid is released from activated platelets. *Biochem J.* 1993 May 1;291(Pt 3):677–80.
301. Boucharaba A, Serre C-M, Grès S, Saulnier-Blache JS, Bordet J-C, Guglielmi J, et al. Platelet-derived lysophosphatidic acid supports the progression of osteolytic bone metastases in breast cancer. *J Clin Invest.* 2004 Dec;114(12):1714–25.
302. Aoki J, Taira A, Takanezawa Y, Kishi Y, Hama K, Kishimoto T, et al. Serum lysophosphatidic acid is produced through diverse phospholipase pathways. *J Biol Chem.* 2002 Dec 13;277(50):48737–44.
303. Panupinthu N, Rogers JT, Zhao L, Solano-Flores LP, Possmayer F, Sims SM, et al. P2X7 receptors on osteoblasts couple to production of lysophosphatidic acid: a signaling axis promoting osteogenesis. *J Cell Biol.* 2008 Jun 2;181(5):859–71.
304. Chun J, Hla T, Lynch KR, Spiegel S, Moolenaar WH. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVIII. Lysophospholipid Receptor Nomenclature. *Pharmacol Rev.* 2010 Dec;62(4):579–87.
305. Liliom K, Guan Z, Tseng JL, Desiderio DM, Tigyi G, Watsky MA. Growth factor-like phospholipids generated after corneal injury. *Am J Physiol.* 1998;274(4):C1065-1074.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

306. Song HY, Lee MJ, Kim MY, Kim KH, Lee IH, Shin SH, et al. Lysophosphatidic acid mediates migration of human mesenchymal stem cells stimulated by synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Jan;1801(1):23–30.
307. Yung YC, Stoddard NC, Chun J. LPA receptor signaling: pharmacology, physiology, and pathophysiology. *J Lipid Res*. 2014 Jul;55(7):1192–214.
308. Savaskan NE, Rocha L, Kotter MR, Baer A, Lubec G, van Meeteren LA, et al. Autotaxin (NPP-2) in the brain: cell type-specific expression and regulation during development and after neurotrauma. *Cell Mol Life Sci*. 2007 Jan 1;64(2):230–43.
309. Bächner D, Ahrens M, Betat N, Schröder D, Gross G. Developmental expression analysis of murine autotaxin (ATX). *Mech Dev*. 1999 Jun;84(1–2):121–5.
310. van Meeteren LA, Ruurs P, Stortelers C, Bouwman P, van Rooijen MA, Pradère JP, et al. Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, is essential for blood vessel formation during development. *Mol Cell Biol*. 2006 Jul;26(13):5015–22.
311. Hama K, Aoki J, Bandoh K, Inoue A, Endo T, Amano T, et al. Lysophosphatidic receptor, LPA3, is positively and negatively regulated by progesterone and estrogen in the mouse uterus. *Life Sci*. 2006 Sep 27;79(18):1736–40.
312. Fourcade O, Simon M-F, Viodé C, Rugani N, Leballe F, Ragab A, et al. Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells. *Cell*. 1995 Mar 24;80(6):919–27.
313. McIntyre TM, Pontsler AV, Silva AR, St Hilaire A, Xu Y, Hinshaw JC, et al. Identification of an intracellular receptor for lysophosphatidic acid (LPA): LPA is a transcellular PPARgamma agonist. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jan 7;100(1):131–6.
314. Simic P, Kim W, Zhou W, Pierce KA, Chang W, Sykes DB, et al. Glycerol-3-phosphate is an FGF23 regulator derived from the injured kidney. *J Clin Invest*. 2020 Mar 2;130(3):1513–26.
315. Mauco G, Chap H, Simon MF, Douste-Blazy L. Phosphatidic and lysophosphatidic acid production in phospholipase C-and thrombin-treated platelets. Possible involvement of a platelet lipase. *Biochimie*. 1978 Sep 29;60(6–7):653–61.
316. Brindley DN, English D, Pilquil C, Buri K, Ling Z-C. Lipid phosphate phosphatases regulate signal transduction through glycerolipids and sphingolipids. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids*. 2002 May 23;1582(1):33–44.
