



HAL
open science

EFFETS DES GLUCOCORTICOIDES SUR LA MISE EN PLACE DES CENTRES D'OSSIFICATION CHEZ L'EMBRYON DE RAT. Implication de certains gènes du développement

Rim Nadra

► **To cite this version:**

Rim Nadra. EFFETS DES GLUCOCORTICOIDES SUR LA MISE EN PLACE DES CENTRES D'OSSIFICATION CHEZ L'EMBRYON DE RAT. Implication de certains gènes du développement. Sciences du Vivant [q-bio]. université Paris VII, 2004. Français. NNT: . tel-00414235

HAL Id: tel-00414235

<https://theses.hal.science/tel-00414235>

Submitted on 8 Sep 2009

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.

UNIVERSITE PARIS VII - DENIS DIDEROT
Faculté de Chirurgie Dentaire
5, rue Garancière - 75006 PARIS

Année 2004

Thèse n°

THESE

pour le

DIPLOME DE DOCTORAT

Biologie Orale et Ostéoarticulaire. Biomatériaux et Biofonctionnalité

présentée et soutenue publiquement le 31 mars 2004

par

Melle Rim NADRA

**“EFFETS DES GLUCOCORTICOIDES SUR LA MISE EN PLACE DES CENTRES
D'OSSIFICATION CHEZ L'EMBRYON DE RAT.
Implication de certains gènes du développement”**

JURY

Mme le Dr. Ariane BERDAL

Mme le Pr. Martine BONNAURE-MALLET

Mr. le Professeur Henri MAGLOIRE

Mme le Pr. Marie-Laure BOY-LEFEVRE

Mme le Pr. Nadine FOREST

Mme le Dr. Pierrette MENUELLE

Examineur

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

UNIVERSITE PARIS 7 - DENIS DIDEROT

Président : Monsieur le Professeur Benoît EURIN

Doyen de la Faculté de Chirurgie Dentaire : Mme le Professeur Marie-Laure BOY-LEFEVRE

Secrétaire Général : Monsieur Georges ROQUEPLAN

JURY

Mme le Dr. Ariane BERDAL

Mme le Pr. Martine BONNAURE-MALLET

Mr. le Professeur Henri MAGLOIRE

Mme le Pr. Marie-Laure BOY-LEFEVRE

Mme le Pr. Nadine FOREST

Mme le Dr. Pierrette MENUELLE

Examineur

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

Les opinions émises dans les dissertations présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, sans aucune approbation ni improbation de la Faculté de Chirurgie Dentaire.

à ma patrie : la Syrie

au pays d'accueil : la France

à ma famille : mes parents, mes frères et sœurs

Je tiens à remercier ici l'Université de Damas ainsi que le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche français pour leur soutien scientifique et financier de ces années de thèse.

A Madame le Professeur Marie-Laure BOY-LEFEVRE qui m'a fait le grand honneur de siéger à ce jury malgré son emploi du temps chargé. Soyez assuré de mes sincères remerciements pour votre soutien pendant ces sept années d'études passées en France.

J'adresse mes plus vifs remerciements à Madame le Professeur Martine BONNAURE-MALLET d'avoir été mon directeur de DEA et d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse. Soyez assuré de mes sincères remerciements pour votre aide, votre générosité, votre disponibilité ainsi que pour votre soutien pendant mon séjour à Rennes.

Je tiens à remercier vivement Madame le Professeur Nadine FOREST pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et d'avoir accepté de participer à ce jury. Je vous prie de croire en l'expression de mon profond respect.

Je remercie Madame le Docteur Pierrette MENEVILLE pour avoir dirigé cette thèse et pour sa rigueur scientifique et sa disponibilité tout au long de ce travail. Qu'elle veuille bien trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

J'exprime ma profonde gratitude à Madame le Docteur Ariane BERDAL pour m'avoir ouvert les portes de son laboratoire de recherche. La bienveillance dont elle a toujours fait preuve à mon égard m'a permis de mener mes recherches dans les meilleures conditions.

Je remercie Monsieur le Professeur Henri MAGLOIRE pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail en acceptant la charge d'en être le rapporteur.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Madame Laurence PIBOUIN pour sa patience et son aide très précieuse en Biologie Moléculaire. J'espère pouvoir continuer cette collaboration dans l'avenir.

Je remercie Mademoiselle Isabelle FERNANDES pour ses précieux conseils et son aide à finir ce travail.

Mes remerciements chaleureux vont à Monsieur le Professeur Jean-Michel SAUTIER pour son soutien permanent.

Je tiens également à remercier Monsieur Dominique HOTTON pour le soutien qu'il m'a apporté. Je remercie Monsieur Frédéric LEZOT pour ses conseils et encouragements.

Je remercie tous les membres du laboratoire pour leurs encouragements et leur soutien, en particulier Madame Audrey ASSELIN pour sa patience et sa gentillesse. Toutes mes excuses à ceux que j'ai oublié dans ces remerciements.

Je voudrais tout particulièrement remercier Monsieur Emile MARIE-ROSE pour son aide si compétente lors de la composition de ce mémoire et pour son immuable bonne humeur.

Je tiens aussi à exprimer toute ma reconnaissance à mes amis pour leur soutien permanent et tout particulièrement à la famille ACHKAR ainsi que Madame Marie-Anne ORTHOLAN qui m'ont aidé à surmonter tous les écueils qui ont parsemé mon séjour à Paris.

SOMMAIRE

Page

I. INTRODUCTION	5
II. RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE	6
A. LA SQUELETTOGENÈSE CRANIO-FACIALE	6
1. L'origine embryologiques des éléments squeletiques cranio-faciaux	
2. La morphogenèse des futurs éléments squelettiques	7
3. Le tissu cartilagineux	8
<i>.Développement de septum nasal</i>	9
<i>.Les cellules</i>	10
<i>.La matrice</i>	10
<i>.L'ossification endochondrale</i>	11
4. Le tissu osseux	13
<i>.Développement du calvaria de rat</i>	13
<i>.Les cellules</i>	14
<i>.La matrice</i>	15
<i>.Le cycle de remodelage</i>	16
<i>.Contrôle génétique de l'ossification membraneuse</i>	16
B. LES REGULATEURS DE LA DIFFERENCIATION DES TISSUS MINERALISES	17
1. Les glucocorticoïdes et squelettogenèse cranio-faciale	18
1.1. Rôle physiologique des GC au stade foetal	18
1.2. Rôle des GC dans le développement des tissus cartilagineux	19
1.3. Rôle des GC dans le développement des tissus osseux	20
1.4. Biosynthèse et physiologie des glucocorticoïdes	21
1.5. Modes d'action des glucocorticoïdes	23
<i>.Action génomique des GC</i>	23
<i>.Action non génomique des GC</i>	23
1.6. Les récepteurs des glucocorticoïdes	24
1.6.1. Les récepteurs médiant les action génomiques des GC	24
<i>.Localisation des RG</i>	24
<i>.Structure</i>	24
<i>.Activation des RG</i>	25
<i>.Elément de reponse aux GC</i>	25

. <i>Action transcriptionnelle directe</i>	25
. <i>Action transcriptionnelle indirecte du complexe</i>	26
. <i>GC/récepteur</i>	26
1.6.2. Les récepteurs médiant les actions non génomiques des GC	26
. <i>Récepteurs intracellulaires classiques</i>	26
. <i>Récepteur stéroïdiens non classiques</i>	26
2. Système IGF/IGFBP : un des modes d'action des GC	27
2.1. Histoire et terminologie	27
2.2. IGF, IGFBP, récepteurs et protéases	28
. <i>Les IGF</i>	28
. <i>Les IGFBP</i>	29
. <i>Les récepteurs aux IGF</i>	30
. <i>Les protéases, fragments de dégradation des IGFBP</i>	30
2.3. IGF et la croissance fœtale	31
2.4. Implication du système IGF dans la biominéralisation	32
2.5. Etude <i>in vitro</i> de l'implication du système IGF/IGFBP dans la biominéralisation	33
C. LES HOMEOGENES ET LA SQUELETTOGENESE	35
1. Gènes maîtres à homéoboîte	36
2. Gènes divergents à homéoboîte	37
3. Gènes secondaires à homéoboîte	37
3.1. Msx/Dlx au cours du développement du bourgeon facial	37
3.2. Les maladies associées à des mutations Msx/Dlx	38
3.3. Les homéogènes dans les tissus osseux	39
III. OBJECTIFS	41
IV. PUBLICATIONS	42
. <i>Article I</i>	
. <i>Article II</i>	
V. RESULTATS NON PUBLIES	43
VI. DISCUSSION GENERALE	49
VII. CONCLUSION ET PRESPECTIVES	56
VIII. BIBLIOGRAPHIE	57

Abréviations

ACTH	: adrenocorticotropin hormone
ALS	: acide labile-subunit
AP (PAL)	: alkaline phosphatase
b-GP	: β -glycerophosphate
11-HSD2	: 11- hydroxysteroid dehydrogenase-2
Co I	: collagen type I
CoII	: collagen type II
CRH	: corticotropin realising hormone
DBD	: DNA-binding domain
Dex	: dexamethasone
Dlx	: distal-less homeobox
DNA	: dexoxyribonucleic acid
ECM (MEC)	: extracellular matrix
GAGs	: glycosaminoglycan
GAPDH	: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GC	: glucocorticoids
GH	: growth hormone
GR(RG)	: glucocorticoid receptor
GRE	: glucocorticoid-responsive-element
HPA	: hypothalamus-hypophyse-adrenal axis
Hsp	: heat shock protein
IGF	: insulin-like growth factor
IGFBP	: IGF-binding protein
IRSI	: insulin receptor substrat-1
LBD	: ligand binding domain
msh	: muscle segment homeobox (Drosophyle)
Msx	: muscle segment homeobox
NLS	: nuclear localisation signal
OC	: ostéocalcin
RGD	: tripeptide Arg-Gly-Asp
RNA	: ribonucleic acid
RT-PCR	: reverse transcriptase polymerase chain reaction
Runx-2(Cbfa-1)	: runt domain factor (core-binding-factor α -1)

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

- Figure 1.** Le développement craniofacial chez les vertébrés : (A) Stades précoces (*d'après Couly et coll., 1998*) ; (B) Stades tardifs (stade 24) (*d'après Francis-west et coll., 1998*).
- Figure 2.** Origine embryonnaire de la base du crâne chez l'homme (A) (*d'après Benoît, 2001*) et la voûte du crâne (B) chez la souris (*d'après Jiang, 2002*).
- Figure 3.** Origine embryologique multiple des cartilages et des os (*d'après Karsenty, 1998*).
- Figure 4.** Coupe histologique longitudinale du cartilage de croissance de tibia de rat de 35 jours (*d'après Poole, 1991*).
- Figure 5.** La structure du cartilage (*d'après Corvol, 1996*).
- Figure 6.** Schéma représentatif de l'expression des gènes au cours de l'ostéogenèse et la chondrogenèse (*d'après Ohbayashi et coll., 2002*).
- Figure 7.** Représentation schématique des différentes étapes de l'ossification endochondrale (*d'après Ducky, 2001*).
- Figure 8.** Place de l'ostéoblaste au cours du cycle de remodelage osseux (*d'après Ducky, 2001*).
- Figure 9.** Représentation du mécanisme de régulation de la différenciation ostéoblastique et chondrocytaire (*d'après Harada et Rodan, 2003*).
- Figure 10.** Voie génomique du cortisol.
- Figure 11.** Rôles physiologiques des glucocorticoïdes dans les organes cibles (*d'après Newton, 2000*).
- Figure 12.** Schéma représentatif des actions génomiques et non génomiques des glucocorticoïdes (*d'après Falkenstein et coll., 2000*).
- Figure 13.** Modèles possibles de modulation de la transcription des gènes par les glucocorticoïdes (*d'après Newton, 2000*).
- Figure 14.** Structure du récepteur des glucocorticoïdes chez l'homme et le rat (*d'après Newton, 2000*).
- Figure 15.** Composants du système IGF/IGFBP (*d'après Collet-Solberg et Cohen, 1996*).
- Figure 16.** Fonctions des IGFBP indépendantes des IGF (*d'après Firth et Baxter, 2002*).
- Figure 17.** La voie de signalisation du récepteur de type I de l'IGF-I (*d'après Le Roith, 2001*).

- Tableau 1.** Effets des glucocorticoïdes sur les ostéoblastes de différentes espèces.
- Tableau 2.** Hiérarchie de l'expression des gènes homéotiques au cours du développement fœtal de la sphère oro-faciale chez l'homme (*d'après Benoît, 2001*).
- Tableau 3.** Facteurs de transcription et facteurs de signalisation impliqués lors du développement du bourgeon facial (*d'après Francis-West, 1998*).

I. INTRODUCTION

Le laboratoire, Biologie Orofaciale et Pathologie, INSERM EMI-U 0110, dans lequel nous avons effectué ce travail de recherche a pour thématique “*l’étude du développement cranio-facial et les pathologies associées*”. La régulation de l’ossification de la sphère orofaciale, qu’elle soit membraneuse ou endochondrale, implique des hormones, des facteurs de croissance et des homéogènes. Nous avons étudié, plus particulièrement, la régulation hormonale de la biominéralisation des tissus cartilagineux et osseux. En effet, des études menées chez le rat ont révélé une concomitance entre le pic des glucocorticoïdes (GC) au dernier tiers de la gestation et l’apparition des centres d’ossification craniofaciaux (17^{ème}-19^{ème} jour de gestation). Nous nous sommes donc intéressés au rôle des GC lors la mise en place des centres d’ossification du crâne chez le rat. Très peu de travaux portant sur le cartilage ont montré que l’un des modes d’action des GC implique le système IGF/IGFBP.

Dans la première partie de ce travail, nous avons étudié l’implication possible de ce système comme relais des effets des GC sur la biominéralisation du squelette craniofacial au cours du développement chez le rat. Parallèlement, nous nous sommes intéressés aux effets de cette hormone sur les mécanismes moléculaires gouvernant la différenciation du squelette craniofacial lors la mise en place des centres d’ossification.

La deuxième partie des travaux porte d’une part, sur l’effet des GC sur l’expression des facteurs de transcription impliqués dans la différenciation ostéoblastique et d’autre part sur des gènes codant pour des marqueurs de différenciation des ostéoblastes.

Enfin, la dernière partie de ce mémoire poursuit l’étude des mécanismes de la différenciation ostéoblastique. Ces travaux, en cours, sont focalisés sur un des gènes essentiel de la squelettogenèse craniofaciale, le gène *Msx-1*. En effet, il a été montré au laboratoire que ce gène, qui a un rôle clé lors la différenciation ostéoblastique, présente un mode de régulation original impliquant un ARN antisens codé par le même gène et produit par une lecture inversée du gène. Nous avons donc entrepris l’étude de cet ARN chez le rat afin d’aborder ultérieurement son rôle au cours du développement du squelette craniofacial chez le rat.

Avant de détailler le projet de recherche, des rappels portant sur les principales étapes du développement du tissu squelettique et leurs composants, les modes d’action des glucocorticoïdes : le système IGF/IGFBP et les homéogènes *Msx/Dlx* sont présentés.

II-RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

A – LA SQUELETTOGENESE CRANIO-FACIALE

1. L'origine embryologique des éléments squelettiques cranio-faciaux

Le développement de la tête des vertébrés englobe différentes interactions entre le tube neural, les crêtes neurales, le mésoderme, l'ectoderme et l'endoderme des arcs branchiaux (Chambers et McGonnell, 2002). Ce développement est contrôlé non seulement par des facteurs de croissance et des hormones (Smink et coll., 2003 ; Bellows et coll., 1998 ; Abe et coll., 2000 ; Hodgkinson et coll., 1993), mais aussi par des gènes à homéoboîte tels que : Alx, Barx, Dlx, Pitx, Msx, Pax, Runx et Gsx (Francis-West et coll., 1998 ; Lezot et coll., 2000).

En fin de gastrulation, l'embryon est constitué de trois couches principales : l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme. Au cours d'une migration des cellules des crêtes neurales, une quatrième couche a été identifiée dans le repli neural fermé (la crête neurale céphalique). La crête neurale céphalique (d'origine neuroectodermique) se forme dans la jonction de la plaque neurale et de l'épiderme par une induction ectodermique entre cellules neurales (plaque neurale) et non neurales (épiderme). Ces cellules migrent ventralement et participent à la formation des structures squelettiques du crâne (McGonnell et Graham, 2002). D'autre part, les cellules de la crête neurale troncale, partie intégrante de ce mésenchyme embryonnaire, migrent plus rostralement et donnent naissance aux squelettes axial et appendiculaire qui ont une origine mésodermique tandis que le squelette craniofacial est plus hétérogène et regroupe plusieurs cellules d'origine différentes : crêtes neurales, préchordales, paraxiales et mésoderme latéral (Couly et coll., 1993).

Chez l'embryon de poulet, les cellules des crêtes neurales qui migrent tout au long de la région prosencéphale, mésencéphale et du 1^{er} rhombomère (r1) donnent naissance aux os du crâne sensoriel (neurocranium) : frontal, pariétal, squamosal et basi-présphénoïde. Les cellules des crêtes neurales qui migrent de r1 et r2 vers le 1^{er} arc branchial (AB1), développent le bourgeon nasal qui forme plus tard la capsule nasale, les os maxillaire et mandibulaire, la langue, les dents et le palais secondaire. Le reste, "crâne viscéral", se forme à partir des cellules des crêtes neurales de rhombomères caudaux qui colonisent les arcs branchiaux 4,6,7,8 (Couly et coll., 2002) (**Figure 1**).

Chez les mammifères, la voûte du crâne a pour origine les crêtes neurales céphalique et mésodermique. Le calvaria et les os faciaux se forment par ossification membraneuse contrairement

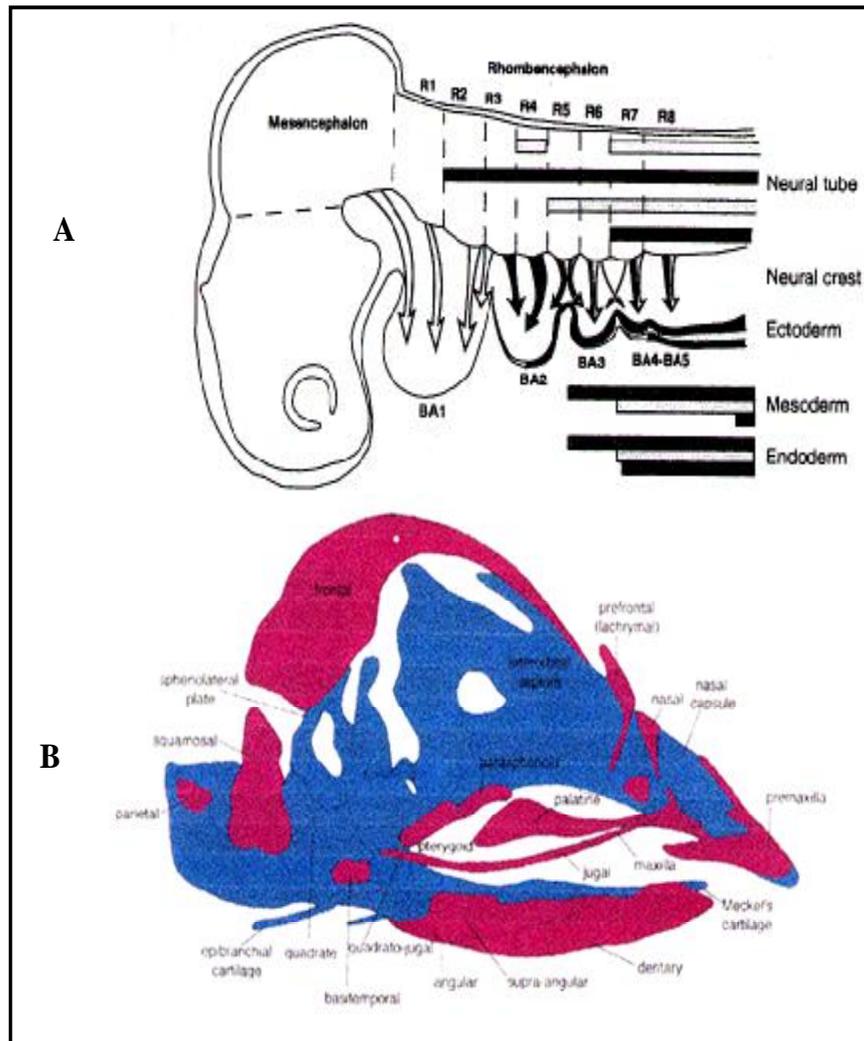


Figure 1. Le développement craniofacial chez les vertébrés : (A) Stades précoces (d'après Couly et coll., 1998) ; (B) Stades tardifs (stade 24) (d'après Francis-west et coll., 1998).