317. Simon MF, Rey A, Castan-Laurel I, Grés S, Sibrac D, Valet P, et al. Expression of ecto-lipid phosphate phosphohydrolases in 3T3F442A preadipocytes and adipocytes. Involvement in the control of lysophosphatidic acid production. *J Biol Chem*. 2002 Jun;277(26):23131–6.
318. Lee JH, Kim D, Oh YS, Jun H-S. Lysophosphatidic Acid Signaling in Diabetic Nephropathy. *Int J Mol Sci*. 2019 Jun 11;20(11).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

319. Leblanc R, Houssin A, Peyruchaud O. Platelets, autotaxin and lysophosphatidic acid signalling: win-win factors for cancer metastasis. *Br J Pharmacol*. 2018;175(15):3100–10.
320. Xiang H, Lu Y, Shao M, Wu T. Lysophosphatidic Acid Receptors: Biochemical and Clinical Implications in Different Diseases. *J Cancer*. 2020;11(12):3519–35.
321. Hecht JH, Weiner JA, Post SR, Chun J. Ventricular zone gene-1 (vzg-1) encodes a lysophosphatidic acid receptor expressed in neurogenic regions of the developing cerebral cortex. *J Cell Biol*. 1996 Nov;135(4):1071–83.
322. Contos JJ, Ishii I, Chun J. Lysophosphatidic acid receptors. *Mol Pharmacol*. 2000 Dec;58(6):1188–96.
323. Ohuchi H, Hamada A, Matsuda H, Takagi A, Tanaka M, Aoki J, et al. Expression patterns of the lysophospholipid receptor genes during mouse early development. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat*. 2008 Nov;237(11):3280–94.
324. Contos JJ, Fukushima N, Weiner JA, Kaushal D, Chun J. Requirement for the lpA1 lysophosphatidic acid receptor gene in normal suckling behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Nov 21;97(24):13384–9.
325. Inoue M, Rashid MH, Fujita R, Contos JJA, Chun J, Ueda H. Initiation of neuropathic pain requires lysophosphatidic acid receptor signaling. *Nat Med*. 2004 Jul;10(7):712–8.
326. Contos JJ, Chun J. Complete cDNA sequence, genomic structure, and chromosomal localization of the LPA receptor gene, lpA1/vzg-1/Gpcr26. *Genomics*. 1998 Aug 1;51(3):364–78.
327. An S, Dickens MA, Bleu T, Hallmark OG, Goetzl EJ. Molecular cloning of the human Edg2 protein and its identification as a functional cellular receptor for lysophosphatidic acid. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997 Feb 24;231(3):619–22.
328. Contos JJA, Ishii I, Fukushima N, Kingsbury MA, Ye X, Kawamura S, et al. Characterization of lpA(2) (Edg4) and lpA(1)/lpA(2) (Edg2/Edg4) lysophosphatidic acid receptor knockout mice: signaling deficits without obvious phenotypic abnormality attributable to lpA(2). *Mol Cell Biol*. 2002 Oct;22(19):6921–9.
329. Im DS, Heise CE, Harding MA, George SR, O'Dowd BF, Theodorescu D, et al. Molecular cloning and characterization of a lysophosphatidic acid receptor, Edg-7, expressed in prostate. *Mol Pharmacol*. 2000 Apr;57(4):753–9.
330. Ye X, Hama K, Contos JJA, Anliker B, Inoue A, Skinner MK, et al. LPA3-mediated lysophosphatidic acid signalling in implantation and embryo spacing. *Nature*. 2005 May 5;435(7038):104–8.
331. Ishii S, Noguchi K, Yanagida K. Non-Edg family lysophosphatidic acid (LPA) receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2009 Sep;89(3–4):57–65.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

332. Lee C-W, Rivera R, Dubin AE, Chun J. LPA(4)/GPR23 is a lysophosphatidic acid (LPA) receptor utilizing G(s)-, G(q)/G(i)-mediated calcium signaling and G(12/13)-mediated Rho activation. *J Biol Chem.* 2007 Feb 16;282(7):4310–7.