(A) : Schéma représentatif de la segmentation du rhombocéphale en 8 rhombomères chez l'embryon de poulet. Les arcs branchiaux se divisent en AB1-AB5. Dans le crâne développé, la migration des cellules des crêtes neurales s'effectue du r1-r8 jusqu'aux AB1-AB5 entre le tube neural et les trois feuilletts embryonnaires que sont l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme. (B) : Structure du crâne de l'embryon du poulet. Les éléments cartilagineux sont représentés en bleu et les éléments osseux en rouge. Le bourgeon maxillaire donne naissance aux os: ptérygoïde, palais, quadrotogonale et jugale. Le bourgeon mandibulaire donne naissance aux structures dérivées de la mandibule inférieure. La masse fronto-nasale donne naissance au septum nasal.

à l'os occipital et aux os de la base du crâne viscéral qui se développent par ossification endochondrale (Jiang et coll., 2002) (**Figure 2**).

2. La morphogenèse des futurs éléments squelettiques

La formation du squelette débute par la convergence et la condensation des cellules en majorité mésenchymateuses, en lieu et forme de chacun de ses futurs éléments. Trois régions de l'embryon vont être à l'origine du squelette. Les membres dérivent du mésoderme de la plaque latérale, le squelette axial (colonne vertébrale et cage thoracique) dérive des somites et le squelette cranio-facial est majoritairement formé par des cellules originaires de la crête neurale céphalique (**Figure 3**). La morphogenèse de la tête implique un ensemble de mécanismes qui donnent la forme aux différentes structures cranio-faciales. Ce mécanisme implique une séquence d'événements tels que la prolifération, la différenciation, la migration cellulaire et l'apoptose.

**Cette première étape* de la squelettogenèse est contrôlée par des facteurs régulateurs jouant donc un rôle organisateur dans la forme de l'embryon tels que le "fibroblast growth factor" (FGF), hedgehog (hh) et les "bone morphogenetic protein" (BMP), et par des facteurs de transcription à homéoboîte, notamment des sous-familles comme Hox, Pax et Msx (Karsenty, 1998).

Les différents types d'os (cortical et alvéolaire) et de cartilage (articulaire et de croissance) varient de par leur morphologie et leur fonctionnalité. Ainsi, les ostéoblastes, cellules informatives au cours du développement de l'os, secrètent dans la MEC (selon leur site anatomique) des molécules différentes qui déterminent chaque type d'os. En résumé, les cellules du squelette (cartilage et os) diffèrent selon leur site anatomique, cette différence est due probablement à l'action des gènes Hox et d'autres protéines à homéodomaine (Wurtz et Berdal, 2003). Le rôle des gènes Hox est primordial dans la formation du squelette troncal (Hunt et Krumlauf, 1992). En revanche, la morphogenèse de la tête, contrairement au squelette du tronc, a été attribuée aux gènes non Hox. Récemment, l'absence de l'expression des gènes Hox a été établie au cours du développement des os faciaux, craniens et mandibulaires chez les animaux mutés (Trainor et Krumlauf, 2001).

Le squelette est un organe constitué de deux tissus : le cartilage et l'os. Dans ces deux tissus interviennent plusieurs types cellulaires : les chondrocytes pour le cartilage, les ostéoblastes, les ostéoclastes et les ostéocytes pour l'os.

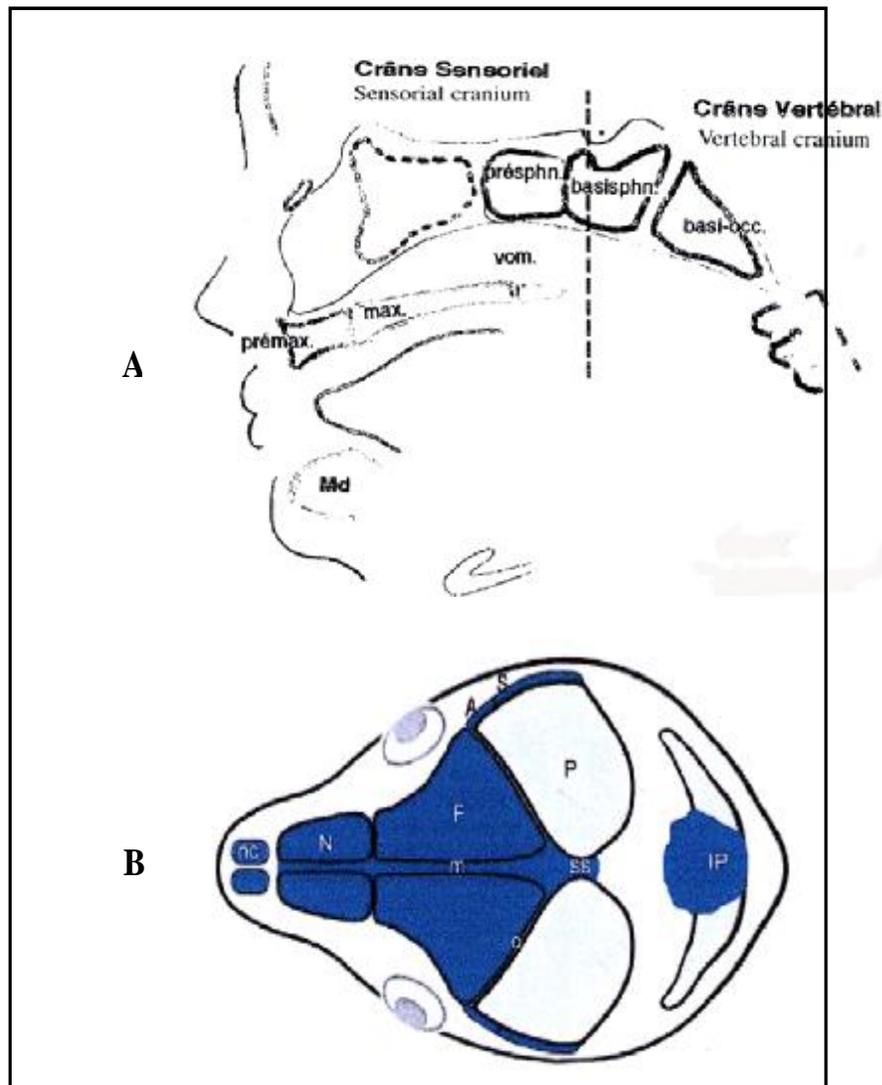


Figure 2. Origine embryonnaire de la base du crâne chez l'homme (A) (d'après Benoit, 2001) et la voûte du crâne (B) chez la souris (d'après Jiang, 2002).

(A) : Répartition des cellules des crêtes neurales en cellules squelettiques. (B) : Les cellules des crêtes neurales contribuent à la formation des éléments et des sutures de la voûte du crâne. (A = alisphénoïde; c = coronale ; F = frontale ; m = suture metopique ; N = nasale ; nc = cartilage nasale ; P = pariétale ; S = squamosale ; ss = suture sagittale).

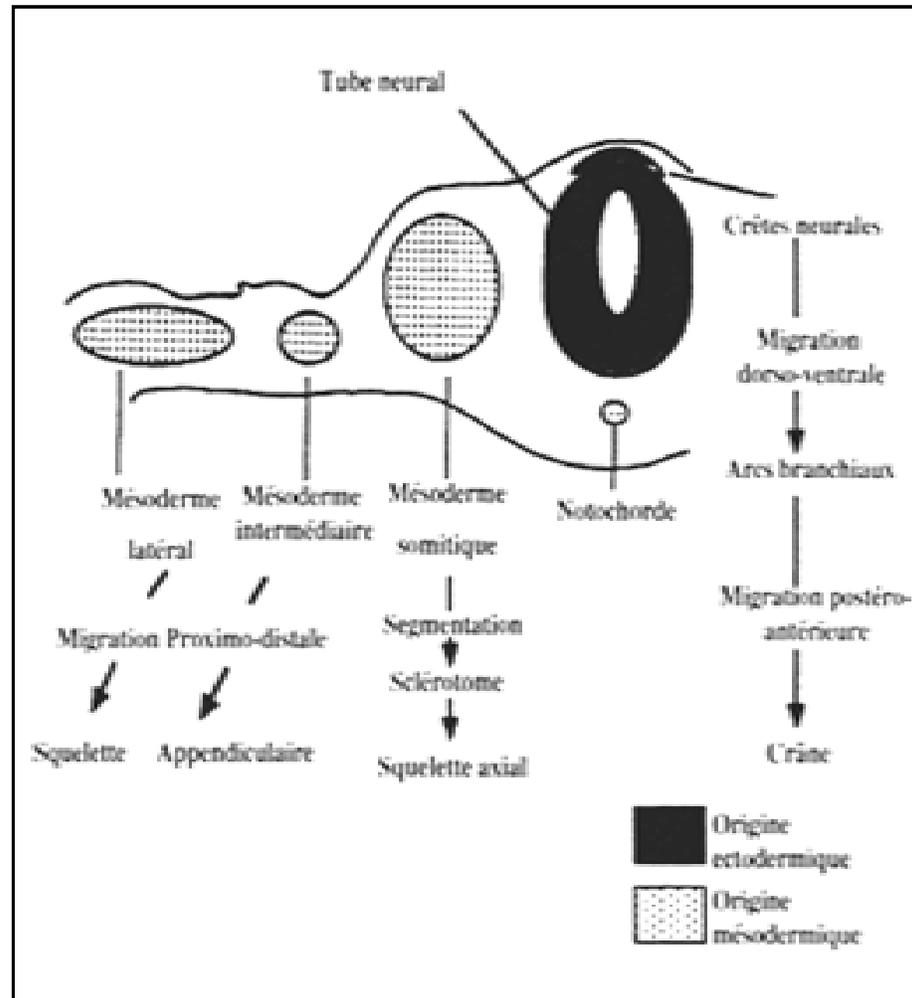


Figure 3. Origine embryologique multiple des cartilages et des os (d'après Karsenty, 1998).

Le squelette cranio-facial est dérivé essentiellement de trois lignées cellulaires distinctes : la plaque latérale mésodermique, le sclérotome et la crête neurale céphalique (éctomésenchymateuse). Le squelette axial et appendiculaire ont une origine mésodermique. Les membres sont dérivés de la plaque mésodermique latérale, le squelette axial (colonne vertébrale et cage thoracique) est dérivé des somites.

3. Le tissu cartilagineux

Pendant la vie embryonnaire et fœtale, le tissu cartilagineux forme temporairement la plus grande partie de l'ébauche squelettique. C'est en son sein que se développe le processus d'ossification endochondrale qui régit l'ossification de ces ébauches et la formation des os. Il existe différents types de cartilage :

- *le cartilage élastique* : il est caractérisé par la présence de fibres élastiques (épiglotte, trompe d'Eustache) qui lui confèrent une résistance à la flexion (Hall, 1983).
- *le cartilage fibreux* : il est riche en collagène, ce qui lui confère une grande résistance aux tractions et aux compressions, et constitue les zones d'insertion de certains tendons et des disques intervertébraux (Van der Rest, 1987).
- *le cartilage hyalin* (le cartilage articulaire, le cartilage du nez) : c'est le cartilage le plus abondant et il est constitué d'une matrice extra-cellulaire importante, riche en collagène et en protéoglycanes. Ainsi, la force tensile des fibres de collagène s'oppose à la pression osmotique due à la grande densité de charge des protéoglycanes pour former un système amortisseur des chocs.

Le cartilage de croissance qui est un cartilage transitoire pendant la vie embryonnaire, s'ossifie après la naissance, à l'exception du septum nasal chez les rongeurs et chez l'homme, qui persiste jusqu'à l'âge adulte. D'autres cartilages de croissance se limitent à une zone comprise entre les épiphyses et la diaphyse des os longs, où ils assurent leur croissance longitudinale, puis disparaissent vers l'âge de 18-20 ans.

Développement du septum nasal

Le septum nasal se développe au centre de la face et joue un rôle primordial dans la fonctionnalité orale correcte. Sa structure serait impliquée dans la morphogenèse, le développement et la croissance du massif facial. Histologiquement, le septum nasal est une plaque cartilagineuse située dans le plan centro-sagittal de la face et s'étend de la partie antérieure du "snout" tout au long du prémaxillaire, du maxillaire et du palais. Il se développe jusqu'à l'âge adulte par ossification endochondrale d'une manière identique chez le rat, la souris, le lapin et l'homme.

Chez l'homme, jusqu'à l'âge adulte, la partie antérieure du septum reste cartilagineuse (Moss, 1954). Lors d'achondroplasie, la taille du maxillaire est réduite et la croissance cartilagineuse perturbée. Cette observation montre l'importance du septum nasal dans la détermination de la forme de la face. Les auteurs ont conclu que le septum nasal joue un rôle "directeur" dans la croissance normale de la région naso-maxillaire du fait de la concomitance entre la taille réduite du nez et la présence d'une fente palatine. Cette constatation a été confirmée par une étude chez des souris déficientes en hormone de croissance, la souche étudiée présente un retard sévère de la croissance des tissus cartilagineux dans le complexe nasal (pré-maxillaire, maxillaire, palais et os nasal) (Roberts et Lucas, 1994).

Chez les rongeurs, le développement du crâne et de la région naso-maxillaire est très complexe. Le développement de la cavité nasale présente un schéma de croissance différent de celui du crâne. La croissance de l'os nasal est observée dans les surfaces extérieures et la résorption osseuse se fait dans les surfaces inter-nasales. La croissance des sutures est très active et varie en fonction de l'os présent de chaque côté de la suture (Youssef, 1966). Chez le rat nouveau-né, une étude radioautographique a prouvé que le septum nasal est un cartilage de croissance qui a une activité proliférative chondrogénique augmentant aux différents âges fœtaux jusqu'à la naissance (Searles, 1977).

Du point de vue de la génétique du développement, le septum nasal, comme tout le squelette craniofacial (os et cartilage), se distingue par l'absence d'expression de gènes du développement de la famille Hox, d'autres homéogènes contribuent à déterminer l'identité positionnelle des cellules squelettiques cranio-faciales comme le montrent les expériences de transgénèse chez la souris (Satokata et Maas, 1994) et les mutations naturelles chez l'homme (Jabs et coll., 1993).

Les cellules

Le septum nasal est un cartilage primaire (cartilage de croissance), qui se forme principalement à partir des dérivés des cellules de la crête neurale (chondrocranium), qui migrent de la partie dorsale du tube neural vers les différents arcs branchiaux et les régions donnant naissance au crâne et à la face. Selon leurs destinations finales, elles se différencient en différents types de cartilages. Les chondrocytes sont donc des cellules spécialisées dans tous les cartilages des vertébrés. Le septum nasal et la plaque cartilagineuse (tibia) sont des modèles bien étudiés, ils se caractérisent par un grand potentiel de prolifération et de différenciation cellulaire des chondrocytes et se terminent par un processus de mort cellulaire programmée (apoptose). Les protéines

matricielles synthétisées par les chondrocytes disparaissent au profit de la formation osseuse, comme le Co II et des protéoglycanes (Sautier et coll., 1993).

La matrice

Le cartilage de croissance postnatale, comme celui des ébauches cartilagineuses embryonnaires, est organisé en couches cellulaires superposées correspondant à des stades successifs de différenciation et de maturation des chondrocytes. Différentes zones ont été observées : zone de réserve, zone de prolifération, zone hypertrophique et zone d'invasion vasculaire. Alors que les cartilages articulaires et fibreux ne sont pas vascularisés, le cartilage de croissance présente une micro-vascularisation qui traverse la zone de réserve et atteint la limite supérieure de la zone de prolifération (**Figure 4**).

Les éléments nutritifs des chondrocytes traversent la trame protéique de la matrice extracellulaire. Cette trame a un rôle particulièrement important dans la diffusion des électrolytes et des ions, notamment Ca^{++} , qui sont fortement attirés par les charges négatives des protéoglycanes en cours de dégradation dans la zone de dégénérescence, puis par le collagène de type IX, X, XI. A tous les stades, les chondrocytes synthétisent et secrètent les protéines et les protéoglycanes qui constituent la matrice extracellulaire dans laquelle ils sont dispersés, ainsi que les nombreuses enzymes de dégradation de ces protéines matricielles et leurs inhibiteurs (**Figure 5**) (Corvol, 1996 ; Mallein-Gerin et van der Rest, 1996).

La croissance osseuse est due à deux processus d'ossification : directe (membraneuse) et indirecte où le cartilage transitoire est remplacé par l'os (ossification endochondrale).

Ossification endochondrale

L'ossification de type endochondral est prépondérante chez les vertébrés supérieurs. Le développement du septum nasal au sein du squelette facial se caractérise par un grand potentiel de prolifération, l'hypertrophie des chondrocytes, la minéralisation de la matrice cartilagineuse, la résorption de la MEC par des chondroclastes et finalement le remplacement du cartilage (après apoptose) par l'os qui s'accompagne d'une invasion vasculaire (Sautier et coll., 1993). En effet, tout le squelette appendiculaire et axial se forme selon ce processus, il se compose de trois étapes essentielles dont le déroulement est contrôlé au niveau génétique, cellulaire et tissulaire.

***Première étape. Production d'un modèle cartilagineux.** Les cellules de chaque condensation mésenchymateuse préfigurant un élément cartilagineux vont progressivement acquérir

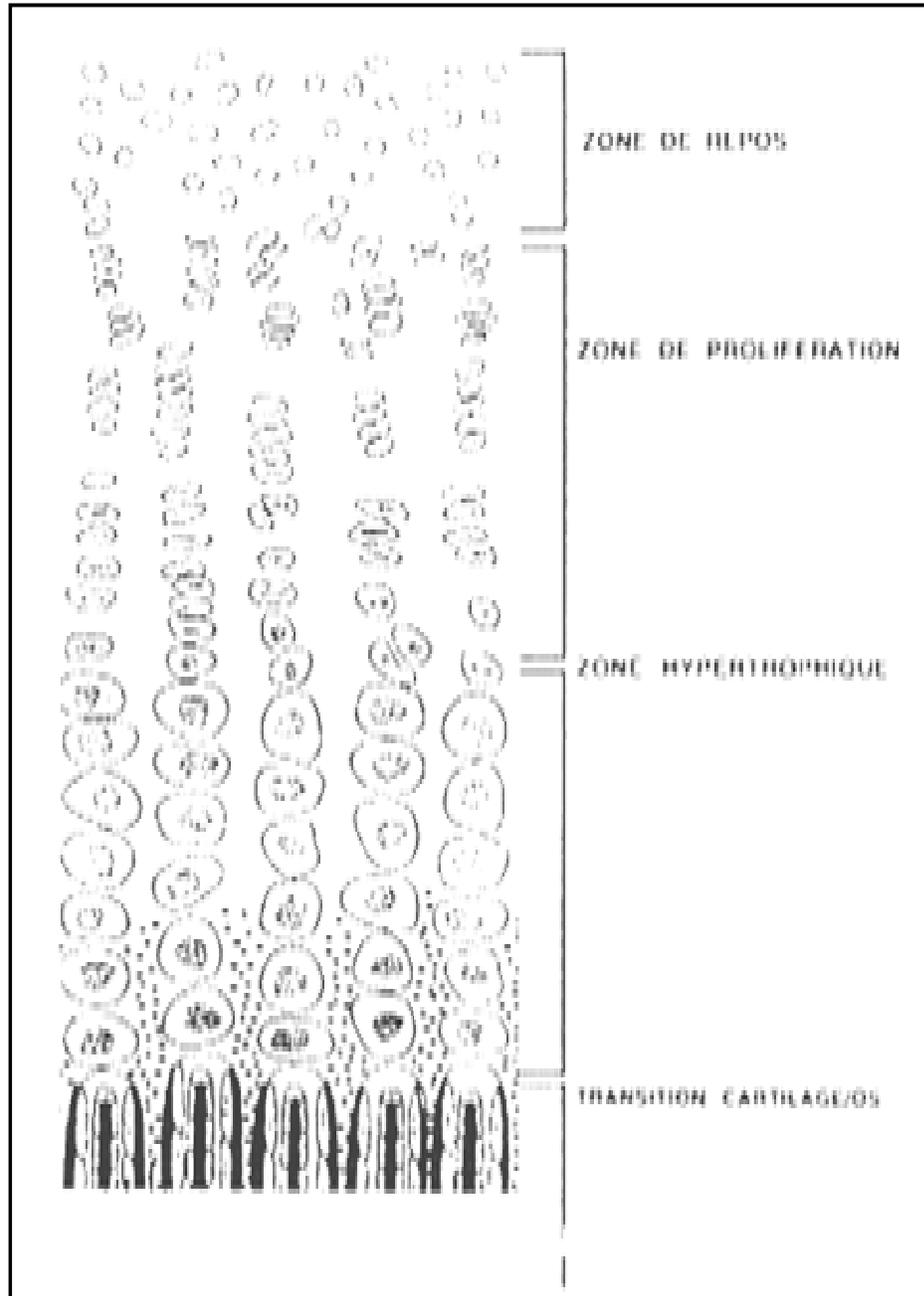


Figure 4. Coupe histologique longitudinale du cartilage de croissance de tibia de rat de 35 jours (d'après Poole, 1991).

Le cartilage est constitué de quatre zones : la zone de repos, la zone proliférative, la zone hypertrophique et la zone d'invasion vasculaire (zone de transition entre le cartilage et l'os). Chaque zone est caractérisée par des protéines matricielles et des facteurs de transcriptions spécifiques.