333. Lee Z, Cheng C-T, Zhang H, Subler MA, Wu J, Mukherjee A, et al. Role of LPA4/p2y9/GPR23 in negative regulation of cell motility. *Mol Biol Cell.* 2008 Dec;19(12):5435–45.
334. Yasuda D, Kobayashi D, Akahoshi N, Ohto-Nakanishi T, Yoshioka K, Takuwa Y, et al. Lysophosphatidic acid-induced YAP/TAZ activation promotes developmental angiogenesis by repressing Notch ligand Dll4. *J Clin Invest.* 129(10):4332–49.
335. Liu Y, Ren M, Tan X, Hu L. Distinct Changes in the Expression TAZ are Associated with Normal Cervix and Human Cervical Cancer. *J Cancer.* 2018 Oct 20;9(22):4263–70.
336. Dong L, Lin F, Wu W, Huang W, Cai Z. Transcriptional cofactor Mask2 is required for YAP-induced cell growth and migration in bladder cancer cell. *J Cancer.* 2016 Oct 23;7(14):2132–8.
337. He L, Wu M-Z, Wang X-B, Qiu X-S, Wang E-H, Wu G-P. Tumor Suppressor LKB1 inhibits both the mRNA Expression and the Amplification of hTERC by the Phosphorylation of YAP in Lung Cancer Cells. *J Cancer.* 2019 Jun 9;10(16):3632–8.
338. Sumida H, Noguchi K, Kihara Y, Abe M, Yanagida K, Hamano F, et al. LPA4 regulates blood and lymphatic vessel formation during mouse embryogenesis. *Blood.* 2010 Dec 2;116(23):5060–70.
339. Mansell JP, Barbour M, Moore C, Nowghani M, Pabbruwe M, Sjoström T, et al. The synergistic effects of lysophosphatidic acid receptor agonists and calcitriol on MG63 osteoblast maturation at titanium and hydroxyapatite surfaces. *Biomaterials.* 2010 Jan;31(2):199–206.
340. Lee C-W, Rivera R, Gardell S, Dubin AE, Chun J. GPR92 as a new G12/13- and Gq-coupled lysophosphatidic acid receptor that increases cAMP, LPA5. *J Biol Chem.* 2006 Aug 18;281(33):23589–97.
341. Lundequist A, Boyce JA. LPA5 is abundantly expressed by human mast cells and important for lysophosphatidic acid induced MIP-1 β release. *PloS One.* 2011 Mar 28;6(3):e18192.
342. Lin S, Yeruva S, He P, Singh AK, Zhang H, Chen M, et al. Lysophosphatidic acid stimulates the intestinal brush border Na(+)/H(+) exchanger 3 and fluid absorption via LPA(5) and NHERF2. *Gastroenterology.* 2010 Feb;138(2):649–58.
343. Webb TE, Kaplan MG, Barnard EA. Identification of 6H1 as a P2Y purinoceptor: P2Y5. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996 Feb 6;219(1):105–10.
344. Yanagida K, Masago K, Nakanishi H, Kihara Y, Hamano F, Tajima Y, et al. Identification and characterization of a novel lysophosphatidic acid receptor, p2y5/LPA6. *J Biol Chem.* 2009 Jun 26;284(26):17731–41.
345. Kihara Y, Maceyka M, Spiegel S, Chun J. Lysophospholipid receptor nomenclature review: IUPHAR Review 8. *Br J Pharmacol.* 2014 Aug;171(15):3575–94.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

346. Lee M, Choi S, Halldén G, Yo SJ, Schichnes D, Aponte GW. P2Y5 is a G α _i, G α _{12/13} G protein-coupled receptor activated by lysophosphatidic acid that reduces intestinal cell adhesion. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol*. 2009 Oct;297(4):G641–54.
347. Takara K, Eino D, Ando K, Yasuda D, Naito H, Tsukada Y, et al. Lysophosphatidic Acid Receptor 4 Activation Augments Drug Delivery in Tumors by Tightening Endothelial Cell-Cell Contact. *Cell Rep*. 2017 Aug 29;20(9):2072–86.