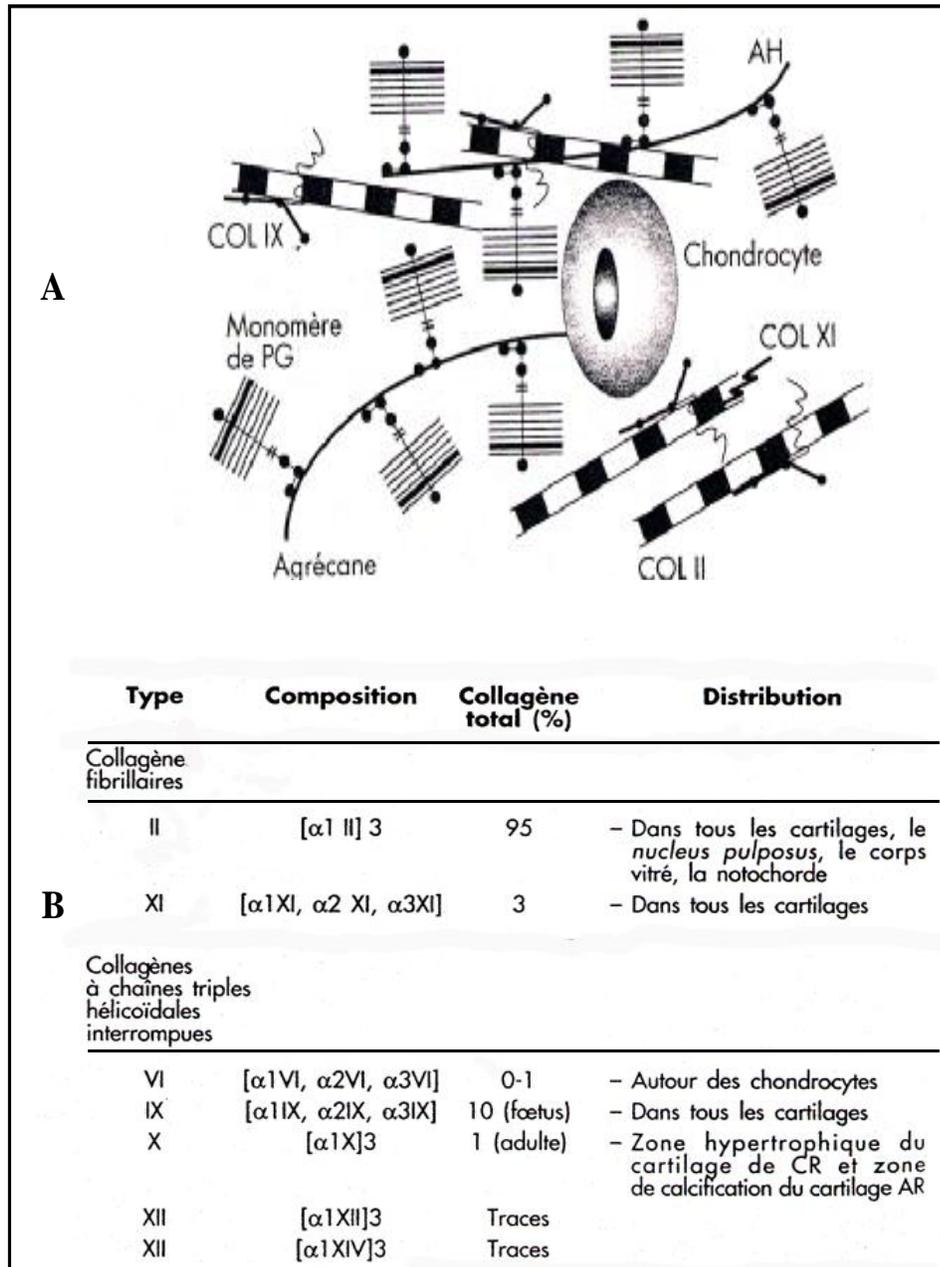


Figure 5. La structure du cartilage (d'après Corvol, 1996).

(A) : Composants protéiques principaux de la matrice du cartilage, organisation des fibrilles de collagène, des agrégats de protéoglycanes et de l'acide hyaluronique (AH). (B) : Les différents types de collagènes dans le cartilage (COL II, IX, X, XI).

une forme différente selon leur position : cellules périphériques et cellules centrales. En périphérie, elles forment le périchondre et la région médiane des futurs os appelée la virole osseuse dont les cellules ostéoprogénitrices prennent un aspect allongé et s'organisent en plusieurs couches serrées et se différencient ultérieurement en ostéoblastes. En revanche, les cellules du centre sont morphologiquement distinctes, révélant une différenciation en chondrocytes. Par exemple, elles sont capables de synthétiser de la matrice extracellulaire cartilagineuse riche en protéoglycanes et en Co II. Cette première étape de ségrégation cellulaire est sous le contrôle de Sox-9 dont la mutation provoque, chez les patients atteints de cette mutation, une malformation létale dominante des cartilages : la dysplasie campomélique (Lefebvre, 1998).

***Seconde étape. Différenciation des chondrocytes hypertrophiques et vascularisation.**

La seconde étape est caractérisée par la mise en place de la plaque de croissance, une structure cartilagineuse indispensable à la croissance longitudinale qui persiste jusqu'à la puberté chez l'homme. Dans un premier temps, les chondrocytes prolifèrent rapidement, formant des colonnes de cellules juxtaposées (zone de prolifération). Ensuite, les chondrocytes situés à la partie inférieure des colonnes vont s'élargir et la production du Co II commence à décroître (zone hypertrophique), les cellules hypertrophiques s'élargissent encore et vont cesser de synthétiser du Co II et lui substituer le Co X. Enfin, par un mécanisme mal connu, les chondrocytes situés dans la partie la plus centrale vont mourir par apoptose (Abad et coll., 2002).

Plusieurs éléments génétiques sont impliqués dans la maturation des chondrocytes, par exemple, la mutation du gène codant FGFR-3 est associée aux deux formes d'ostéochondroplasies les plus sévères et les plus fréquentes (Ohbayashi et coll., 2002). Au cours de l'ossification endochondrale, le facteur de transcription Runx-2 est exprimé dans toutes les cellules de la condensation squelettique en voie de maturation, puis son expression se restreint aux chondrocytes pré-hypertrophiques et aux cellules formant la virole osseuse. Récemment, il a été démontré que Runx-2 régule positivement la différenciation hypertrophique des chondrocytes. Il n'est exprimé que pendant le développement du cartilage, au démarrage de la maturation des chondrocytes, car après la naissance, l'expression de ce gène devient indétectable dans ces cellules (Takeda et coll., 2001). Msx-2, un autre facteur de transcription, est vraisemblablement impliqué dans la régulation de la prolifération des chondrocytes plutôt que dans leur maturation. Il a été mis en évidence que les souris Msx2 ^{-/-} présentent une réduction de l'épaisseur des cartilages de croissance due à une diminution du nombre total de chondrocytes (Satokata et coll., 2000) (**Figure 6**).

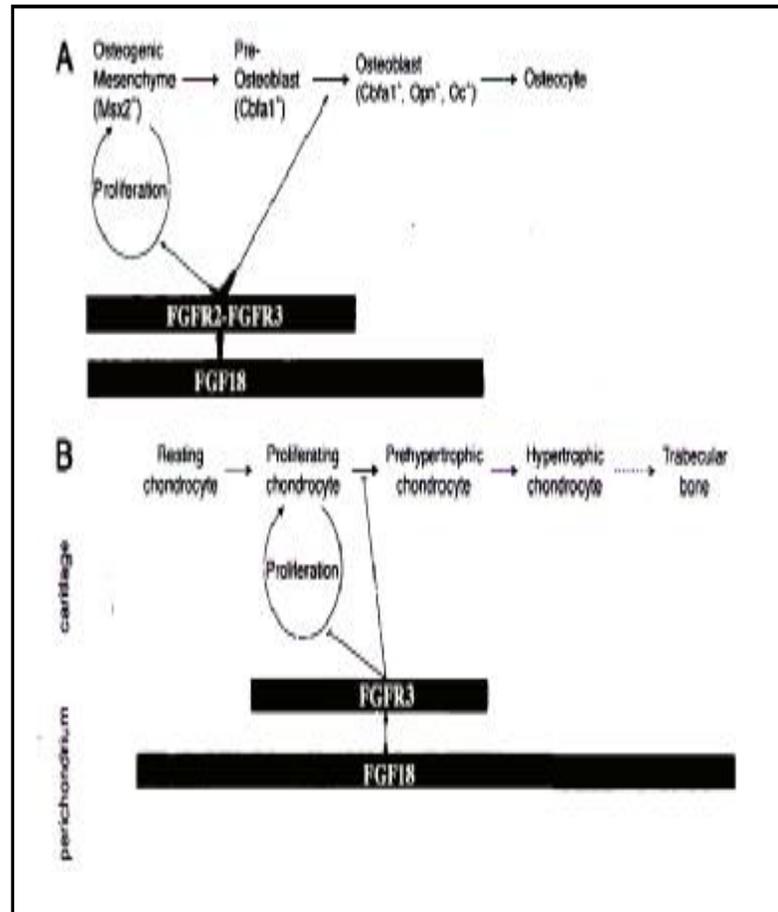


Figure 6. Schéma représentatif de l'expression des gènes au cours de l'ostéogenèse et la chondrogenèse (d'après Ohbayashi et coll., 2002).

(A) : Lors de l'ostéogenèse du calvaria, les cellules mésenchymateuses caractérisées par l'expression de Msx-2, se différencient en pré-ostéoblastes exprimant Cbfa-1 (Runx-2), puis en pré-ostéoblastes exprimant Cbfa-1 (Runx), ostéopontine et ostéocalcine. L'expression de ces gènes est régulée positivement par le facteur de croissance FGF-18 et leur récepteurs (R2FGF et R3FGF). (B) : Au cours de la chondrogenèse des os longs, le facteur FGF18 régule négativement la prolifération et la différenciation des chondrocytes. Ce facteur intervient dans l'expression des gènes impliqués dans la zone proliférative, la zone hypertrophique et la zone d'invasion vasculaire.

***Troisième étape. Vascularisation, résorption des modèles cartilagineux et ostéogenèse.**

A ce stade de la squelettogenèse, les os en formation peuvent être identifiés par une juxtaposition en miroir des deux plaques de croissance. Au fur et à mesure du développement, ces structures régressent vers les deux extrémités de l'os futur, jusqu'à n'occuper qu'une région très restreinte. Ces deux zones cartilagineuses seront responsables de la croissance longitudinale des os en période post-natale. Elles se résorbent à la puberté, entraînant l'arrêt de la croissance. Lorsque la maturation est achevée, les chondrocytes hypertrophiques sont encastrés dans une matrice enrichie en CoX. En outre, il a été identifié un élément important, lié au programme génétique des chondrocytes hypertrophiques et à la capacité de ces chondrocytes à sécréter, le facteur VEGF (vascular endothelial growth factor). Récemment, il a été mis en évidence que le VEGF est un puissant facteur angiogénique dont l'expression dans les chondrocytes hypertrophiques est sous le contrôle de Runx-2. Sans son activité, la formation des os va être perturbée, les ostéoblastes n'exprimant pas le R-VEGF : leur migration par chimiotactisme de la virole osseuse vers le centre où se trouvent les chondrocytes hypertrophiques sécrétant le VEGF, est perturbée. En l'absence de vascularisation, la migration des ostéoclastes, dont le précurseur est d'origine myéloïde, ne peut se faire et par conséquent, la matrice cartilagineuse calcifiée déposée par les chondrocytes hypertrophiques ne pourra être digérée afin d'être remplacée par une matrice osseuse synthétisée par les ostéoblastes (Ducy, 2001) (**Figure 7**).

4. Le tissu osseux

Le tissu osseux, un des tissus minéralisés, composé de cellules (ostéoblastes, ostéoclastes, ostéocytes et cellules bordantes) et d'une matrice extra-cellulaire est construit autour d'une trame de fibres de collagène de type I qui se minéralise. C'est un tissu complexe et dynamique qui se remodèle et se répare tout au long de la vie. Le tissu osseux assure trois fonctions principales : une fonction mécanique assurant le support du poids de l'organisme, une fonction de protection des organes essentiels (le cœur, le cerveau, les poumons) et une fonction métabolique de régulation et de stockage des minéraux, en particulier le calcium et le phosphate.

***Développement du calvaria de rat**

Le développement du complexe des os cranio-faciaux est un processus qui débute très tôt au cours de l'embryogenèse et s'achève à l'adolescence. Chez l'homme, le point final de croissance de la voûte du crâne est déterminé par une fusion des os pendant la 3^{ème} décennie de la vie (30 ans). En revanche, le complexe des os faciaux reste séparé par un tissu fibreux jusqu'à la 6-7^{ème} décennie (70 ans). Les sutures crâniennes sont des tissus fibreux qui associent tous les os du crâne, sites

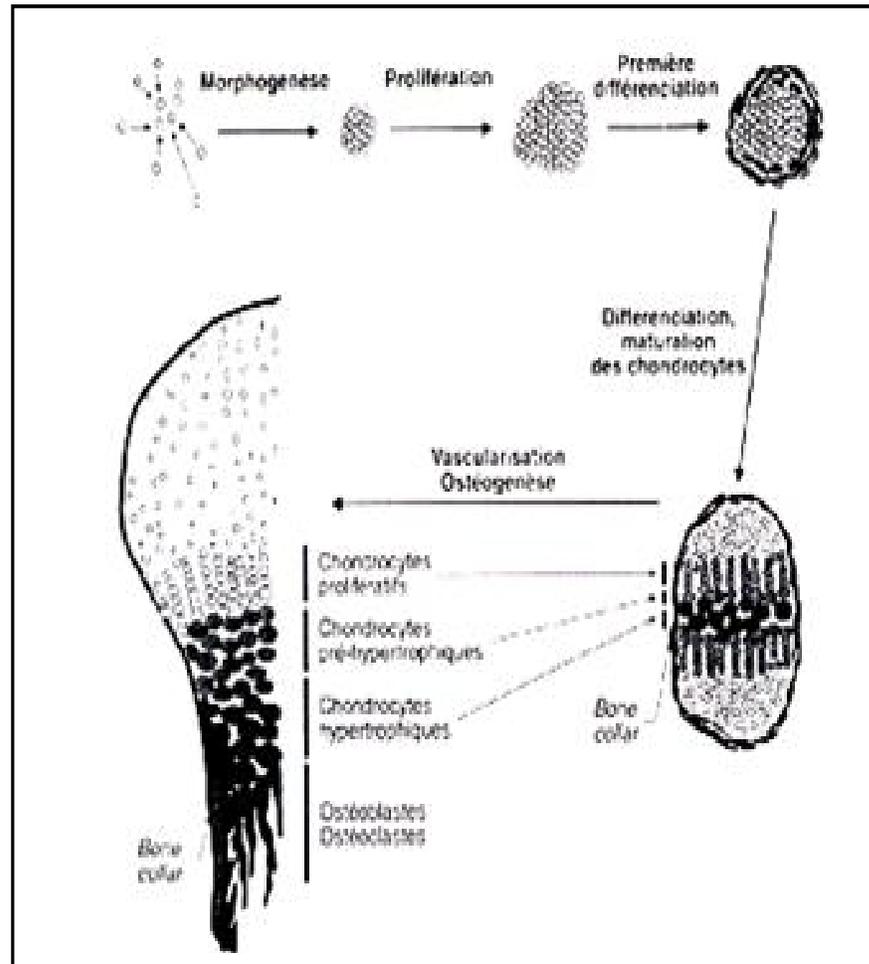


Figure 7. Représentation schématique des différentes étapes de l'ossification endochondrale (d'après Ducey, 2001).

Des cellules indifférenciées migrent et forment des condensations à l'origine de chaque élément squelettique. Après une phase de prolifération, les cellules des condensations subissent une première différenciation. Les cellules situées en périphérie s'aplatissent et s'organisent en une multicouche qui sera à l'origine de la virole osseuse, celles situées au centre se différencient en chondrocytes synthétisant la MEC cartilagineuse. Une seconde phase de différenciation suit, au cours de laquelle les chondrocytes deviennent prolifératifs puis hypertrophiques, puis apoptotiques. Sous l'influence de facteurs sécrétés par les chondrocytes matures, les ostéoprogéniteurs de la virole osseuse se différencient en ostéoblastes et pénètrent au niveau de la zone hypertrophique en même temps que celle-ci est vascularisée. Les ostéoclastes dont les progéniteurs sont amenés par la circulation sanguine, résorbent la matrice cartilagineuse qui est alors remplacée par une matrice osseuse déposée par les ostéoblastes différenciés.

majeurs de la croissance osseuse, en particulier pendant la période de l'expansion rapide du neurocrane. Donc, il est indispensable que ces sutures restent indifférenciées afin de permettre la formation des os (Opperman, 2000).

La détermination morphologique du calvaria comporte deux processus : la prolifération et l'ostéogenèse dans les tissus craniens. Au cours de l'ossification de chaque os du calvaria, les sutures le séparent des os adjacents. Pendant la période de croissance, les os du calvaria continuent à croître jusqu'à ce qu'ils atteignent leur forme définitive. Au cours du développement de l'os calvarien chez le rat, on peut distinguer trois phases : 1°) la phase précoce, analogue à celle de l'homme, contient une période d'histodifférenciation ; 2°) la phase de croissance, où l'ostéogenèse est activée sur toutes les surfaces de l'os, et 3°) la phase définitive où l'os atteint sa forme définitive, l'activité ostéogénique n'est pas limitée et la réorganisation de l'os continue (Moss, 1954).

Au cours du développement du calvaria de souris, des facteurs de croissance et des facteurs de transcription sont impliqués assurant la prolifération et la différenciation des ostéoblastes.

***Les cellules**

Il existe deux grands types de cellules osseuses : les cellules de surface comprenant des cellules actives (ostéoblastes et ostéoclastes) et des cellules à activité réduite (les cellules bordantes et les cellules au repos) et les cellules internes à l'os (ostéocytes) (Néfussi, 1998).

Les **ostéoblastes** dérivent des cellules souches mésenchymateuses non-migratoires appelées cellules ostéoprogénitrices. Ce sont des cellules mononucléées, situées à la surface du tissu osseux, et dont l'activité essentielle est la formation osseuse (Néfussi, 1998). Ces cellules ostéoprogénitrices, lors de leur engagement dans le processus de l'ostéogenèse, vont proliférer et donner des préostéoblastes qui, après arrêt de la multiplication cellulaire, vont se différencier en ostéoblastes différenciés en acquérant des caractéristiques phénotypiques spécifiques. Ce sont des cellules allongées, qui ont la capacité de se diviser et qui possèdent une activité phosphatase alcaline réduite. Les ostéoblastes différenciés expriment alors des marqueurs tardifs de la différenciation (ostéocalcine, sialoprotéine osseuse). Les cellules ostéoblastiques sont jointives et communicantes (système gap jonction) et fonctionnent en groupes, appelés ostéons (Blair et coll., 2002).

Les **ostéoclastes** sont des cellules volumineuses et multinucléées (2 à 10 noyaux) d'origine hématopoïétique. Leur cytoplasme est riche en vacuoles et mitochondries rendant compte d'une activité métabolique intense. Les précurseurs de l'ostéoclaste appartiennent aux lignées myéloïdes et dérivent des promonocytes. La différenciation des ostéoclastes nécessite des interactions avec des cellules stromales (population dont sont issus les ostéoblastes) et des facteurs extracellulaires (Teitelbaum, 2000). La partie active de l'ostéoclaste est composée d'une bordure en brosse,

structure différenciée de la membrane plasmique en regard de la surface osseuse. C'est au niveau de cette bordure en brosse qui forme un espace clos entre l'ostéoclaste et la matrice, que se réalise la décalcification osseuse par solubilisation du calcium due à l'acidification du pH du compartiment isolé du tissu osseux grâce à la bordure en brosse. Ensuite, l'ostéoclaste va libérer des enzymes lysosomales et des métalloprotéinases dans le compartiment de résorption, collagénase de type I et IV (MMP-9) (Roodman, 1996).

Les **ostéocytes** sont des cellules mononucléées, situées dans une matrice organique minéralisée synthétisée par les ostéoblastes, à l'intérieur de logettes nommées ostéoplastes. Ces cellules présentent des prolongements cytoplasmiques qui leur permettent de communiquer les unes avec les autres, mais aussi avec les cellules de surface (ostéoblastes et ostéoclastes) par des jonctions de type Gap (Ten Cape, 1989).

Les **cellules de surface**, à activité réduite, recouvrent pratiquement 80% des surfaces osseuses. Seulement 20% de ces surfaces sont recouvertes par des ostéoblastes actifs et 0,5% par des ostéoclastes. Les cellules bordantes ont comme fonction principale la régulation et le maintien de la concentration ionique de calcium du fluide extracellulaire osseux (Parfitt, 1977). Les cellules en repos sont considérées comme des ostéoblastes qui sont inactifs mais leur fonction est peu connue.