348. Pasternack SM, von Kügelgen I, Al Aboud K, Lee Y-A, Rüschemann F, Voss K, et al. G protein-coupled receptor P2Y5 and its ligand LPA are involved in maintenance of human hair growth. *Nat Genet*. 2008 Mar;40(3):329–34.
349. Murakami M, Shiraishi A, Tabata K, Fujita N. Identification of the orphan GPCR, P2Y(10) receptor as the sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Jul 11;371(4):707–12.
350. Tabata K, Baba K, Shiraishi A, Ito M, Fujita N. The orphan GPCR GPR87 was deorphanized and shown to be a lysophosphatidic acid receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Nov 23;363(3):861–6.
351. O'Dowd BF, Nguyen T, Marchese A, Cheng R, Lynch KR, Heng HH, et al. Discovery of three novel G-protein-coupled receptor genes. *Genomics*. 1998 Jan 15;47(2):310–3.
352. Xu Y. Targeting Lysophosphatidic Acid in Cancer: The Issues in Moving from Bench to Bedside. *Cancers*. 2019 Oct 10;11(10).
353. Mackenzie AE, Lappin JE, Taylor DL, Nicklin SA, Milligan G. GPR35 as a Novel Therapeutic Target. *Front Endocrinol*. 2011;2:68.
354. Oka S, Ota R, Shima M, Yamashita A, Sugiura T. GPR35 is a novel lysophosphatidic acid receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Apr 30;395(2):232–7.
355. Evseenko D, Latour B, Richardson W, Corselli M, Sahaghian A, Cardinal S, et al. Lysophosphatidic acid mediates myeloid differentiation within the human bone marrow microenvironment. *PloS One*. 2013;8(5):e63718.
356. Valet P, Pagès C, Jeanneton O, Daviaud D, Barbe P, Record M, et al. Alpha2-adrenergic receptor-mediated release of lysophosphatidic acid by adipocytes. A paracrine signal for preadipocyte growth. *J Clin Invest*. 1998 Apr 1;101(7):1431–8.
357. Koolpe M, Rodrigo JJ, Benton HP. Adenosine 5'-triphosphate, uridine 5'-triphosphate, bradykinin, and lysophosphatidic acid induce different patterns of calcium responses by human articular chondrocytes. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc*. 1998 Mar;16(2):217–26.
358. Kim M-K, Lee H-Y, Park KS, Shin EH, Jo SH, Yun J, et al. Lysophosphatidic acid stimulates cell proliferation in rat chondrocytes. *Biochem Pharmacol*. 2005 Dec 5;70(12):1764–71.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

359. Wu L, Petrigliano FA, Ba K, Lee S, Bogdanov J, McAllister DR, et al. Lysophosphatidic Acid Mediates Fibrosis In Injured Joints By Regulating Collagen Type I Biosynthesis. *Osteoarthr Cartil OARS Osteoarthr Res Soc*. 2015 Feb;23(2):308–18.
360. Boyan BD, Hurst-Kennedy J, Denison TA, Schwartz Z. 24R,25-dihydroxyvitamin D3 [24R,25(OH)2D3] controls growth plate development by inhibiting apoptosis in the reserve zone and stimulating response to 1 α ,25(OH)2D3 in hypertrophic cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010 Jul;121(1–2):212–6.
361. Mototani H, Iida A, Nakajima M, Furuichi T, Miyamoto Y, Tsunoda T, et al. A functional SNP in EDG2 increases susceptibility to knee osteoarthritis in Japanese. *Hum Mol Genet*. 2008 Jun 15;17(12):1790–7.
362. Nishioka T, Arima N, Kano K, Hama K, Itai E, Yukiura H, et al. ATX-LPA 1 axis contributes to proliferation of chondrocytes by regulating fibronectin assembly leading to proper cartilage formation. *Sci Rep*. 2016 Mar 23;6(1):1–15.
363. David M, Wannecq E, Descotes F, Jansen S, Deux B, Ribeiro J, et al. Cancer Cell Expression of Autotaxin Controls Bone Metastasis Formation in Mouse through Lysophosphatidic Acid-Dependent Activation of Osteoclasts. *PLOS ONE*. 2010 Mar 17;5(3):e9741.
364. Lapierre DM, Tanabe N, Pereverzev A, Spencer M, Shugg RPP, Dixon SJ, et al. Lysophosphatidic Acid Signals through Multiple Receptors in Osteoclasts to Elevate Cytosolic Calcium Concentration, Evoke Retraction, and Promote Cell Survival. *J Biol Chem*. 2010 Aug 13;285(33):25792–801.
365. Kanis JA, Burlet N, Cooper C, Delmas PD, Reginster J-Y, Borgstrom F, et al. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporos Int*. 2008 Apr;19(4):399–428.
366. Noguchi K, Herr D, Mutoh T, Chun J. Lysophosphatidic acid (LPA) and its receptors. *Curr Opin Pharmacol*. 2009 Feb;9(1):15–23.
367. David M, Machuca-Gayet I, Kikuta J, Ottewell P, Mima F, Leblanc R, et al. Lysophosphatidic Acid Receptor Type 1 (LPA1) Plays a Functional Role in Osteoclast Differentiation and Bone Resorption Activity. *J Biol Chem*. 2014 Mar 7;289(10):6551–64.
368. Boucharaba A, Serre C-M, Guglielmi J, Bordet J-C, Clézardin P, Peyruchaud O. The type 1 lysophosphatidic acid receptor is a target for therapy in bone metastases. *Proc Natl Acad Sci*. 2006 Jun 20;103(25):9643–8.
369. Grey A, Banovic T, Naot D, Hill B, Callon K, Reid I, et al. Lysophosphatidic acid is an osteoblast mitogen whose proliferative actions involve G(i) proteins and protein kinase C, but not P42/44 mitogen-activated protein kinases. *Endocrinology*. 2001 Mar;142(3):1098–106.
370. Grey A, Chen Q, Callon K, Xu X, Reid IR, Cornish J. The Phospholipids Sphingosine-1-Phosphate and Lysophosphatidic Acid Prevent Apoptosis in Osteoblastic Cells via a Signaling Pathway Involving Gi Proteins and Phosphatidylinositol-3 Kinase. *Endocrinology*. 2002 Dec 1;143(12):4755–63.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

371. Masiello LM, Fotos JS, Galileo DS, Karin NJ. Lysophosphatidic acid induces chemotaxis in MC3T3-E1 osteoblastic cells. *Bone*. 2006 Jul 1;39(1):72–82.
372. Panupinthu N, Zhao L, Possmayer F, Ke HZ, Sims SM, Dixon SJ. P2X7 nucleotide receptors mediate blebbing in osteoblasts through a pathway involving lysophosphatidic acid. *J Biol Chem*. 2007 Feb 2;282(5):3403–12.
373. Caverzasio J, Palmer G, Suzuki A, Bonjour JP. Evidence for the involvement of two pathways in activation of extracellular signal-regulated kinase (Erk) and cell proliferation by Gi and Gq protein-coupled receptors in osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2000 Sep;15(9):1697–706.
374. Ahmed I, Gesty-Palmer D, Drezner MK, Luttrell LM. Transactivation of the epidermal growth factor receptor mediates parathyroid hormone and prostaglandin F2 alpha-stimulated mitogen-activated protein kinase activation in cultured transgenic murine osteoblasts. *Mol Endocrinol Baltim Md*. 2003 Aug;17(8):1607–21.
375. Dusaulcy R, Rancoule C, Grès S, Wanecq E, Colom A, Guigné C, et al. Adipose-specific disruption of autotaxin enhances nutritional fattening and reduces plasma lysophosphatidic acid. *J Lipid Res*. 2011 Jun;52(6):1247–55.