***La matrice**

Lors de l'ossification membraneuse, les cellules mésenchymateuses prolifèrent et se condensent en nodules. Certaines de ces cellules forment des capillaires et d'autres, des ostéoblastes sécrétant la matrice osseuse. La matrice peut s'ossifier par fixation de sels de calcium apportés par les capillaires (ostéogenèse par ossification membraneuse) (Couly et coll., 1993). Chez le rat, au cours du développement, l'os calvarien synthétise des composants collagéniques et non-collagéniques. Au 16-17^{ème} jour de gestation, la fibronectine est produite par les préostéoblastes. L'expression du Co I, de l'ostéonectine, de la sialoprotéine osseuse et de la PAL est détectée au 17^{ème} jour, avec un pic de sialoprotéine et de PAL au 21^{ème} jour de gestation. L'expression de l'ostéocalcine et de l'ostéopontine (marqueurs fonctionnels et tardifs de la différenciation) dans le calvaria de fœtus de rat sont concomitants au processus de minéralisation au 19^{ème}-20^{ème} jour de gestation (Cowles et coll., 1998). La fonction essentielle de l'ostéoblaste différencié est de participer à la minéralisation de la matrice osseuse, ce processus nécessite un dépôt minéral de calcium et de phosphate. Le transfert des ions calcium et phosphate du milieu extracellulaire au site

de nucléation présent dans le collagène se fait à la fois par diffusion passive ou par transfert actif grâce à des pompes à calcium présentes dans la membrane des ostéoblastes. Le transfert actif du phosphate se fait par l'intermédiaire du système de transport de phosphate dépendant du sodium (Marie, 2001).

***Cycle de remodelage**

Le cycle de remodelage débute par une phase d'activation, caractérisée par la différenciation des ostéoclastes, suivie d'une phase de résorption de la matrice par les ostéoclastes matures. A la suite de cette phase, les ostéoclastes se détachent, les précurseurs des ostéoblastes se différencient en pré-ostéoblastes puis en ostéoblastes matures qui synthétisent et déposent une nouvelle matrice qui comble la lacune de résorption (Marie, 2001) (**Figure 8**).

***Contrôle génétique de l'ossification membraneuse**

L'ostéogenèse est caractérisée par l'engagement et la prolifération des cellules ostéoprogénitrices qui vont se différencier en ostéoblastes fonctionnels chargés de la synthèse et de la minéralisation de la matrice osseuse. La compréhension du contrôle transcriptionnel de la différenciation des ostéoblastes et des chondrocytes, reste incomplète et se fonde sur la culture cellulaire, sur les mutations humaines et sur l'étude de souris transgéniques.

Plusieurs facteurs de croissance, récepteurs et facteurs de transcription ont été identifiés comme étant impliqués dans le contrôle de l'ostéogenèse et la chondrogenèse comme Runx-2, Sox-9, Dlx-5, Osx (osterix), Msx-2 pour les facteurs de transcriptions, IGF-1, FGF, BMP pour les facteurs de croissance. Alternativement, le facteur Runx-2 joue un rôle clé dans l'ossifications membraneuse. Ce facteur intervient, à la fois lors de la morphogenèse et de la différenciation terminale de l'os. Chez la souris, son absence bloque la différenciation ostéoblastique au niveau du crâne, elle cause la persistance de la structure membranaire formée par les condensations mésenchymateuses jusqu'à la naissance, période au cours de laquelle les mutants homozygotes meurent (Ducy, 2000). Runx-2 peut initier la transcription ciblée dans le squelette de plusieurs gènes, par exemple, l'ostéocalcine, l'ostéopontine et le Co I (Banerjee et coll., 1996). Osterix (Osx), est une protéine qui semble être aussi impliquée dans le contrôle de l'ostéogenèse. L'annulation fonctionnelle d'Osx provoque la formation d'un squelette entièrement cartilagineux, sans ostéoblaste ni matrice minéralisée (Nakashima et coll., 2002). A la différence des souris mutantes du gène Runx-2^{-/-}, les souris Osx^{-/-} présentent un cartilage normal, avec des cellules de chondrocytes hypertrophiques.

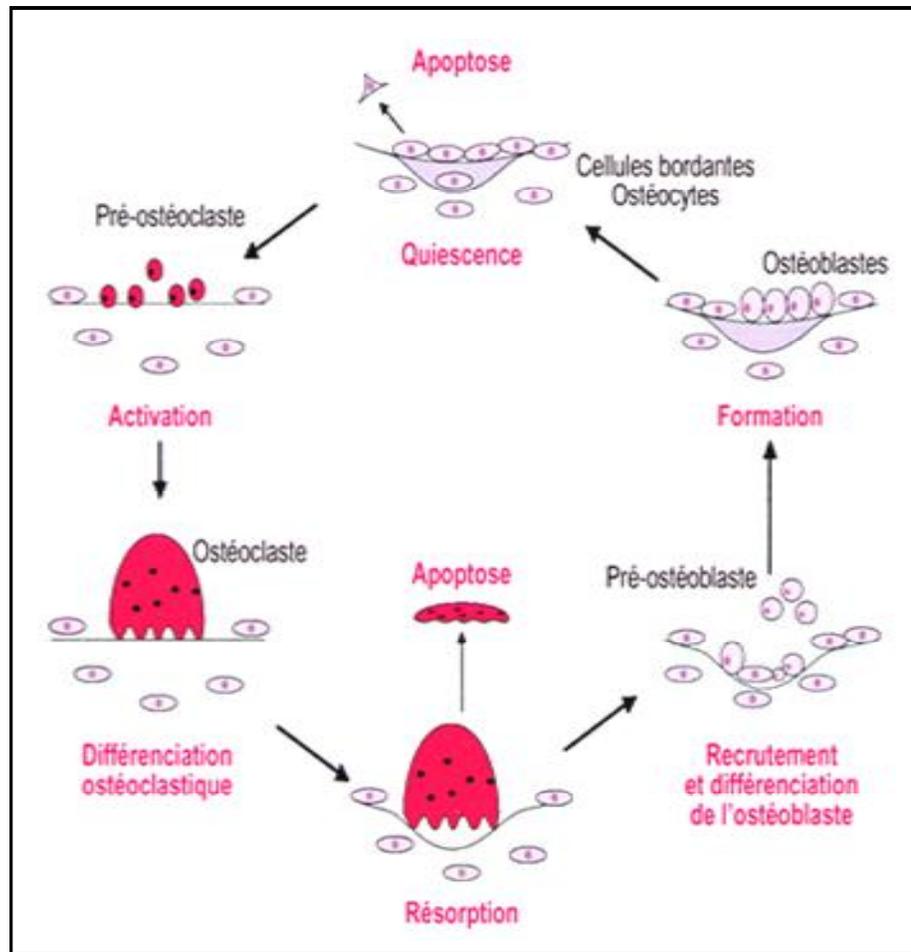


Figure 8. Place de l'ostéoblaste au cours du cycle de remodelage osseux (d'après Ducey, 2001).

Le cycle de remodelage débute par une phase d'activation, caractérisée par la différenciation des ostéoclastes, suivie d'une phase de résorption de la matrice par les ostéoclastes. A la suite de cette phase, les ostéoclastes se détachent et meurent par apoptose, puis les précurseurs des ostéoblastes se différencient en pré-ostéoblastes puis en ostéoblastes qui synthétisent une nouvelle matrice comblant la lacune de résorption. A la fin de cette phase de formation, les ostéoblastes deviennent des cellules bordantes qui subissent un phénomène d'apoptose ou sont incluses dans la matrice en devenant des ostéocytes.

Chez ces souris, les précurseurs des ostéoblastes expriment les marqueurs chondrocytaires tels que Sox-9 et le Co II et expriment aussi Runx-2 alors que les souris présentant une invalidation fonctionnelle du gène de Runx-2 n'expriment pas Osx. Ainsi, Osx agirait en amont de Runx, qui lui-même induit la différenciation ostéoblastique dans les cellules précurseurs ostéoblastiques et chondrocytaires (**Figure 9**). D'autres études ont montré que Dlx-5 et Msx-2 sont essentiels pour l'ossification membraneuse normale, ils régulent l'expression des marqueurs de minéralisation des ostéoblastes comme l'ostéocalcine (différenciation terminale) (Liu et coll., 1999).

Dans le cas de l'ossification membraneuse, il existe une difficulté de classification de tous les phénotypes et des régulateurs correspondants (régulateurs morphologiques ou différenciateurs). L'étude de plusieurs maladies génétiques humaines présentant l'une ou autre de ces anomalies a permis l'identification des facteurs contrôlant ce processus (Ducy, 2001).

B - LES REGULATEURS DE LA DIFFERENCIATION DES TISSUS MINERALISES

Les ostéoblastes et les chondrocytes proviennent d'une lignée progénitrice commune : les cellules souches pluripotentes. La différenciation des tissus minéralisés est sous le contrôle des interactions cellulaires et matricielles, des hormones, des facteurs locaux et des facteurs de transcription.

Les interactions cellulaires jouent un rôle essentiel dans la différenciation terminale des cellules squelettiques cranio-faciales (cartilage et os). Par exemple, les molécules d'adhésion intercellulaire tels que la N-cadhérine sont impliquées dans l'induction des gènes de différenciation, comme Runx-2 (Marie, 2001).

De plus, *des facteurs solubles* sécrétés par les ostéoblastes et leurs précurseurs ont un rôle important dans la communication cellulaire à distance tels que RANKL (receptor activator of NF- κ B) et des cytokines M-CSF (macrophage colony-stimulant factor), TNF α (tumour necrosis factor), IL1, IL6 et IL11 (interleukin). La différenciation des ostéoblastes est régulée aussi par des facteurs sécrétés localement : les BMP et la famille des gènes hedgehog (Yamaguchi et coll., 2000). La séquence RGD dans les **protéines matricielles** synthétisées par les ostéoblastes (fibronectine, collagène, ostéopontine et sialoprotéine) reconnue par les intégrines, permettant l'adhérence des cellules osseuses à la matrice, joue aussi un rôle important dans la différenciation ostéoblastique (Franceschi et coll., 1999). Les protéoglycanes, dont certains (biglycanes, décorine) sont inclus dans la matrice interviennent dans l'induction de la masse osseuse.

D'autre part, *des hormones* comme la vitamine D (Vit. D), la PTH (parathyroid hormone)..., font partie des régulateurs de la différenciation des tissus minéralisés, en particulier les glucocorticoïdes (GC).

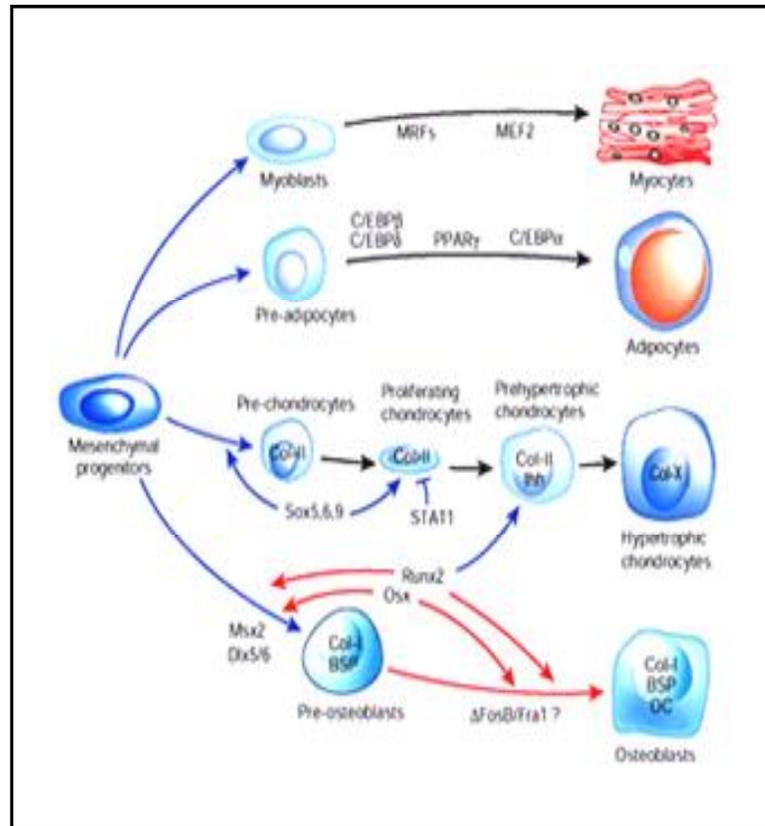


Figure 9. Représentation du mécanisme de régulation de la différenciation ostéoblastique et chondrocytaire (d'après Harada et Rodan, 2003).

Les ostéoblastes se différencient à partir de cellules progénitrices mésenchymateuses dont sont issues les cellules chondrocytaires sous le contrôle de Sox-5, -6 et -9 et STAT1. Runx-2 est essentiel pour la différenciation des ostéoblastes et des chondrocytes. Ostérix (Osx) agit comme précurseur de Runx-2 pour induire la maturation des ostéoblastes qui exprimeront les marqueurs spécifiques, tel que l'ostéocalcine. Runx-2 : facteur de transcription à domaine runt ; Col-I, -II, -X : collagène de type I, II, X; Ihh : indian hedgehog ; BSP : bone sialoprotéine ; OC : ostéocalcine ; STAT1 : transducteurs de signal et activateur de transcription-1.

1. Les glucocorticoïdes et la squelettogenèse cranio-faciale

Au cours du développement craniofacial chez le rat, le pic de glucocorticoïdes en fin de gestation pourrait intervenir dans la mise en place des premiers centres d'ossification des structures craniennes tels que le septum nasal et le calvaria. Cette hypothèse de travail nous a permis de décrypter différents modes d'action de cette hormone lors de la différenciation terminale de ces structures oro-faciales. Les glucocorticoïdes auxquels nous nous sommes intéressés ont de multiples et de complexes effets sur les chondroblastes et les ostéoblastes dans différents modèles étudiés.

1.1. Rôle physiologique des GC au stade fœtal chez les mammifères

Au cours de la *dernière période* du développement embryonnaire chez les vertébrés (mammifères, oiseaux et amphibiens), un événement commun a lieu chez toutes ces espèces, c'est l'activation de l'axe hypothalamo-hypophysé-surrénalien (HPA) qui induit la maturation des glandes surrénales et thyroïdiennes (période transitoire et préparatoire pour une vie extra-utérine) ; par conséquent, à la fin de la gestation, le fœtus est capable de sécréter ses propres GC et hormones thyroïdiennes, contrairement au début du développement où ces hormones sont d'origine maternelle (Whittle et coll., 2001 ; Shepherdley et coll., 2002). La sécrétion des GC augmente 10-15 jours avant la naissance chez le mouton, 5 jours chez le rat et à 34 semaines de gestation chez l'homme (Brosnan, 2001). Les GC induisent la maturation de plusieurs organes fœtaux comme les poumons, le foie, la vessie et l'intestin. En outre, chez l'homme et le mouton, dont la période de gestation est longue, l'action du cortisol est très similaire et comparable concernant la modification de la stéroïdogénèse au niveau de l'utérus. Il diminue le taux de progestérone et augmente le taux de l'estradiol et des prostaglandines, induisant une cascade de contractions du myomérium qui initie la naissance du fœtus (Whittle et coll., 2001).

L'activation de l'axe HPA chez l'homme et les autres mammifères, est essentielle pour la croissance et la différenciation des différents organes et s'effectue avant la naissance. Chez l'homme, la maturation des glandes surrénales fœtales nécessite l'activation de l'hormone CRH (corticotropin releasing hormone) sécrétée par l'hypothalamus visible anatomiquement à 7 semaines. La CRH est présente à 10 semaines et identifiée à 16 semaines (4 mois). A 12 semaines, les connections vasculaires entre l'hypophyse et l'hypothalamus sont mises en place et le système vasculaire permet à la CRH de stimuler le peptide ACTH hypophysaire qui est sécrété à partir de 14 - 20 semaines (5 mois). Cette maturation nécessite un taux minimal de l'ACTH sérique équivalent à 1pg/ml qui augmente au cours de la gestation. Chez le fœtus humain, l'activation fonctionnelle des glandes surrénales se fait en milieu de gestation avec un taux d'ACTH équivalent à 250 pg/ml, ce taux diminue à 34 semaines (8 mois) en même temps que le cortisol augmente (Brasnon, 2001). Les glandes surrénales sécrètent le cortisol (0.7 mg/ml/jour) à partir du 2^{ème} trimestre de la grossesse,

tandis que ce taux augmente au cours du 3^{ème} trimestre jusqu'à 3-5 mg/ml/jour et devient constant chez l'adulte à 7 mg/ml. Le placenta et les tissus fœtaux possèdent à partir de 6- 8 semaines une enzyme la **11-hydroxystéroïde déhydrogénase 2 (11-HSD2)** qui oxyde le cortisol en une forme inactive : la cortisone. Le taux fœtal de la cortisone est 5 fois plus élevé que celui du cortisol chez l'homme, **le rat** et la souris. Il a été montré qu' *in vivo*, chez le rat, un blocage de l'activité enzymatique de la 11-HSD2 se fait par une exposition à la dexaméthasone (Brasnon, 2001), ce qui laisse à penser qu'en fin de gestation l'augmentation de cortisol diminue l'activité de la 11-HSD2. L'élévation des glucocorticoïdes actifs circulants participent à la maturation des organes vitaux du fœtus et à la préparation à l'accouchement par une synthèse active des prostaglandines placentaires (des molécules qui changent la stéroïdogénèse) au niveau de l'utérus (Brasnon, 2001).

1.2. Rôle des GC dans le développement des tissus cartilagineux

La sphère orofaciale est un ensemble très complexe composé de différents types cellulaires comme les ostéoblastes, les chondrocytes, les odontoblastes, les adipocytes et les cellules musculaires. Le développement de l'os et du cartilage est contrôlé hormonalement par des hormones stéroïdiennes et non stéroïdiennes. L'importance de ces hormones a été vérifiée chez des souris transgéniques mutées pour les récepteurs stéroïdiens (Bland, 2000) et dans différents systèmes *in vitro*, en particulier le rôle des GC lors la biominéralisation.

Les GC agissent sur le cartilage de croissance d'une façon **indirecte ou directe**. Ils peuvent intervenir avec l'axe GH-IGF-I au niveau de l'hypothalamus, de l'hypophyse ou au niveau des organes-cible en affectant la sécrétion hormonale, l'abondance des R-GH , la voie de signalisation, la transcription, l'épissage de pré-ARNm et la traduction des ARNm matures (Hochberg, 2002). De plus, différents systèmes chondrocytaires *in vitro* ont confirmé l'effet direct des GC en concentration physiologique favorisant l'expression des gènes du phénotype cartilagineux et la maintenance de l'intégrité de la MEC du cartilage (Kato et Gospodarowicz, 1985 ; Takano et coll., 1985 ; Horton et coll., 1988 ; Bellows et coll., 1989 ; Grigoriadis et coll., 1989 ; Nadra et coll., 2003).

D'autre part, les GC régulent l'expression des différents composants du système **IGF/IGFBP** dans la circulation (Rooman et coll., 1999) et dans les chondrocytes *in vitro* (Koedam et coll., 2000 ; Nadra et coll., 2003). Dans le cartilage de croissance de souris (post-natal), les IGF-I et -II et les ARNm des IGFBP-2 sont détectés dans les zones prolifératives et hypertrophiques. Cette étude a mis en évidence que le traitement des animaux par la Dexaméthasone pour une longue durée diminue le nombre des chondrocytes exprimant l'IGF-1, alors que les chondrocytes exprimant l'IGF-II et IGFBP-2 ne sont pas affectés. Cela suggère que les GC modifient la concentration des IGF-I sécrétés et induisent un retard de croissance (Smink et coll., 2003).

1.3. Rôle des GC dans le développement des tissus osseux

Les glucocorticoïdes jouent un rôle primordial dans le contrôle du processus de la minéralisation au cours du développement fœtal. Chez la souris, les GC jouent un rôle important dans le développement du palais et du foie où les récepteurs aux GC sont détectables à partir du 10^{ème} jour de gestation (Ghosh et coll., 2000). De plus, il a été confirmé que l'administration de GC en forte dose chez les rattes et les souris gestantes induit une fente palatine chez les nouveaux-nés (Abbott et coll., 1994). Il a été démontré dans le calvaria de fœtus du rat que les GC en concentration physiologique induisent l'expression des gènes de prolifération et de différenciation (Shaloub et coll., 1992 ; Stein et coll., 1993). Ils améliorent la formation de nodules osseux, la synthèse des composants collagéniques et non collagéniques de la MEC tels que le collagène type I (Co I), la phosphatase alcaline (PAL) et l'ostéocalcine (OC) (Canalis, 1983 ; Bellows et coll., 1987 ; 1989 ; Ishida et coll., 1995 ; Shaloub et coll., 1998). Des études réalisées *in vitro* chez l'homme, le rat et la souris ont prouvé que les effets différenciants des GC sont dépendants de la dose, la durée d'exposition, l'âge du donneur et le type d'hormone utilisé. Bellows (1998) a montré que les effets des GC est dépendant de l'espèce, par exemple, les GC (1-1000 nM) peuvent inhiber la prolifération et la différenciation des cellules progénitrices ostéoblastiques de la souris, mais pas celles du rat. Ces résultats ont été confirmés par une réduction de l'activité des ostéoblastes telle que la PAL, l'ostéocalcine, le CoI et l'accumulation de Ca⁺⁺ dans la MEC (Lian et coll., 1997). Des études réalisées *in vitro* et *in vivo* (prélèvement de calvaria après une injection des GC ou lignée de calvaria chez la souris) montrent que les GC en concentration physiologique augmentent l'expression du gène **PHEX** exprimé à la membrane plasmique des ostéoblastes matures et des ostéocytes. Le rôle physiologique de ce gène n'est pas complètement défini, mais il est probable que le gène PHEX soit impliqué dans l'homéostasie et la biominéralisation de l'os (Hines et coll., 2002) (**Tableau 1**).