376. Gennero I, Laurencin-Dalacieu S, Conte-Auriol F, Briand-Mésange F, Laurencin D, Rue J, et al. Absence of the lysophosphatidic acid receptor LPA1 results in abnormal bone development and decreased bone mass. *Bone*. 2011 Sep;49(3):395–403.
377. Simon MF, Daviaud D, Pradère JP, Grès S, Guigné C, Wabitsch M, et al. Lysophosphatidic acid inhibits adipocyte differentiation via lysophosphatidic acid 1 receptor-dependent down-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma2. *J Biol Chem*. 2005 Apr 15;280(15):14656–62.
378. Rancoule C, Dusaulcy R, Tréguer K, Grès S, Attané C, Saulnier-Blache JS. Involvement of autotaxin/lysophosphatidic acid signaling in obesity and impaired glucose homeostasis. *Biochimie*. 2014 Jan;96:140–3.
379. Xie Y, Wang X, Wu X, Tian L, Zhou J, Li X, et al. Lysophosphatidic acid receptor 4 regulates osteogenic and adipogenic differentiation of progenitor cells via inactivation of RhoA/ROCK1/ β -catenin signaling. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2020;38(3):451–63.
380. Karagiosis SA, Karin NJ. Lysophosphatidic acid induces osteocyte dendrite outgrowth. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 May 25;357(1):194–9.
381. Waters KM, Jacobs JM, Gritsenko MA, Karin NJ. Regulation of gene expression and subcellular protein distribution in MLO-Y4 osteocytic cells by lysophosphatidic acid: Relevance to dendrite outgrowth. *Bone*. 2011 Jun 1;48(6):1328–35.
382. Alioli CA, Demesmay L, Laurencin-Dalacieu S, Beton N, Farlay D, Follet H, et al. Expression of the type 1 lysophosphatidic acid receptor in osteoblastic cell lineage controls both bone mineralization and osteocyte specification. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2020 Apr 21;158715.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

383. Gidley J, Openshaw S, Pring ET, Sale S, Mansell JP. Lysophosphatidic acid cooperates with 1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ in stimulating human MG63 osteoblast maturation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2006 Jul;80(1–2):46–61.
384. Liu Y-B, Kharode Y, Bodine PVN, Yaworsky PJ, Robinson JA, Billiard J. LPA induces osteoblast differentiation through interplay of two receptors: LPA1 and LPA4. *J Cell Biochem.* 2010 Mar 1;109(4):794–800.
385. Mansell JP, Nowghani M, Pabbruwe M, Paterson IC, Smith AJ, Blom AW. Lysophosphatidic acid and calcitriol co-operate to promote human osteoblastogenesis: requirement of albumin-bound LPA. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2011 Aug;95(1–4):45–52.
386. Dziak R, Yang BM, Leung BW, Li S, Marzec N, Margarone J, et al. Effects of sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid on human osteoblastic cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2003 Mar;68(3):239–49.
387. Murali SK, Andrukhova O, Clinkenbeard EL, White KE, Erben RG. Excessive Osteocytic Fgf23 Secretion Contributes to Pyrophosphate Accumulation and Mineralization Defect in Hyp Mice. *PLoS Biol.* 2016 Apr;14(4):e1002427.
388. Tokarz D, Martins JS, Petit ET, Lin CP, Demay MB, Liu ES. Hormonal Regulation of Osteocyte Perilacunar and Canalicular Remodeling in the Hyp Mouse Model of X-Linked Hypophosphatemia. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* 2018;33(3):499–509.
389. Davis HM, Aref MW, Aguilar-Perez A, Pacheco-Costa R, Allen K, Valdez S, et al. Cx43 overexpression in osteocytes prevents osteocyte apoptosis and preserves cortical bone quality in aging mice. *JBMR Plus.* 2018 Jul;2(4):206–16.
390. Hemmatian H, Bakker AD, Klein-Nulend J, van Lenthe GH. Aging, Osteocytes, and Mechanotransduction. *Curr Osteoporos Rep.* 2017;15(5):401–11.
391. Corrado A, Cici D, Rotondo C, Maruotti N, Cantatore FP. Molecular Basis of Bone Aging. *Int J Mol Sci.* 2020 May 23;21(10).