En effet, chez le fœtus de rat en fin gestation, les GC pourraient réguler la biominéralisation du calvaria en agissant d'une part, sur les gènes de phénotype osseux et d'autre part, sur les homéogènes Msx et Dlx et le gène maître Runx-2. Comme le rat est un animal proche de l'homme, c'est un bon modèle pour étudier les effets des GC en concentration physiologique sur le développement du calvaria pendant le dernier tiers de gestation du fœtus du rat *in vitro* et *in vivo*.

Effet génomique des glucocorticoïdes (GC)			
Type cellulaire étudié <i>in Vitro</i>	Concentration GC/durée d'exposition	Effet	Auteurs
Os pariétal de foetus de rat j 22	0,1-1 μ M pendant 24-48 h	- ARNm des RIGF-II	(Canalis, 95)
ROB foetaux et OB humain		- ARNm et protéine collagène I	(Delany et coll., 94)
ROB foetaux 19-20 j	100 nM pendant 48 h	- Ostéocalcine	(Chen, 86)
ROB foetaux 21 j	100 nM pendant 24, 48 et 72 h en présence de 10 nM IGF-I	- Collagène I	(Kream, 90)
ROB foetaux 19-20 j	0,1-130 nM pendant 48-72 h	- RIGF-I	(Bennett, 84)
ROB foetaux j 22	0,1-1 μ M pendant 24-48 h	- ARNm IGF-II	(Canalis, 95)
ROB foetaux j 19-20 Rat Tibia	10-100 nM pendant 48 h	- ARNm et synthèse IGF-1	(Chen, 91)
ROB foetaux j 22		- ARNm IGF-I	(Canalis, 95)
ROB foetaux	\downarrow ARNm TGF β		(Centrella et coll., 91)
ROB foetaux j 21	10-100 nM pendant 24-48 h	- IGF-II	(Canalis, 91)
Os humain	100 nM	- ALP	(Cheng, 94)
ROB foetaux		- ALP	(Bellows, 87)
Mandibule de rat	100 nM en continu	- ALP	(Abé, 2000)
ROB foetaux	10-100 nM pendant 24-48 h	- Collagène I contrôle ARNm c-fos module ARNm BMP2 et BMP6	(Gronowicz et coll., 94) (Grigoriadis et coll., 93) (Sakou, 98)
Ostéoblastes humains		Stimule les gènes d'apoptose	(Cooper, 99)
Ostéoblastes rat adulte	Prednisolone	Stimule les gènes d'apoptose	(Weinstein et coll., 98)
Effet non génomique de GC			
Cellule rénales de lapin	10^{-9} M pendant 30 min	Transport Pi	(Park, 2001)

Tableau 1. Effets des glucocorticoïdes sur les ostéoblastes de différentes espèces.

1.4. Biosynthèse et la physiologie des glucocorticoïdes

Les hormones stéroïdiennes dérivent du *choléstérol*, un composé fondamental dans la structure et la fonction des membranes biologiques. Les principales hormones stéroïdiennes sont les hormones corticosurréaliennes, les hormones sexuelles (progestérone, estrogènes et androgènes), les dérivés hormonaux de la vitamine D, les hormones thyroïdiennes et l'acide rétinolique. Les hormones corticosurréaliennes sont produites par les cellules situées dans la partie externe (le cortex) des glandes surrénales. Dans la *circulation*, les GC sont liées avec des protéines de liaison qui les transportent jusqu'aux cellules cibles. Ces hormones sont liposolubles et traversent facilement la membrane cellulaire dans la plupart des réponses physiologiques normales et pathologiques. Elles exercent leurs effets biologiques par l'intermédiaire des récepteurs intracellulaires en modulant positivement ou négativement la transcription des gènes cibles et en interagissant avec d'autres facteurs de transcription (Beato et Klug, 2000) (**Figure 10**).

Les GC ont tout d'abord été identifiés comme étant des *médiateurs* de la différenciation dans l'homéostasie et dans la réponse au stress et leur rôle est primordial dans le développement des vertébrés (Burnstein et Cidlowski, 1989). Chez les mammifères, les tissus cibles des GC sont nombreux : le foie (Menuelle et coll., 1999), la vessie, le cerveau, les glandes mammaires, les poumons, les reins, les glandes sexuelles (testicule, ovaire), l'utérus, l'os et le cartilage (O'Carroll et coll., 2003) (**Figure 11**).

Dans certaines *conditions pathologiques*, le traitement par les GC en concentration pharmacologique pour une longue durée induit des effets indésirables, par exemple, des perturbations cardiovasculaires, du système nerveux central, de l'homéostasie et de la fertilité (Falkenstein et coll., 2000). Cependant, des effets bénéfiques des GC ont été observés lors des traitements anti-inflammatoire et anti-cancéreux, ces effets sont médiés par les récepteurs aux GC (RG) activés via des mécanismes différents de celui induit par les GC en concentration physiologique. Les effets anti-inflammatoires des GC se produisent par une répression de la transcription des gènes impliqués dans l'inflammation, tels que les cytokines, les molécules d'adhésion et les enzymes. En revanche, l'action anti-cancéreuse des GC est due à une induction des gènes apoptotiques (Biola et Pallardy, 2000). L'ostéoporose, maladie caractérisée par une résorption et une suppression de la formation osseuse, est induite par une augmentation sérique des GC dont les mécanismes sont mal connus. Récemment, il a été montré chez des patients après une administration de GC, une augmentation de l'ostéoprotégérine (OPG), une cytokine qui provoque une inhibition de la différenciation ostéoblastique, une activation des ostéoclastes et une diminution du taux d'ostéocalcine dans le sérum (Sasaki et coll., 2001).

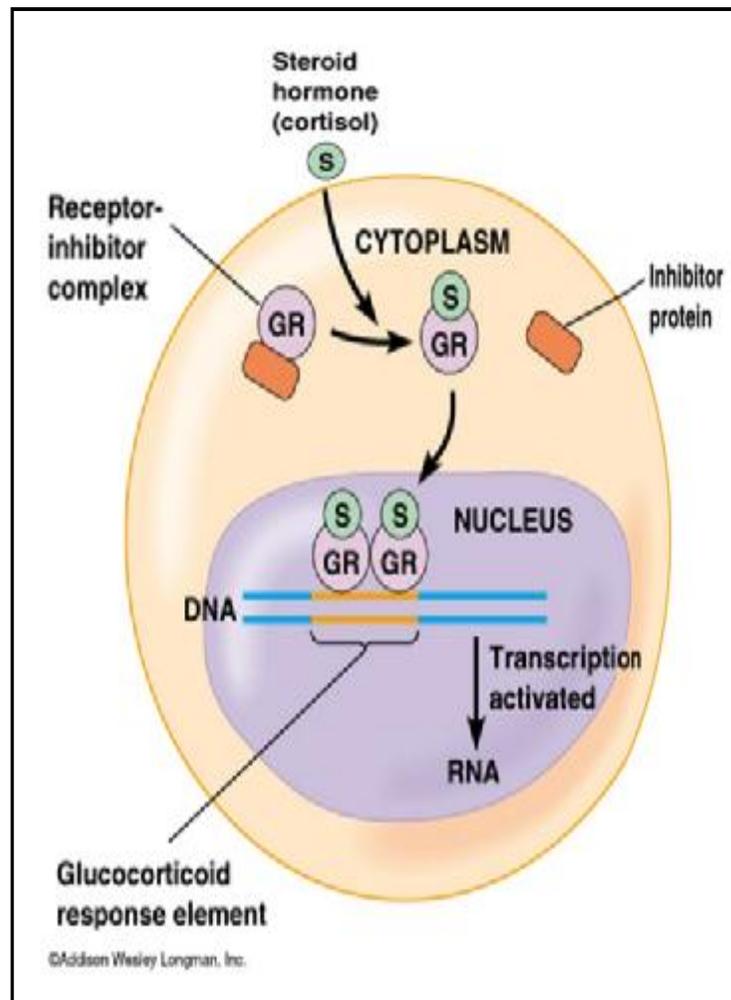


Figure 10. Voie génomique du cortisol.

Le cortisol entre dans la cellule cible par une diffusion simple, la présence de l'hormone dans le cytoplasme induit un changement conformationnel du complexe récepteur associé à des protéines chaperons. Puis, le récepteur forme avec l'hormone un complexe (H-R), ce complexe se dimérise et se "translocalise" dans le noyau. Suite à une interaction du complexe H-R avec le glucocorticoid response element (GRE) de l'ADN du gène cible, la transcription sera activée ou réprimée.

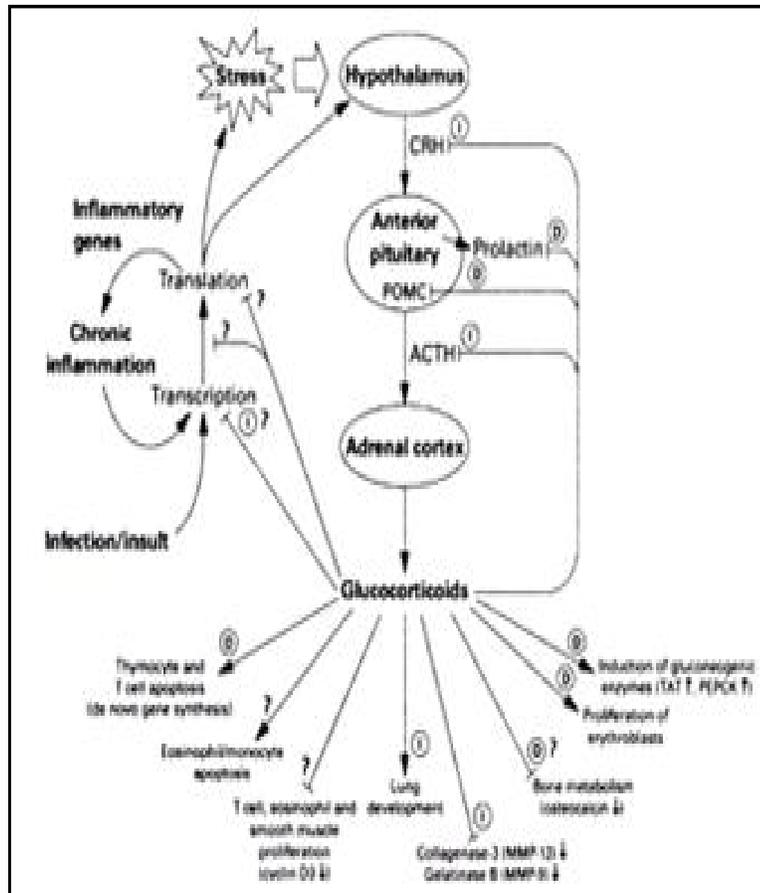


Figure 11. Rôles physiologiques des glucocorticoïdes dans les organes cibles (d'après Newton, 2000).

Les GC sont sécrétés par le cortex surrénalien, suite à une activation par les hormones peptidiques CRH et ACTH. Puis, les GC sont transportés par circulation sanguine grâce à leurs protéines de liaison jusqu'aux organes cibles. Au niveau de la cellule cible, les GC induisent de nombreuses réponses physiologiques, telles que la réponse au stress, la glycogénèse (foie), la prolifération des érythrocytes, la croissance des poumons et des muscles.

1.5. Modes d'action des glucocorticoïdes

Depuis 30 ans, les études se sont focalisées sur l'action génomique des hormones stéroïdiennes dans différentes réponses physiologiques. En effet, la caractérisation détaillée du *mécanisme de l'action* hormonale est intense depuis le début du 20^{ème} siècle. Les résultats obtenus montrent l'implication des GC au cours du développement embryonnaire et lors des différentes maladies associées. Chez les insectes, la réaction chromosomienne "the gonflement" est induite 2 h après l'injection du stéroïde ecdysone. Cette réaction a disparu après 24 h, suggérant une liaison entre l'hormone et le gène cible activé (Clever et Karlson, 1960). D'autre part, des actions stéroïdiennes non génomiques, très rapides, ont été montrées pour tous les groupes d'hormones stéroïdiennes (**Figure 12**).

***Action génomique des GC**

La théorie de l'action génomique des hormones stéroïdiennes, y compris les GC, est basée sur la modulation de la transcription des gènes cibles via l'interaction avec des récepteurs nucléaires agissant comme un complexe ligand-facteur de transcription. Ces récepteurs agissent par des mécanismes direct ou indirect (Biola et Pallardy, 2000). Ils régulent, après une homo ou hétérodimérisation du complexe récepteur-hormone (R-H), la transcription des gènes en organisant une interaction entre un élément de réponse aux glucocorticoïdes (GRE) et l'ADN. En outre, les RG activés peuvent interagir avec d'autres facteurs de transcription régulateurs, tels que c-jun, les répresseurs NF- κ B, les coactivateurs, le complexe TFIID et Stat 5 (signal transducers and activators of transcription) (Jenkins et coll., 2001 ; Webster et Cidlowski, 1999).

***Action non génomique des GC**

Les actions non génomiques des GC sont principalement caractérisées par leur sensibilité pour inhiber la transcription et la synthèse protéique, une action rapide de quelques secondes à quelques minutes. Ces effets rapides des GC sont probablement médiés par des récepteurs médiant les effets de concentrations pharmacologiques. Une théorie soutient la présence des récepteurs spécifiques à ces actions, plusieurs catégories de récepteurs ont été proposées, elles sembleraient être dépendantes du type de stéroïde, de la cellule, du tissu ou des espèces. Cependant, une cascade de signalisation commune implique une existence de seconds messagers tels que la PKC (proteïn kinase C), la PLC (phospholipase C), le cAMP et la MAP kinase (mitogen-activated protein kinase) (Engelbrecht et coll., 2003 ; Sutter Dub, 2002) (**Figure 13**).

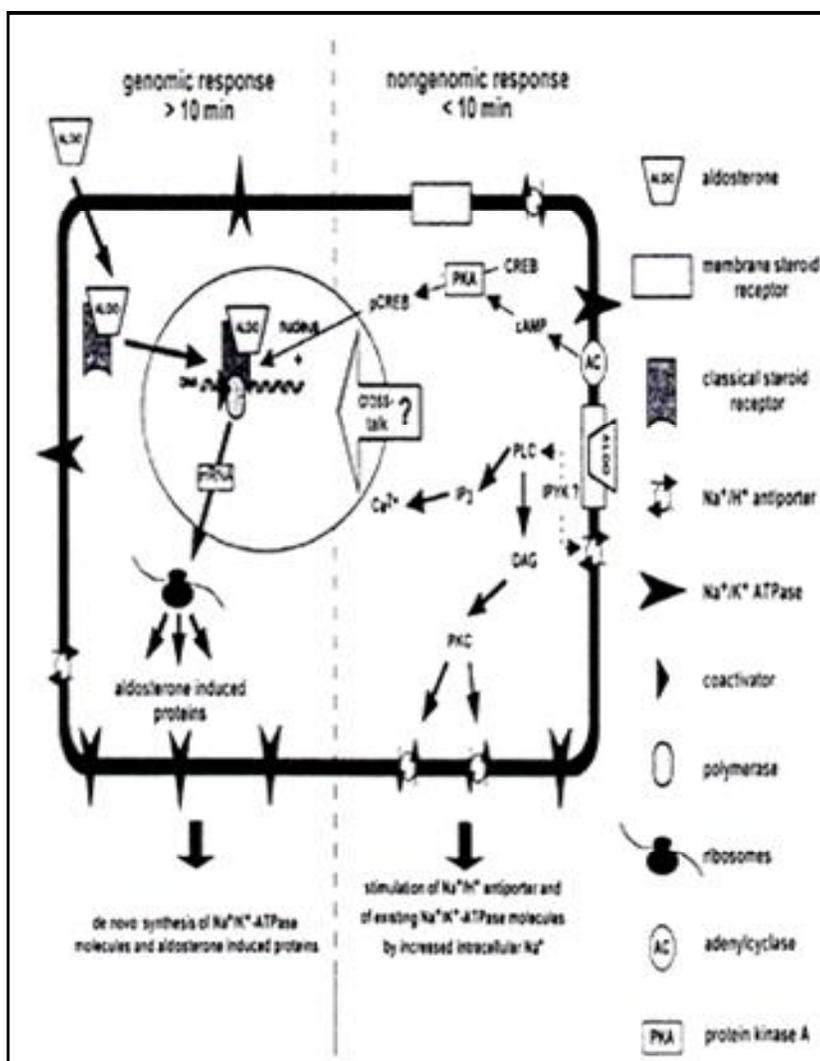


Figure 12. Schéma représentatif des actions génomiques et non génomiques des glucocorticoïdes (d'après Falkenstein et coll., 2000).

Dans la partie gauche du schéma, les GC exercent leurs actions génomiques par l'intermédiaire des récepteurs classiques (cytoplasmique ou nucléaire) et modulent l'expression des gènes cibles. Dans la partie droite du schéma, les GC exercent leurs effets biologiques par une voie rapide impliquant des récepteurs membranaires et des seconds messagers. Au niveau du cytoplasme, une modification des voies de signalisation génomiques des GC, peut se faire par une interaction avec des protéines kinases.

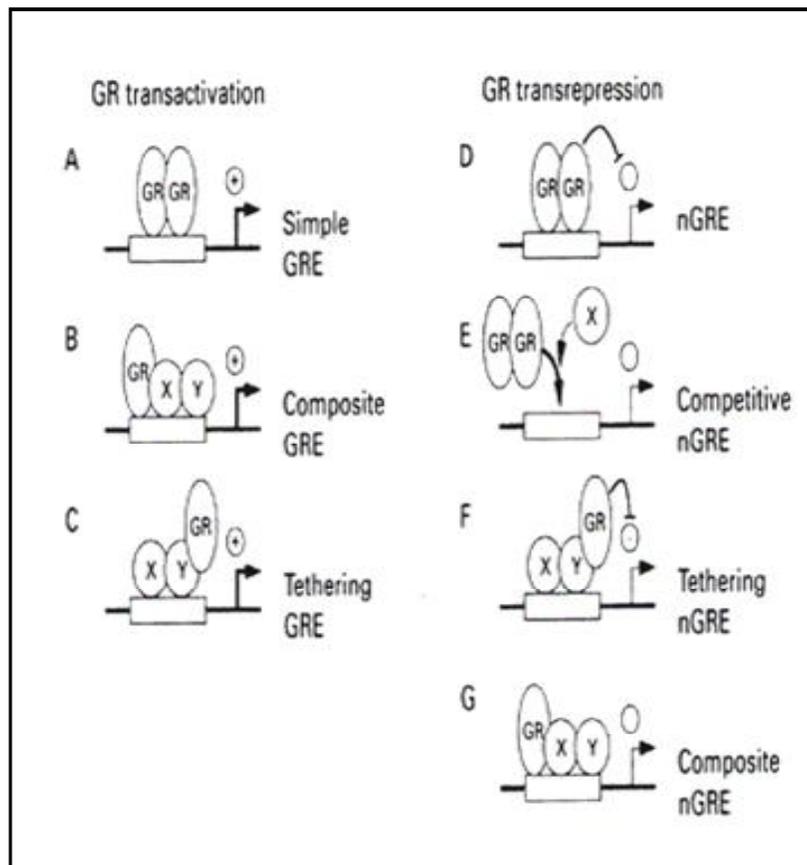


Figure 13. Modèles possibles de modulation de la transcription des gènes par les glucocorticoïdes (*d'après Newton, 2000*).

La partie gauche du schéma représente les trois possibilités de la transactivation du gène cible (A) : Les homodimères de RG interagissent avec le GRE. (B) : Interaction du RG avec des facteurs de transcription X et Y, l'ensemble interagit avec un GRE composé. (C) : L'interaction du RG et des facteurs X et Y nécessite seulement un site de liaison GRE propre à ces facteurs. La répression du gène cible est représentée dans la partie droite du schéma (D) : Les homodimères du RG répriment la transcription par une liaison simple avec le nGRE. (E) : Les homodimères du RG entrent en compétition avec les facteurs X et Y afin d'interagir avec nGRE. (F) : La répression de la transcription est due exclusivement à l'interaction des facteurs X et Y avec nGRE. (G) : le RG interagit avec nGRE en même temps que les facteurs X et Y via un site de liaison composé.