392. Sherk VD, Rosen CJ. Senescent and apoptotic osteocytes and aging: Exercise to the rescue? *Bone.* 2019;121:255–8.
393. McKenzie J, Smith C, Karuppaiah K, Langberg J, Silva MJ, Ornitz DM. Osteocyte Death and Bone Overgrowth in Mice Lacking Fibroblast Growth Factor Receptors 1 and 2 in Mature Osteoblasts and Osteocytes. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* 2019;34(9):1660–75.
394. Piemontese M, Onal M, Xiong J, Han L, Thostenson JD, Almeida M, et al. Low bone mass and changes in the osteocyte network in mice lacking autophagy in the osteoblast lineage. *Sci Rep.* 2016 Apr 11;6:24262.
395. Yin X, Zhou C, Li J, Liu R, Shi B, Yuan Q, et al. Autophagy in bone homeostasis and the onset of osteoporosis. *Bone Res.* 2019;7:28.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

396. Dallas SL, Xie Y, Shiflett LA, Ueki Y. Mouse Cre Models for the Study of Bone Diseases. *Curr Osteoporos Rep*. 2018;16(4):466–77.
397. Xiong J, Piemontese M, Onal M, Campbell J, Goellner JJ, Dusevich V, et al. Osteocytes, not Osteoblasts or Lining Cells, are the Main Source of the RANKL Required for Osteoclast Formation in Remodeling Bone. *PLoS One*. 2015;10(9):e0138189.
398. Blackburn J, Mansell JP. The emerging role of lysophosphatidic acid (LPA) in skeletal biology. *Bone*. 2012 Mar;50(3):756–62.
399. González de San Román E, Manuel I, Giralt MT, Chun J, Estivill-Torrús G, Rodríguez de Fonseca F, et al. Anatomical location of LPA1 activation and LPA phospholipid precursors in rodent and human brain. *J Neurochem*. 2015 Aug;134(3):471–85.
400. Yu Z-L, Jiao B-F, Li Z-B. Lysophosphatidic Acid Analogue rather than Lysophosphatidic Acid Promoted the Bone Formation In Vivo. *BioMed Res Int*. 2018;2018:7537630.
401. Xu Y, Qian L, Prestwich GD. Synthesis of monofluorinated analogues of lysophosphatidic acid. *J Org Chem*. 2003 Jun 27;68(13):5320–30.
402. Cheuk KY, Zhu TY, Yu FWP, Hung VWY, Lee KM, Qin L, et al. Abnormal Bone Mechanical and Structural Properties in Adolescent Idiopathic Scoliosis: A Study with Finite Element Analysis and Structural Model Index. *Calcif Tissue Int*. 2015 Oct;97(4):343–52.
403. Yu WS, Chan KY, Yu FWP, Ng BKK, Lee KM, Qin L, et al. Bone structural and mechanical indices in Adolescent Idiopathic Scoliosis evaluated by high-resolution peripheral quantitative computed tomography (HR-pQCT). *Bone*. 2014 Apr;61:109–15.
404. Barre R, Beton N, Batut A, Accabed F, Sales de Gauzy J, Auriol F, et al. Ghrelin uses the GHS-R1a/Gi/cAMP pathway and induces differentiation only in mature osteoblasts. This ghrelin pathway is impaired in AIS patients. *Biochem Biophys Res*. 2020 Dec 1;24:100782.
405. Zhang J, Chen H, Leung RKK, Choy KW, Lam T-P, Ng BKK, et al. Aberrant miR-145-5p/ β -catenin signal impairs osteocyte function in adolescent idiopathic scoliosis. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2018 Jun 15;32(12):201800281.
406. Chen H, Zhang J, Wang Y, Cheuk K-Y, Hung ALH, Lam T-P, et al. Abnormal lacuno-canalicular network and negative correlation between serum osteocalcin and Cobb angle indicate abnormal osteocyte function in adolescent idiopathic scoliosis. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2019 01;33(12):13882–92.