1.6. Les récepteurs des glucocorticoïdes

Les GC naturels et leurs dérivés synthétiques (dexaméthasone) agissent en se fixant sur le même récepteur aux GC (RG). Il appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires et intervient après son activation dans diverses réponses physiologiques. Chez le rat, le RG est exprimé de façon quasiubiquitaire dans les tissus. Cependant, ce récepteur est présent en faible quantité (10^3 à 10^4 molécules par cellule) mais, cela est compensé par sa forte affinité pour l'hormone ($k_d = 10^{-8}$ à 10^{-10} M) (Anker, 1995).

1.6.1. Récepteurs médiant les actions génomiques des GC

***Localisation des RG.** Bien que la localisation subcellulaire de la majorité des récepteurs stéroïdiens (récepteurs à la progestérone et aux oestrogènes, notamment) ait été montrée exclusivement dans le noyau indépendamment de la présence de l'hormone dans tous les types cellulaires étudiés, la localisation subcellulaire du RG demeure controversée. En l'absence de l'hormone, le RG peut être selon le type cellulaire, exclusivement cytoplasmique ou nucléaire, il pourrait être à la fois cytoplasmique et nucléaire ou bien interagir avec les microtubules cytoplasmiques (Anker, 1995).

***Structure.** Le récepteur des GC est cloné chez l'homme. Il existe deux isoformes, l'une est $RG\alpha$, protéine de 777 a.a (94 kDa) qui lie les GC et l'autre est $RG\beta$, plus courte (91 kDa) qui ne les lie pas. Les deux isoformes ont des fonctions différentes, par exemple le $RG\alpha$ assure une transactivation des gènes cibles. A l'heure actuelle, un seul gène RG code pour différentes isoformes $RG\alpha$ A et B, $RG\beta$ A et B régulées par 3 promoteurs. Les différentes isoformes identifiées des RG sont associées à la grande diversité des réponses aux GC (Yudt et Cidlowski, 2001). La séquence protéique primaire en a.a des différents récepteurs stéroïdiens est alignée sur la base de similarité maximale des régions en acides aminés (A, B, C, D et E). Structurellement, le RG est organisé en différents domaines : un domaine N-terminal très variable, un domaine de liaison avec l'ADN (DBD) très conservé, riche en cystéine et un domaine C-terminal présentant une région de liaison à l'hormone (LBD). Récemment, il a été compris qu'un changement conformationnel du domaine de liaison DBD du RG est nécessaire à la liaison avec le GRE et au passage du RG de la forme inactive à la forme active (Stockner et coll., 2003) (**Figure 14**).

***Activation des RG.** Les GC sont des molécules lipophiliques qui entrent dans la cellule par une diffusion simple. En absence d'hormone, les récepteurs des GC sont inclus dans un large complexe hétéromérique d'un poids moléculaire voisin de 300 kD. En présence des GC, le récepteur est activé et l'analyse montre que le RG interagit avec plusieurs protéines cytosoliques appelées "protéines chaperons", telles que les protéines de choc thermique Hsp90, Hsp60 et les

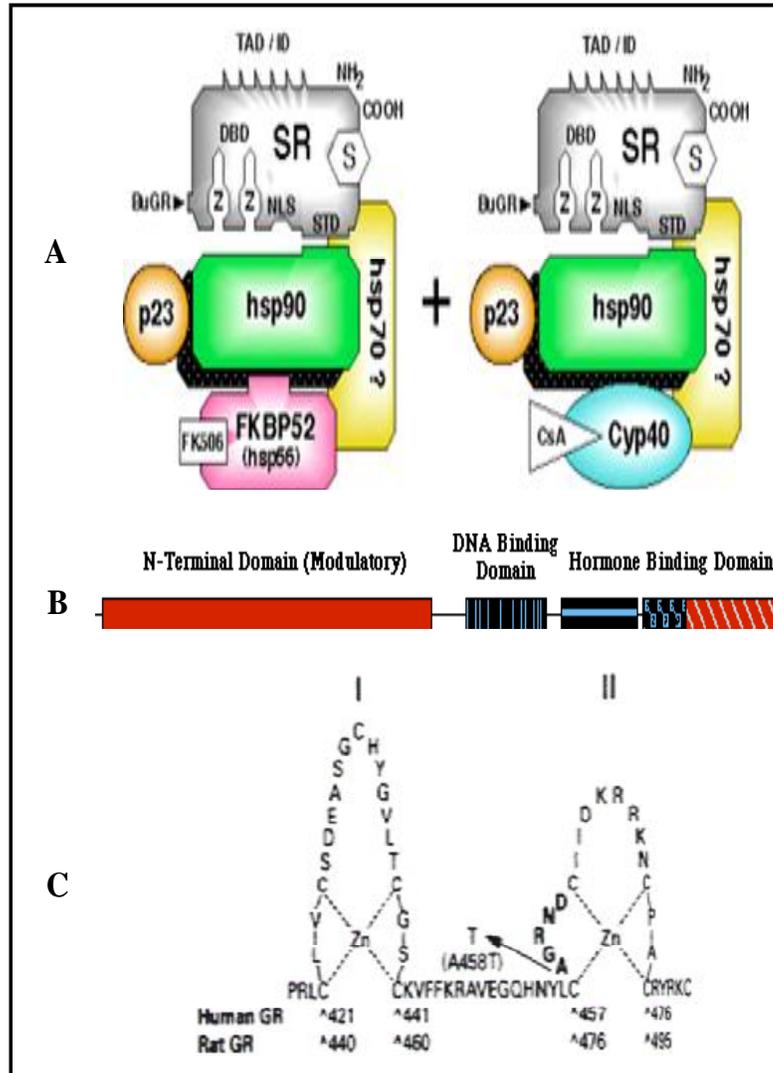


Figure 14. Structure du récepteur des glucocorticoïdes chez l'homme et le rat (d'après Newton, 2000).

(A) : Le complexe du récepteur RG est associé aux protéines cytoplasmiques telles que les hsp70, hsp90, P23 et d'autres molécules chaperons. Après une liaison avec l'hormone, le RG est activé, la région de NLS et la région de doigt zinc (DBD) sont responsables de la translocation dans le noyau et de l'interaction avec le GRE, respectivement. (B) : Le RG est une protéine de 777 a.a. qui contient quatre domaines principaux : un domaine de liaison avec l'ADN (DBD), un domaine de liaison avec le ligand (LBD), un domaine N-terminal et un domaine C-terminal. (C) : L'agrandissement du domaine DBD, montre la région des doigts de zinc (lettre normale) et la région de la dimérisation (gras).

immunophylin Hsp56, Hsp59, les kinases phosphatases et les protéosomes (Yudt et Cidlowski, 2002). Des études se sont intéressées au rôle des molécules chaperones liées aux GC dans la mobilisation et la transactivation des récepteurs du cytoplasme vers le noyau (Defranco, 2000). La liaison R-H induit une re-localisation de l'hélice 12 de LDB qui permet la liaison des coactivateurs aux RG ; après la liaison H-R, le RG est activé et translocalisé dans le noyau grâce à un signal NLS (nuclear localisation signal) (Falkenstein et coll., 2000).

****Elément de réponse aux GC.*** Après la translocation du complexe R-H dans le noyau, les RG se lient à une séquence d'ADN appelée glucocorticoïd-responsive-element (GRE) qui est décrite comme un demi-hexanucléotide arrangé d'une façon inversée, répétée et séparée par 3 paires de bases non conservées, AGAACA nnn TGTTCT (Beato et coll., 1989). De plus, le complexe GR α -H est dimérique même avant son interaction avec le GRE. Cette interaction nécessite que la structure chromatinique du gène soit accessible au complexe R-H car l'ADN est incorporé dans le nucléosome et recouvert par des histones. Afin que le complexe R-H, sous forme de doigt de zinc, atteigne le GRE de la chromatine du gène cible, une rotation ou une nouvelle orientation du GRE s'effectue par l'acétylation des histones ou par des coactivateurs des RG permettant l'interaction du GRE avec LBD et DBD des récepteurs. Cette acétylation réduit l'affinité des histones à l'ADN et le GRE devient accessible au complexe RG-H (Beato et Klug, 2000).

****Action transcriptionnelle directe.*** Après l'interaction du complexe H-R avec le GRE, la transcription basale du gène est augmentée ou diminuée et elle semblerait être dépendante, non seulement de la stabilité du complexe H-R, mais aussi de l'interaction de l'assemblage spécifique des autres facteurs de transcription et des polymérase avec le GRE (Gouilleux, 1999).

****Action transcriptionnelle indirecte du complexe GC/récepteur.*** La régulation de l'expression des gènes cibles des GC se fait au niveau transcriptionnel. Il est possible que le complexe H-R interagisse avec d'autres facteurs de transcription par une interaction protéine-protéine, ce mécanisme est nommé activité non transcriptionnelle du RG classique. Par exemple, le complexe H-R peut interagir directement sur le promoteur du gène NF- κ B et induire les cytokines d'inflammation, ou indirectement avec p-65, une sous-unité de NF- κ B (Saklatvala, 2002).

1.6.2. Récepteurs médiant les actions non génomiques des GC

****Récepteurs intracellulaires classiques.*** Des études immuno-histochimiques et immuno-radioactives ont montré que les récepteurs stéroïdiens classiques pourraient être impliqués non seulement dans l'action génomique des hormones stéroïdiennes, mais aussi dans la réponse rapide non génomique du même récepteur. Le signal rapide est inhibé par des antagonistes de ces

récepteurs et par l'intermédiaire des seconds messagers (Sutter-Dub, 2002). On visualise par la microscopie confocale des RE α structurellement similaires aux récepteurs RG intracellulaires classiques qui se localisent près de la membrane plasmique des neurones du fœtus de rat (Clarke et coll., 2000). L'implication RE α dans les actions non génomiques rapides des estradiols a été étudiée dans plusieurs phénomènes physiologiques: dans les cellules endothéliales humaines des veines, du sperme et l'ovaire du hamster (Falkenstein et coll., 2000).

***Récepteur stéroïdiens non classiques.** Des études immuno-radioactives ont révélé l'existence de récepteurs membranaires distincts des récepteurs classiques (63 kDa) assurant l'action des GC dans les neurones, la vessie, le foie, le rein et les lymphocytes des animaux étudiés. L'activité fonctionnelle de ces récepteurs est liée à un couplage de la protéine G intramembranaire avec un changement du contenu intracellulaire en ATP (Falkenstein et coll., 2000).

En résumé, il existe deux types d'effets des GC : des effets physiologiques (action médiée par une dose de GC équivalente à la concentration endogène normale sécrétée dans la circulation) et des effets pharmacologiques (action médiée par une forte dose en comparaison à la sécrétion des GC endogènes). Très récemment, il a été suggéré que les propriétés pharmacologiques majeures des GC constatées *in vivo* (anti-inflammatoire, immunosuppressive et anti-stress) puissent avoir un rôle protecteur dans ces processus. Cette conception est basée sur le fait que la concentration du cortisol est augmentée 10 fois ou plus en cas de stress sévère (Bianchi, 2002).

Le système IGF/IGFBP pourrait être impliqué dans la voie d'action des GC au cours de la biominéralisation des structures craniofaciales. Un des mécanismes de cette hormone est de moduler la production des IGFBP (Canalis, 1998 ; Jux et coll., 1998).

2. Système IGF/IGFBP : un des modes d'action des GC

L'hypothèse des somatomédines a considéré très longtemps que la croissance somatique est sous le contrôle de la GH hypophysaire par l'intermédiaire des facteurs de croissance insulino-mimétiques IGF-I (somatomedine C) circulant et exclusivement sécrétés par le foie. Le rôle endocrine de l'IGF a été bien précisé par les expériences récentes des souris transgéniques et les mutations des gènes du système IGF qui montrent que la croissance fœtale est contrôlée génétiquement et implique des facteurs de croissance et des hormones (Efstratiadis, 1998 ; Ben Lagha et coll., 2000)

Il a été découvert que les IGF sont des facteurs fondamentaux sécrétés activement dans la plupart des tissus et ont un rôle autocrine/paracrine primordial, au cours de la croissance fœtale et post-natale (Le Roith, 2001) pour servir de relais pour les hormones. Ces facteurs sont produits par les ostéoblastes ou les chondrocytes. Ils s'incorporent dans la matrice osseuse et cartilagineuse sous

forme latente ou active, tels que les IGF, le TGF β (transforming growth factor β), les BMP et le FGF.

2.1. Histoire et terminologie

Les insulin-like growth factors (IGF-I et IGF-II) sont des polypeptides structurellement apparentés à l'insuline. Le terme somatomédine a été créé par les chercheurs qui tentaient d'isoler du sérum le facteur de médiation de l'hormone somatotrope (GH) hypophysaire qui agissait directement sur le cartilage de conjugaison en stimulant l'incorporation du soufre *in vitro* dans la MEC, ce facteur a été appelé somatomédine C (Daughaday, 1972). Après cette observation, les IGF -I et -II sont connus respectivement sous le nom de somatomédines C et A. Actuellement, le terme somatomédine A (IGF-II) n'est pas justifié car l'IGF-II est moins contrôlé par la GH que l'IGF-I (Humbel, 1989). De façon indépendante, d'autres chercheurs avaient pour but d'isoler du sérum des facteurs possédant un pouvoir insulinique mais non inhibés par les anticorps anti-insuline (non suppressible insulin-like activity : NSILA). Ces deux types de facteurs correspondaient en fait aux mêmes molécules et la terminologie des IGF fut définitivement retenue (Le Bouc, 1996).

2.2. IGF, IGFBP, récepteurs et protéases

Les IGF.** Principalement sécrété par le foie, ***l'IGF-I agit en tant que médiateur des effets de la GH sur la croissance post-natale des os longs ; son effet est typiquement *endocrine*. Depuis, il est devenu évident que les IGF sont des facteurs ubiquitaires, sécrétés localement par la majorité des tissus. Ces facteurs ont des actions de type autocrine/paracrine agissant sur la croissance, la différenciation cellulaire et le métabolisme de nombreux tissus autres que le cartilage. Ils sont donc considérés comme des facteurs anaboliques, différemment actifs tout au long de la vie. Les IGF-I et -II en concentration élevée (courte durée) miment *in vivo* et *in vitro* l'effet métabolique de l'insuline (transport du glucose et stockage du glycogène) régulé normalement par la présence des protéines de liaison aux IGF dans le sérum. Donc, les IGF autorisent, grâce à leur ressemblance structurale avec l'insuline, des activités similaires après leur fixation sur des récepteurs communs (Zapf et coll., 1981). De plus, l'effet mitogénique des IGF a été observé *in vitro*, après une longue durée de traitement, comme la synthèse de l'ADN, des ARN et des protéines. Ces facteurs interviennent, par exemple, dans la prolifération cellulaire en permettant aux cellules quiescentes arrêtées dans la phase G₀/G₁ d'entrer en phase S (Humbel, 1989).

L'IGF-II est surtout impliqué dans la croissance fœtale, la régulation de la biosynthèse varie en fonction des stimuli hormonaux (GH, insuline), du tissu et du stade du développement (Le Bouc, 1996). Depuis quelques années, le rôle physiologique de l'IGF-II commence à être mieux

connu, il intervient chez les mammifères dans plusieurs processus biologiques : la croissance foetale, la prolifération, la différenciation et le métabolisme. De plus, il a été montré que la relaxation de l’empreinte du gène IGF-II induit une surcroissance et différents types de cancers (O’Dell et Day, 1998). L’IGF-II est hautement exprimé dans plusieurs types de cancers comme ceux des glandes mammaires, de la prostate, du colon et du poumon (Le Roith et Roberts, 2003). Dans ces conditions, l’IGF-II agit d’une façon autocrine via le récepteur de type I (R1-IGFI) qui est surexprimé dans ces tissus et médie plusieurs activités cellulaires telles que la prolifération, l’adhésion, la migration et la mort cellulaire programmée.

Enfin, pour mieux comprendre l’effet des IGF, il faut intégrer d’autres composants comme les six protéines de liaison IGFBP, les récepteurs, les protéases et leurs inhibiteurs (**Figure 15**).

***Les IGFBP.** Dans la circulation et les milieux biologiques, les IGF circulants sont liés de façon réversible à des protéines spécifiques de haute affinité (10^{-10} M) qui sont au nombre de six, les IGFBP qui, tout comme les IGF, sont également synthétisées dans différents tissus. Dans le sérum, l’IGFBP-3 (GH-dépendante) est la plus abondante. Chaque IGFBP lie l’IGF-I et l’IGF-II avec des affinités spécifiques propres (Zapf et coll., 1991). Ces six IGFBP lient les IGF sous forme d’un complexe binaire de bas poids moléculaire (40 kDa). De plus, le complexe binaire IGF/IGFBP-3 s’associe à une sous-unité ALS de 85 kDa (GH-dépendante et ne liant pas les IGF) pour former un complexe de 150 kDa (Martin et Baxter, 1992).

Les IGF sont protégés de la dégradation lorsqu’ils sont liés aux IGFBP. Leur demi-vie est plus longue : douze heures contre dix minutes pour les IGF libres. Dans la circulation, 80% des IGF sont inclus dans le complexe ternaire ALS-IGFBP-3 qui ne franchit pas la barrière capillaire, 5% sont sous forme libre et le reste est lié aux autres IGFBP qui adressent les IGF à leurs cellules cibles en franchissant la barrière capillaire. Il a été confirmé que l’IGF-II lie préférentiellement les formes binaires d’IGFBP, mais il peut également lier le complexe ALS-IGFBP-5 d’une façon plus importante que la forme ALS-IGFBP-3 qui est prédominante dans le sérum normal (Twigg et coll., 1998).

Certaines IGFBP libres, *sécrétées localement*, peuvent aussi avoir une action tissulaire propre par leur interaction avec leur récepteur membranaire (Clemmons, 1998). *Les effets indépendants* des IGFBP ont été étudiés dans les 10 dernières années, par exemple, dans le cancer du sein l’IGFBP-3 se lie à des *protéines membranaires* de 20, 26 et 50 kDa ; l’IGFBP-1 peut se fixer au complexe récepteur-intégrine ou à un R-VTGF_β (IGFBP-3) (Firth et Baxter, 2002). De plus, l’IGFBP-3 et l’IGFBP-5 peuvent agir comme un *facteur de transcription*, elles sont transportées au noyau grâce à une NLS qui se lie à la protéine importine_β et facilite la translocation au noyau (Collett-Solberg et Cohen, 2000 ; Mohan et Baylink, 2002 ; Schneider et coll., 2002).

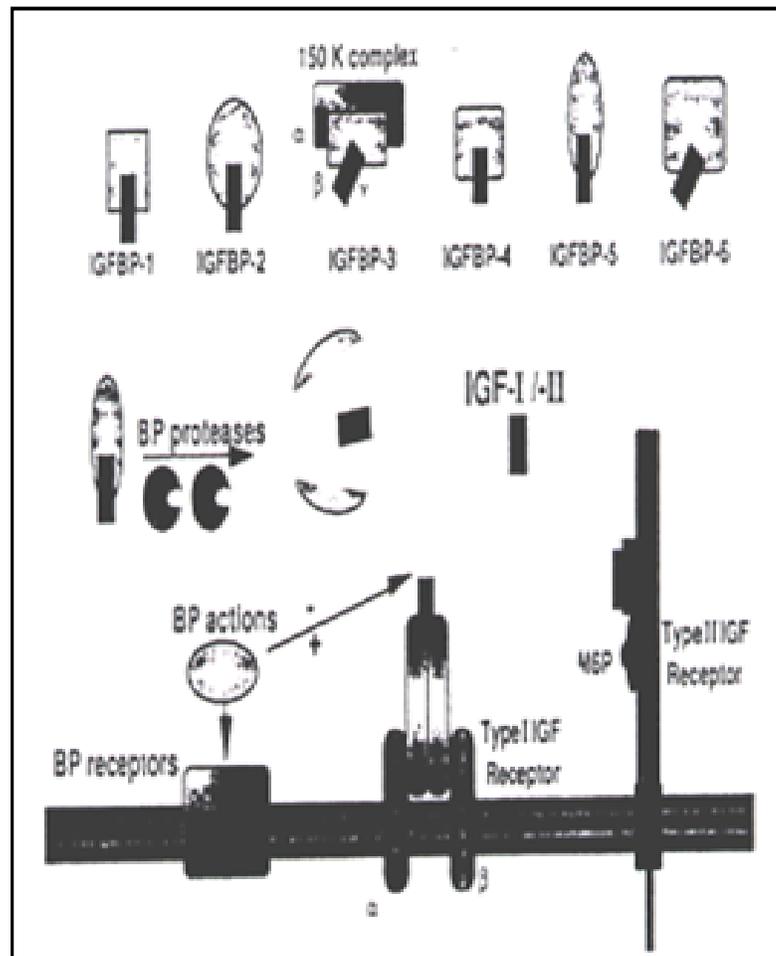


Figure 15. Composants du système IGF/IGFBP (d'après Collet-Solberg et Cohen, 1996).

Dans la circulation, les IGFBP-1 à -6 se lient avec les IGF sous forme d'un complexe binaire de (40 kDa), le complexe d'IGF/IGFBP-3 et -5 s'associe à une sous-unité ALS de 85 kDa pour former un complexe de 150 kDa. Les effets biologiques des IGF sont médiés par les récepteurs de type I et II. Les protéases clivent différentes formes d'IGFBP.

Il été démontré, au stade précoce de la *chondrogenèse*, que l'effet antiprolifératif de l'IGFBP-3 est indépendant des IGF (l'IGFBP-3 est associée à une protéine membranaire de 20 kDa) alors que l'effet de l'IGFBP-3 au cours de la phase terminale de la différenciation chondrocytaire est IGF-dépendant (Spagnoli et coll., 2000). Donc, la synthèse de ces protéines de liaison varie selon le tissu, le stade du développement et l'environnement hormonal. Ainsi, les variations quantitatives et qualitatives des IGFBP permettent de moduler, de façon inhibitrice ou activatrice, les effets des IGF (Le Bouc, 1996) (**Figure 16**).

***Les récepteurs aux IGF.** Les IGF exercent leur action par l'intermédiaire des récepteurs spécifiques dont les gènes et les protéines sont bien caractérisés (Humbel, 1990). **Le récepteur de type 1**, glycoprotéine a une structure tétramérique voisine de celle du récepteur de l'insuline : les deux sous-unités α (transmembranaires) lient l'IGF-I et les deux sous-unités β (intracellulaires) possèdent une activité tyrosine kinase, ce récepteur de type 1 lie essentiellement l'IGF-I mais aussi, avec une affinité moindre, l'IGF-II et également l'insuline. **Le récepteur de type 2** est composé d'une seule chaîne polypeptidique avec un domaine intracellulaire très court et une partie extracellulaire constituée de la répétition de la séquence du récepteur du mannose-6-phosphate (R-M6P). Le récepteur M6-P permet le transit d'enzymes *lysosomiales* entre la membrane plasmique, l'appareil de Golgi et les lysosomes. Le récepteur de type 2 lie l'IGF-II de préférence à l'IGF-I et n'a pas d'affinité pour l'insuline. Il joue un rôle dans la clairance de différentes molécules (notamment de l'IGF-II après liaison, puis internalisation et dégradation lysosomiale) (Le Roith et coll., 2001).

***Les protéases, fragments de dégradation des IGFBP.** La protéolyse des IGFBP a un rôle essentiel dans la régulation du complexe IGF/IGFBP, donc dans la modulation des effets biologiques des IGF. A l'heure actuelle, *les protéases* identifiées sont : le plasmin-plasminogène, la sérine protéase, la cathepsine, les métallo-protéinases matricielles MMP (Binoux et coll., 2000). Récemment, il a été identifié une protéase ADAM-9 sécrétée par les ostéoblastes humains (Mohan et coll., 2002). Ces protéases et leurs inhibiteurs sont sécrétés dans tous les milieux biologiques et dans les milieux de culture. Elles sont considérées comme des régulateurs autocrine/paracrine dans des conditions physiologiques (la croissance) et dans les états pathologiques et tumoraux.

L'action biologique attribuée aux fragments de dégradation des IGFBP est mal définie. Très récemment, des études *in vivo* (liquide physiologique) et *in vitro* dans plusieurs modèles de culture, permettraient de soutenir l'hypothèse que ces fragments ont une forme et une concentration différente selon *le tissu* et une basse affinité pour les IGF (Binoux et coll., 2000).

Dans *le sérum*, les autres liquides physiologiques et l'environnement cellulaire, toutes les IGFBP-1 à -5 sont protéolysées sauf l'IGFBP-6 qui est protégée de la dégradation grâce à son site

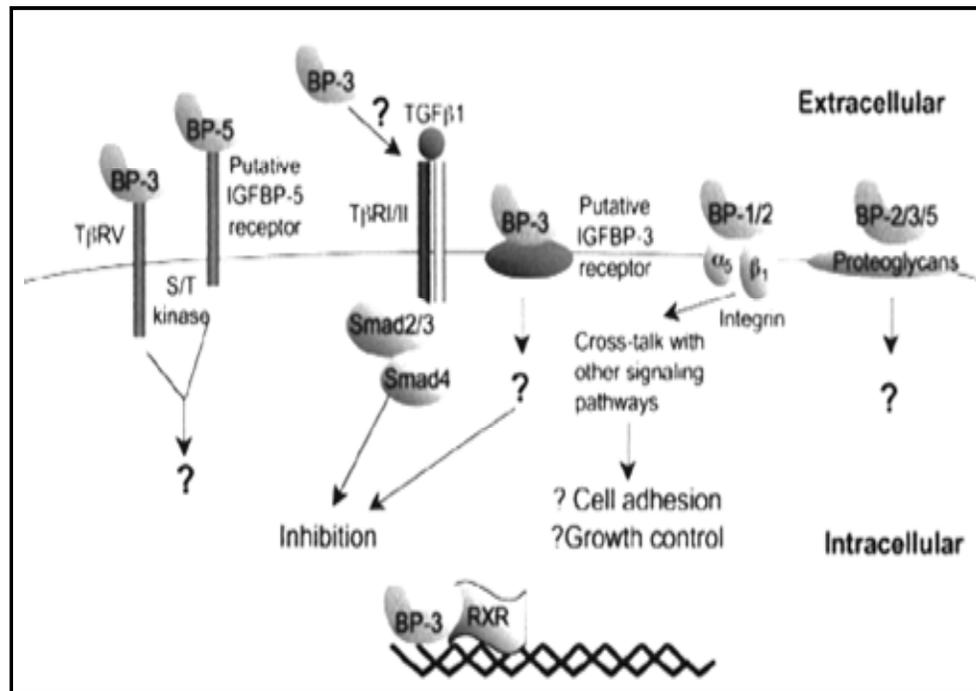


Figure 16. Fonctions des IGFBP indépendantes des IGF (d'après Firth et Baxter, 2002).

Le récepteur $T\beta RV$ et une protéine sérine/thréonine kinase (420 kDa) ont été proposés comme un récepteur de l'IGFBP-3 et de l'IGFBP-5, respectivement. L'IGFBP-1 (ainsi que l'IGFBP-2, probablement) se lie au récepteur de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ et intervient dans la voie de signalisation des facteurs de croissance. Les IGFBP-2, -3 et -5 interagissent avec les protéoglycanes dont la voie de signalisation n'est pas encore définie. Les IGFBP-2, -3 et -5 sont transportées dans le noyau via l'importine β ; par exemple, l'IGFBP-3 a été identifiée dans le complexe RXR.

d'O-glycosylation (Bach, 1999). Dans les *cultures primaires* de chondrocytes de fœtus de rat, il a été mis en évidence une accumulation des différents fragments de dégradation IGFBP-2 (18 kDa), IGFBP-3 (30 kDa) et IGFBP-5 (20 kDa). Dans ce modèle, il est probable que l'équilibre entre les formes intactes et dégradées des IGFBP-2, -3, et -5 joue un rôle primordial au cours de la biominéralisation endochondrale du septum nasal du fœtus de rat (Nadra et coll., 2003). *Dans l'os et la prostate*, les fragments de dégradation d'IGFBP-3 de 30 kDa augmentent la biodisponibilité des IGF pour leur récepteur, par une accélération de la dissociation des IGF liés et stimulent ou inhibent leur action mitotique. Les fragments de l'IGFBP-3 (16 kDa, 22 kDa) et le fragment d'IGFBP-5 (23 kDa) régulent la croissance cellulaire (prolifération et différenciation) par l'intermédiaire de récepteurs qui sont encore mal connus. De plus, la voie de signalisation des fragments N-terminaux des IGFBP-3 et IGFBP-5 dans la prolifération, la différenciation et l'apoptose, reste à définir (Binoux et coll., 2000).

2.3. Les IGF et La croissance foetale

Il est évident que la croissance (prolifération, différenciation) *post-natale* est régulée par les hormones et les facteurs de croissance. En revanche, les régulateurs de *la croissance* foetale sont moins connus, en particulier chez le fœtus humain, car il est difficile d'examiner physiquement le fœtus et de doser la concentration des facteurs de croissance. Chez les mammifères, les *hormones placentaires et fœtales* jouent un rôle vital dans la stimulation et la modulation de la croissance foetale. L'importance du placenta a été précisée par l'implication de différents peptides sécrétés et structurellement apparentés aux hormones hypophysaires (GH-like peptides) et hypothamiques (lactogène placentaire, gonadotrophine chorionique, prolactine, luteinizing hormone releasing factor). Ces hormones stimulent la croissance foetale par l'intermédiaire des IGF. *Chez l'homme, le rat et le lapin*, il a été montré que la croissance foetale, est peu dépendante de la sécrétion de la GH. L'insuline est synthétisée et stockée par les cellules beta du pancréas foetal humain à partir de 11 semaines de gestation ; aucun passage n'a été observé entre l'embryon et le placenta. Donc, il est possible que l'insuline agisse indirectement sur la croissance foetale en stimulant les IGF (Underwood et D'Ercole, 1984). Le rôle des IGF dans la croissance foetale a été confirmé grâce à plusieurs constatations. Par exemple, les *fœtus humains* atteints de retard de croissance intra-utérin ont des taux d'IGF-1 inférieurs à ceux des fœtus normaux. L'effet de l'IGF-II pendant la vie foetale est suspecté depuis longtemps à cause de ses taux sériques élevés, environ 6 fois supérieurs à ceux de l'IGF-1, et l'abondance de ses ARNm dans la plupart des tissus foetaux (Le Bouc, 1996).

2.4. Implication du système IGF/IGFBP dans la biominéralisation

L'implication des différents constituants du système IGF/IGFBP a été étudiée au cours du développement embryonnaire et postnatal par la réalisation de souris mutantes nulles ou

surexprimant l'un des constituants du système et l'analyse des phénotypes induits par ces mutations, simples ou combinées. L'invalidation fonctionnelle du gène d'*Igf1* a permis de mettre en évidence l'importance d'IGF-1 au cours de la croissance fœtale. Les souris mutantes nulles de ce gène présentent un retard de la mise en place des centres d'ossification et ont un poids de naissance inférieur d'environ 60% à la normale. Le mutant nul du gène d'*Igf2* a permis la mise en évidence d'une empreinte paternelle de ce gène. En effet, la souris hétérozygote portant cette mutation provenant du père et le mutant homozygote sont phénotypiquement identiques, alors que les souris hétérozygotes portant cette mutation nulle provenant de la mère ont un phénotype normal du fait de l'empreinte parentale. Les souris mutées ont une taille atteignant 60% N à la naissance et un retard de la mise en place des centres d'ossification. Les souris homozygotes présentant une invalidation fonctionnelle du gène d'*Igf1r* meurent à la naissance et présentent un retard de croissance (45% N), une hypoplasie de l'ensemble des organes et un retard de la mise en place des centres d'ossification (Liu et coll., 1993). Les souris doubles mutantes nulles d'*Igf1* et d'*Igf1r* présentent le même phénotype que les souris IGF-1R homozygotes (retard de croissance 45%), ce qui permet de montrer que l'IGF-1 interagit exclusivement avec son propre R *in vivo*. Par contre, les souris doubles mutantes nulles *Igf2* (+/p-)/*Igf1r* (-/-) présentent une taille diminuée d'environ 30% N. Ce qui permet de démontrer *in vivo* que l'IGF-II interagit avec l'IGF-1R, mais aussi avec un autre récepteur qui est celui de l'insuline. L'invalidation du gène d'*Igf2r* a prouvé que ce gène est soumis à l'empreinte maternelle ; les souris mutantes nulles *Igfr2* ont une augmentation sérique d'IGF-II et une surcroissance générale (130% N), ces souris meurent à la naissance. Cette mortalité est due à l'excès d'IGF-II qui ainsi surstimule l'IGF-1R (Ludwig et coll., 1996). Ceci a été observé, d'une part, chez les souris portant une double mutation nulle des gènes d'*Igf2* et d'*Igf2r* qui présentent un nanisme mais qui sont viables. Le développement normal des souris qui présentent une invalidation fonctionnelle des deux récepteurs aux IGF n'est dû qu'à la stimulation du récepteur de l'insuline par les excès d'IGF-II (Ludwig et coll., 1996). Ceci a été montré chez le double mutant nul d'*Igf1r* et du récepteur de l'insuline qui sont non viables et qui présentent une taille à la naissance de 30% de N. En revanche, chez les souris mutantes nulles du gène d'IGFBP-2, -3, -4 et -6, seule la mutation du gène IGFBP-4 a entraîné un retard de croissance (85%) (Efstratiadis, 1998). La lignée des souris transgéniques surexprimant l'hIGFBP-1 présente un retard de croissance dès le 17^{ème} jour de gestation et des défauts de biominéralisation (Ben Lagha et coll., soumis).

La croissance fœtale est donc un évènement complexe. Ce phénomène semble être contrôlé par plusieurs éléments : l'apport suffisant en nutriments et en oxygène, couplé avec les effets des facteurs de croissance ; l'ensemble est dominé par un fond génétique, qui est très important durant la période précoce de la grossesse ; période où la croissance fœtale s'effectue dans des limites étroites, 38% de la croissance fœtale est attribuée à des facteurs génétiques (fœtaux, paternels) et les 62% restant à des facteurs épigénétiques (hormones maternelles, facteurs de croissance fœtaux et placentaires) (Polani, 1973).

2.5. Etude in vitro de l'implication du système IGF/IGFBP dans la biominéralisation

Le système IGF/IGFBP est sécrété localement par la majorité des tissus du squelette et a fait l'objet de nombreux travaux *in vitro* et *in vivo* en particulier chez le rat et la souris. Le rôle autocrine/paracrine et endocrine des IGF est impliqué de façon complexe dans les processus d'ossification endochondrale et membraneuse.

Le rôle du système IGF dans le développement craniofacial a été démontré par délétion du récepteur de l'IGF-I médiant les effets des IGF ; cette délétion est associée à un retard de 2 à 4 jours dans le développement des centres d'ossification cranio-faciaux (Liu et coll., 1993). Donc, la voie de transduction des IGF est essentielle dans le développement du squelette embryonnaire en particulier dans la prolifération, la différenciation, le métabolisme et l'apoptose (**Figure 17**).

Des études d'hybridation *in situ* chez des fœtus de rat, ont montré la présence de différents composants du système IGF/IGFBP à la fois dans les chondrocytes et les ostéoblastes (Wang et coll., 1995). Dans les chondrocytes du *cartilage de croissance* de souris, il y a uniquement une sécrétion d'*IGF-II* (Bhaumick, 1993). De même, seul l'ARNm d'*IGF-II* a été détecté et fortement exprimé dans le cartilage du rat par hybridation *in situ* (Wang et coll., 1995). De plus, l'*IGF-II* stimule la croissance des chondrocytes humains fœtaux ainsi que la synthèse de l'ADN et des protéoglycanes dans les chondrocytes de lapin en culture (Takigawa et coll., 1997 ; Kato et Gospodarowicz, 1985). L'*IGF-I* agit principalement par voie endocrine ; cependant, des proformes d'*IGF-I* ont été détectées dans le cartilage de croissance de lapin (Demarquay et coll., 1995). Il a été mis récemment en évidence que l'*IGF-I* et l'*IGF-II* jouent un rôle complémentaire dans la croissance longitudinale des os. Cependant, les résultats de localisation d'*IGF-I* et *IGF-II* varient selon l'âge et l'espèce animale (Le Roith et coll., 2001 ; Smink et coll., 2002a).

Parallèlement, les IGF jouent un rôle important dans l'activité biologique du *tissu osseux* et dans la régulation de sa formation. L'*IGF-I* joue un rôle important dans les cellules osseuses en culture, induisant la prolifération des précurseurs ostéoblastiques, mais aussi leur différenciation comme en témoigne la synthèse de la PAL et l'augmentation du Co I (Delany et coll., 1994). Les cultures d'ostéoblastes de *calvaria* de fœtus de rat de 21 jours sécrètent de l'*IGF-I* (Birnbaum et coll., 1995) et surtout de l'*IGF-II* (Canalis et coll., 1991). Les IGF-I et IGF-II stimulent tous les deux la prolifération des cellules osseuses humaines et la synthèse du collagène de type I (marqueur de la maturation osseuse) en culture (Baylink et coll., 1993) tout en agissant sur la régulation des IGFBP (MacCarthy et coll., 1994). L'*IGF-I* induit la formation osseuse *in vivo*, par exemple, la surexpression de l'*IGF-I* chez la souris induit l'augmentation de la masse osseuse (Zhao et coll., 2000). En revanche, l'inactivation du gène codant pour l'IRS1, molécule impliquée dans la voie de signalisation des IGF résulte d'une réduction de la prolifération et de la différenciation des ostéoblastes (Ogata et coll., 2000).

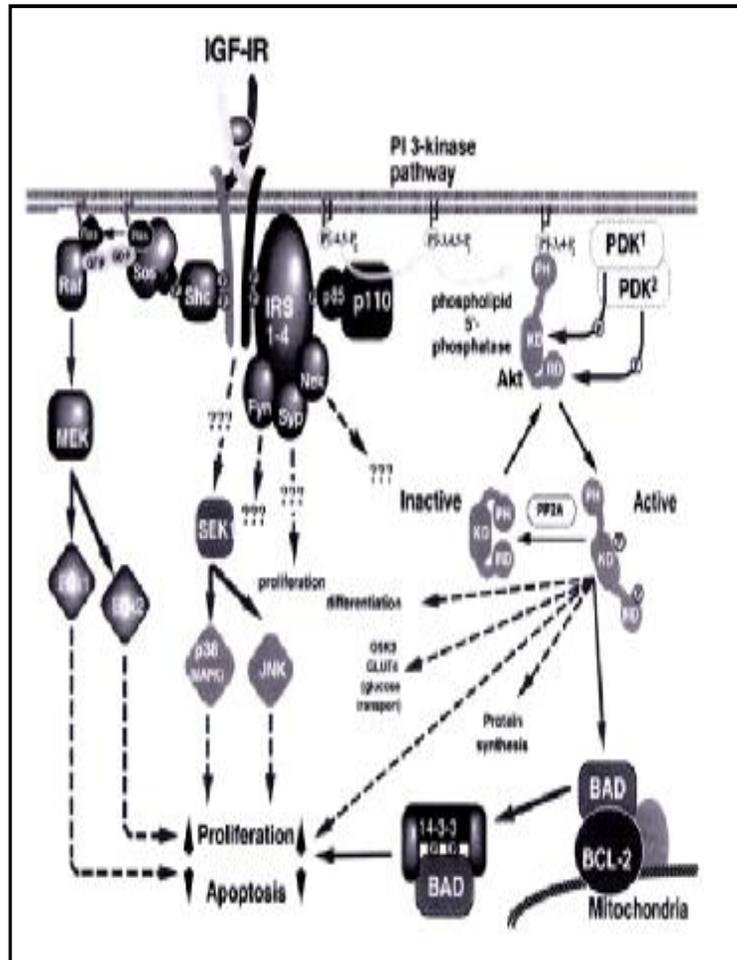


Figure 17. La voie de signalisation du récepteur de type I de l'IGF-I (d'après Le Roith, 2001).

L'interaction entre l'IGF-1 et son récepteur provoque une autophosphorylation du récepteur. Les protéines shc et IRS associées à la sous-unité β transmembranaire du récepteur sont aussi phosphorylées par une tyrosine kinase. Puis, une phosphorylation des protéines Grb2, P85, Nck, Syp et fyn se fait au niveau cytoplasmique. Suite à l'activation de la voie de la Map kinase et de la PI-3 kinase, différentes activités biologiques sont induites telles que la prolifération, la différenciation et l'apoptose.

Tout comme les IGF, les IGFBP sont contrôlées par la vitamine D, la PTH et les GC, ce qui souligne l'importance de ces protéines de liaison dans la régulation de la croissance osseuse et *cartilagineuse*. La régulation de l'expression des IGFBP a été caractérisée dans les chondrocytes articulaires dans différentes conditions de culture et chez plusieurs espèces : chez l'homme (Olney et coll., 1995 ; DiBattista et coll., 1996), le lapin (Froger-Gaillard et coll., 1989), les bovins (Olney et coll., 1993 ; Moralès, 1997), les ovins (Sunic et coll., 1998) et le rat (Matsumoto et coll., 1996b). Récemment, l'expression des IGFBP a été identifiée dans le cartilage de croissance de différentes espèces telles que l'homme (Matsumoto et coll., 2000), le lapin (Koedam et coll., 2000), les bovins (Olney et Mougey, 1999), les ovins (Sunic et coll., 1995 ; Borromeo et coll., 1996 ; De Los Rios et Hill, 2000) et la souris (Bhaumick, 1993). Très récemment, dans les cultures primaires des chondrocytes de fœtus de rat, les IGFBP-2 à -6 ont été détectées en condition basale. Cette étude montre également que l'effet différenciant de la dexaméthasone, en concentration physiologique, favorise la biominéralisation, par la modulation de la synthèse des IGFBP au cours de la biominéralisation des structures craniofaciales. La production importante des IGFBP dans ces cultures de chondrocytes isolés à partir du septum nasal de fœtus du rat est probablement due au site anatomique de cette structure craniofaciale contrairement aux autres types de cartilage étudiés (Nadra et coll., 2003).

Dans *l'os*, l'activité biologique des IGF est dépendante de leur affinité avec leurs protéines de liaison (*IGFBP*), principalement les IGFBP-3 et -5 ; ces protéines sont sécrétées localement par les ostéoblastes, stockées dans la matrice osseuse et contrôlées par des protéases spécifiques. Par ailleurs, il a été récemment établi que l'IGFBP-5 a (comme un facteur de croissance) des effets directs sur l'ostéogenèse chez la souris (Miyakoski et coll., 2001).

C - LES HOMEOMENES ET LA SQUELETTOGENESE

Au cours des 10 dernières années, les progrès considérables de la génétique ont permis de préciser notre compréhension des événements moléculaires et cellulaires présidant à la mise en place du squelette.

“Tout les être vivants, tous les animaux, sont apparentés à un point naguère insoupçonné” (François JACOB).

Les gènes du développement contrôlent le plan d'organisation de l'embryon dès la fécondation, par une série de phénomènes successifs. Le développement cranio-facial débute chez les vertébrés dès le stade de gastrulation, puis ce développement prend toute sa signification lors de la neurulation (Couly et coll., 1998). Les gènes du développement ou *gènes homéotiques* découverts chez la drosophile, il y a 20 ans, jouent un rôle essentiel dans le développement embryonnaire des

animaux. Ces gènes viennent d'être retrouvés chez un petit ver rond (*Caenorhabditis elegans*) vieux de 540 millions d'années. Les gènes homéotiques et d'autres gènes conservent un motif de liaison avec l'ADN, malgré la différence morphologique de l'embryogenèse entre la drosophile et les mammifères, le contrôle génétique de leur développement présente certaines similitudes. Ils sont nombreux et fortement conservés d'une espèce à l'autre, ils représentent aussi un avantage supplémentaire d'allier la structure à la fonction. Les gènes homéotiques regroupent plusieurs gènes tels que les *gènes maîtres*, les *gènes divergents* et les *gènes secondaires* (*Msx*, *Dlx*, *Gsc*) qui définissent un territoire et donnent à chaque segment une identité particulière (**Tableau 2**) (Benoît, 2001).

“Le développement de l'embryon humain met en jeu une interaction permanente entre les gènes et le milieu” (François JACOB). Si les gènes homéotiques *Hox* interviennent au niveau de la partie vertébrale (postérieure) de l'embryon, d'autres gènes du développement sont responsables de la partie antérieure du crâne et de la face, tels que : *Alx*, *Barx*, *Dlx*, *Pitx*, *Msx*, *Pax*, *Runx* et *Gsx* (Francis-west et coll., 1998). Cependant, *Msx* et *Dlx* sont exprimés dans le squelette entier, dans le bourgeon de membre aussi bien que dans la sphère orofaciale (Robledo et coll., 2002).

1. Gènes maîtres à homéoboîte

Chez l'homme, dans les 15 à 20 jours qui suivent la fécondation, la forme de la tête et de la face est déterminée. Les gènes du développement codant dans la majorité des cas pour des facteurs de transcription sont concernés dans la mise en place de l'identité positionnelle. Les gènes *Hox* interviennent très tôt (après 3 semaines) au début du développement embryonnaire et sont responsables de la mise en place de l'axe antéro-postérieur (A/P), dorso-ventral (D/V) du corps, la segmentation des différents territoires anatomiques de l'embryon (la colonne vertébrale, le thorax et les membres), la segmentation provisoire de la plaque neurale, puis du tube neural jusqu'à la partie antérieure du rhombocéphale mettant en place 7 ou 8 rhombomères. D'autre part, les gènes *Hox* déterminent la mise en place du plan de la base de la tête, du corps, de la spécification des cellules et des territoires qui donnent les différents organes. Chez l'homme, il a été prouvé que les mutations *HOXA* et *HOXD* provoquent des malformations des membres alors que *HOX13* induit des défauts au niveau des mains et des pieds. Il existe 39 gènes homéotiques identifiés chez l'homme et la souris qui ont une relation avec les gènes *HOM* chez la drosophile, les gènes *HOXA*-*HOXD* sont distribués sur 4 clusters et localisés sur différents chromosomes (Benoît, 2001).

EMBRYON EMBryo	CHRONOLOGIE (CHRONOLOGY)	ETAPES STAGES 3 feuillets 3 layers	GENES (hiérarchie) GENES (hierarchy)
A 	3s/ 4 weeks	Neurulation Neurulation	Gènes Maîtres / Master genes HOX, OTX, PAX ...
	4s/ 4 weeks	Migration Migration	Gènes Secondaires Secondary genes MSX, DLX, GSC ...
B 	6s/ 6 weeks	Morphogénèse Morphogenesis	Gènes de Structuration Structuring genes FGF, BMP ...
	10s/ 10 weeks	Organogénèse Organogenesis	
	25s/ 25 weeks	Fonctions Functions	
			

Tableau 2. Hiérarchie de l'expression des gènes homéotiques au cours du développement fœtal de la sphère oro-faciale chez l'homme (*d'après Benoît, 2001*).

(A) : Les gènes maîtres sont exprimés lors des stades précoces 3-4 semaines (stade de trois feuillets et de neurulation). Les gènes Hox sont responsables de la mise en place de la partie vertébrale de l'embryon. D'autres gènes du développement, comme Pax interviennent au niveau de la partie antérieure sensorielle du crâne et de la face. Plus tard, au cours de la migration des cellules des crêtes neurales, les gènes Msx et Dlx exprimés dans le crâne à 4 semaines, sont responsables de la mise en place de l'identité positionnelle des cellules. (B) : La morphogénèse, l'organogénèse et la différenciation terminale de la tête de l'embryon s'effectuent entre 10-25 semaines. Ces différents stades du développement sont sous le contrôle des facteurs de transcription (Msx et Dlx) et des facteurs sécrétés tels que hh, FGF et BMP.

2. Gènes divergents à homéoboîte

Ce sont les gènes *En*, *Otx*, *Emx* et *Pax* dispersés dans le génome qui s'expriment dans les régions du tube neural moyen (mésencéphale). Ils s'expriment ensuite au niveau des crêtes neurales et dans le mésoderme (polarité dorso-ventrale). Les gènes maîtres et secondaires seraient responsables de la multiplication cellulaire, de la formation et de la migration des cellules des crêtes neurales (Benoît, 2001).

3. Gènes secondaires à homéoboîte

Les gènes *Msx* font partie d'une petite famille de gènes proches du gène *msh* de la *Drosophile*. Ils sont responsables chez la drosophile de la mise en place de l'axe antéro-postérieur et de la segmentation du corps. *Msx-1* et *Msx-2* sont exprimés au cours de l'embryogenèse, la morphogenèse et l'organogenèse (souris). Dans les stades précoces du développement, leurs transcrits sont détectés dans la région méso-ectodermique de la ligne primitive. Plus tard, leur expression est restreinte dans la région dorsale du tube neural et les cellules des crêtes neurales. La famille *Msx* est bien caractérisée : *Msx-1* et *Msx-2* ont un homéodomaine avec une homologie de 90%, avec une séquence commune de liaison avec l'ADN représentée par le motif TATA. Ils agissent comme un répresseur de la transcription des gènes cibles (Zhang et coll., 1997). Il a été montré que *Msx-1* et *Msx-2* diffèrent par leurs protéines associées au promoteur des gènes cibles, par exemple, *Msx-1*, associé aux TBP, CBP et SP1, interagit avec le promoteur de l'ostéocalcine tandis que *Msx-2* interagit avec le complexe TFIIF et Mint du même promoteur (Newberry et coll., 1999).

3.1. *Msx* et *Dlx* au cours du développement du bourgeon facial

Chez les mammifères, les gènes *Msx* et *Dlx* régulent la morphogenèse de la tête, de la face et de la dent. Le développement des structures faciales chez les vertébrés est un processus dynamique, multi-stades, qui débute avec la formation des crêtes neurales céphaliques dans le cerveau développé. Les cellules des crêtes neurales céphaliques migrent dans différents sites et forment avec les cellules mésenchymateuses le bourgeon facial dont la croissance se fait à partir des cellules mésenchymateuses indifférenciées suivie de la morphogenèse et de la différenciation terminale des os, du cartilage et des muscles de la tête. Les mécanismes responsables de la formation du bourgeon de membre et de la face présentent de nombreuses similarités, en particulier les facteurs ecto-mésenchymateux contrôlant la morphogenèse et la croissance des membres et du bourgeon facial. Les molécules candidates qui interviennent au cours du développement de la face ont été identifiées grâce à des mutations chez la souris et des syndromes cranio-faciaux humains. Les gènes *Msx* sont exprimés dans les cellules des crêtes neurales durant et après que leur migration

intervienne, probablement dans l'interaction épithélio-mésenchymateuse du bourgeon facial. La famille des gènes *Dlx* joue un rôle dans la morphogenèse des arcs branchiaux, *Dlx-1* et *Dlx-2* sont exprimés dans les cellules des crêtes neurales durant leur migration. De plus, *Dlx-1* et *Dlx-2* sont exprimés dans l'arc maxillaire tandis que *Dlx-6* l'est dans l'arc mandibulaire. Il a été démontré récemment que les souris mutantes pour les gènes *Dlx-5* et *Dlx-6* présentent des anomalies craniofaciales très sévères et les souriceaux meurent avant la naissance (Bethan et coll., 1997 ; Robledo et coll., 2002) (**Tableau 3**).

3.2. Maladies associées à des mutations de *Msx* et de *Dlx*

Msx-1 a rôle clé dans le développement buccal et facial de l'embryon ; il cause chez l'homme comme chez la souris des anomalies, telles que : l'absence de la fermeture du palais (la fente palatine), la malformation des os du crâne, du nez et de l'oreille interne, l'absence du développement dentaire (arrêt au stade bourgeon) (Satokata et Maas, 1994 ; Van den Boogaard et coll., 2000). De plus, les mutations de *MSX-1* chez l'homme induisent une perte de prémolaires et de molaires (Vastardis et coll., 1996). Le gène *Msx-1* joue donc un rôle primordial au cours du développement du palais, il semble être nécessaire pour l'expression des gènes *BMP* et *Shh* dans l'interaction épithélio-mésenchymateuse de l'os formé. De plus, le palais est un os plat qui s'est formé de l'union de plusieurs éléments : le palais primaire (région fronto-nasale) et le palais secondaire (11.5^{ème} jour de gestation) qui se constitue de deux palais maxilo-latéraux. La fermeture du palais est un processus indispensable pour la séparation des deux régions oro-nasopharynx (Zhang et coll., 2002). De plus, il a été prouvé que *Msx-2* participe à la fois dans la chondrogenèse et dans l'ostéogenèse. Les souris déficientes en *Msx-2* présentent un manque d'ossification des os du crâne, des anomalies de développement de la dent, des glandes mammaires et du cerebellum (Satokata et coll., 2000). Des anomalies des souris mutantes, pour différents gènes étudiés, peuvent reproduire fidèlement des syndromes rencontrés chez l'homme, par exemple, la mutation du facteur de transcription du gène *Msx-2* chez la souris comme chez l'homme développe une craniosynostose (Liu et coll., 1995). Chez l'homme, la mutation du gène *MXS-2* a été découverte la première fois dans une cranio-sténose du type Boston. les synostoses cranio-faciales résultent de fusions prématurées des sutures craniennes et faciales. A la naissance, les sutures craniennes sont largement ouvertes et restent très actives jusqu'à 3 ans environ et à un degré moindre, jusqu'à l'âge adulte. Lorsque la totalité des sutures craniennes est touchée, il s'agit d'une cranio-synostose. Si le phénomène s'étend à certaines sutures membraneuses de la face, il s'agit d'une synostose cranio-faciale qui est rencontrée dans les deux formes cliniques : syndrome de Crouzon et syndrome d'Apert (Jabs et coll., 1993).

D'autre part, les gènes de *Dlx-1* à *Dlx-6* interviennent aussi dans l'interaction des os faciaux en particulier au cours du développement de la dent (Weiss et coll., 1998). Il faut noter que

chacun de ces territoires est défini par la combinaison de plusieurs homéogènes (Dlx et Msx) qui fonctionnent pendant un temps en parallèle, dans les mêmes rassemblements cellulaires. Cependant, les mutations des gènes Msx-1 et Msx-2 (Satokata et coll., 2000), Dlx-1, Dlx-2, Dlx-5 et Dlx-6 induisent des malformations crâniennes (Qui et coll., 1997 ; Acampora et coll., 2001).

	Signaling factors	Homeobox containing genes	Other transcription factors
Migrating neural crest	Wnt-5a	Ea protein Dlx-1, 2 ^a Msx-1 ^{ab} and 2 ^b Otx-2 ^a Pax-3 ^{ab} and 7 ^a	AP-2 ^a Gli-2 ^a and 3 ^a twist ^{ab}
Facial primordia	Activin β ^a Bmp-2, 4, 5 and 7 ^a EGF ET-1 ^a FGF1, 2, 4, 5, 8 and 12 PDGF-α Jagged 1 ^{ab} and 2 ^a Shh ^{ab} TGFα TGFβ1, 2 ^a and 3 ^a Wnt-5a, 10a, 10b, 11	Barx-1 and 2 Dlx-1-6 (1 ^a 2 ^a) Ea-2 Gli-6 Gsc-1 ^a Mbx ^a (Ptx-1) Msx-1 ^{ab} and 2 ^b Otx-2 ^a Pax-3 ^{ab} , 7, 6 ^{ab} Ptx-1 Rarg ^a Sf Tlx-1 (Hox11) Uscx-4.1	AP-2 ^a Gli-1, 2 ^a and 3 ^a Pax-1 ^a twist ^{ab}

Tableau 3. Facteurs de transcription et facteurs de signalisation impliqués lors du développement du bourgeon facial (*d'après Francis-West, 1998*).

3.3. Les homéogènes dans les tissus osseux

Des facteurs de transcription sont impliqués à différents stades de l'*ostéogenèse*, ces facteurs codent pour des marqueurs précoces ou tardifs. Ainsi, **Runx-2** est un facteur essentiel à la fois à l'engagement (stade précoce) et à la différenciation ostéoblastique terminale. Au cours du développement chez la souris, Runx-2 est exprimé au 10.5^{ème} jour de gestation dans les bourgeons des os (condensations squelettiques). Au 12.5^{ème} jour de gestation, l'expression de Runx-2 est détectée dans les éléments squelettiques crâniens, axiaux et appendiculaires préformés. Plus tard (au 14.5^{ème} jour de la vie embryonnaire), Runx-2 apparaît dans les ostéoblastes et leurs cellules progénitrices. Runx-2 est essentiel à l'ostéogenèse au cours de la croissance post-natale. En outre, des études *in vitro* et *in vivo* montrent que Runx-2 joue un rôle physiologique au stade terminal de la différenciation des ostéoblastes, en particulier, pendant la sécrétion des protéines matricielles et

la minéralisation de la matrice extracellulaire des ostéoblastes. Ce facteur, membre de la famille des facteurs de transcription caractérisés par un domaine (runt) de liaison à l'ADN, se lie à un site consensus présent dans le promoteur de nombreux gènes comme la chaîne α du collagène de type I, la sialoprotéine osseuse, l'ostéocalcine et l'ostéopontine. Récemment, il a été mis en évidence que les souris transgéniques invalidées pour le gène *Runx-2* présentent une organisation immature de l'os cortical due à un blocage de la maturation des ostéoblastes conduisant à une ostéopénie et à une fragilité de l'os (Ducy, 2000). Une autre étude a montré que chez les souris *Runx-2* $-/-$, le dépôt des protéines matricielles et la minéralisation sont bloqués, l'expression de l'ostéocalcine par les ostéoblastes matures est diminuée alors que l'accumulation de l'ostéopontine dans l'os adulte a été observée (Liu et coll., 2001).

Chez l'homme, les gènes ***Msx*** sont exprimés à partir de la 4-6^{ème} semaine dans les cellules des crêtes en fin de migration. Leur schéma d'expression constitue un code spatio-temporel définissant des territoires pré-chondroblastique, préostéoblastique et pré-odontoblastique (Lacombe, 2000). Il est suggéré que l'expression de ***Msx-1 et Msx-2*** dans l'interaction ecto-mésenchymateuse joue un rôle important dans l'engagement de la voie de différenciation du bourgeon : dentaire, facial et de membre (Davidson, 1995 ; Brown et coll., 1993). Dans certains éléments squelettiques comme le cartilage et l'os, il a été décrit une combinaison d'expression de ces gènes avec des facteurs de croissance (Thesleff, 1995).

Dlx-5 est un autre facteur de transcription dont la fonction pourrait être de contrôler l'expression de la sialoprotéine osseuse et de l'ostéocalcine en interférant avec un autre facteur ***Msx-2***. L'invalidation de *Dlx-5* induit un retard d'ossification (Acampora et coll., 1999) tandis que l'inactivation de *Msx-2* retarde la différenciation ostéoblastique (Liu et coll., 1999). Dans le calvaria de poulet, il a été prouvé l'implication du gène *Dlx-5* dans le stade précoce de l'ossification membraneuse, l'induction de ce gène est à la fois sous le contrôle des facteurs de signalisation BMP, FGF et des facteurs de transcription *Msx-1*, *Msx-2* et *Twist* (Holleville et coll., 2003). Au cours de la différenciation de l'os alvéolaire, les facteurs de transcription *Dlx-5* et *Runx-2* sont exprimés. Cette étude a montré également que l'expression de *Msx-1* et *BMP-4* précède l'expression des gènes *Dlx-5* et *Runx-2* au cours du développement de la dent (Zhang et coll., 2003). En conclusion, l'ostéogenèse nécessite une expression hiérarchisée et coordonnée du facteur de transcription majeur *Runx-2* avec d'autres facteurs régulateurs tels que *Msx-2*, *Dlx-5* et *Twist* qui contrôlent à leur tour l'expression des gènes cibles au cours de l'ossification endochondrale et membraneuse (Marie, 2001).

III. OBJECTIFS

Les travaux publiés lorsque nous avons démarré ce projet avaient révélé chez le rat une concomitance entre le pic des GC au dernier tiers de la gestation (18,5^{ème} jour)(Cohen, 1973) et l'apparition des centres d'ossification de la sphère orofaciale aux 17^{ème} et 18^{ème} jours de la vie embryonnaire pour le calvaria et pour le septum nasal, respectivement (Johnson, 1933). D'autres études ont montré que l'un des modes d'action des GC implique le système IGF/IGFBP. Cependant, ces travaux avaient principalement porté sur le cartilage articulaire ou le cartilage de croissance du squelette axial et appendiculaire chez l'adulte. Nous nous sommes donc intéressés à l'implication possible de ce système comme relais des effets des GC sur la biominéralisation du cartilage de croissance du squelette craniofacial au cours du développement de rat. Ces travaux ont été réalisés dans une culture primaire de septum nasal (cartilage de croissance) de fœtus de rat (17.5^{ème} jour de la vie embryonnaire). Dans notre modèle d'étude, nous avons montré que les GC modulent la production de certains composants du système IGF : les IGFBP et leurs fragments de dégradation.

La première partie de ce travail a fait l'objet d'un article publié.

Ces dernières années, de nombreuses études ont permis de décrypter les mécanismes cellulaires et moléculaires contrôlant le développement et la différenciation du squelette craniofacial auxquels nous nous intéressons. Parallèlement, nous nous sommes donc focalisés sur les effets des GC sur les mécanismes moléculaires gouvernant la différenciation du squelette craniofacial lors la mise en place des centres d'ossification.

Ainsi, la deuxième partie des travaux (publication soumise) porte d'une part, sur l'effet des GC sur l'expression des gènes impliqués dans la différenciation ostéoblastique (facteurs de transcription Msx-2, Dlx-5, Runx-2) et d'autre part, sur des gènes codant pour les marqueurs de différenciation (OC, PAL). Nous avons ainsi montré, *in vitro* et *in vivo*, sur un modèle de calvaria de fœtus de rat, que les GC modulent l'expression de ces protéines au cours du développement.

La dernière partie de ce mémoire poursuit l'étude des mécanismes de la différenciation ostéoblastique et porte sur des travaux en cours, focalisés sur un des gènes essentiels de la squelettogenèse craniofaciale, le gène Msx-1. En effet, il a été montré au laboratoire que ce gène, qui a un rôle clé lors la différenciation ostéoblastique chez la souris, présente un mode de régulation original impliquant un ARN antisens codé par le même gène et produit par une lecture inversée du gène. Nous avons donc entrepris l'étude de cet ARN chez le rat afin d'aborder ultérieurement son rôle au cours du développement du squelette craniofacial chez le rat.

IV. PUBLICATIONS

ARTICLE I

REGULATION BY GLUCOCORTICOIDS OF CELL DIFFERENTIATION AND INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR BINDING PROTEIN PRODUCTION IN CULTURED FETAL RAT NASAL CHONDROCYTES

Reem NADRA, Pierrette MENUELLE, Sylviana CHEVALLIER and Ariane BERDAL

Running title : chondrocyte, dexamethasone, IGFBP, mineralization

Address all correspondance and requests for reprints to Dr. P. Menuelle, Laboratoire de Biologie Oro-faciale et Pathologie, EMI 0110 INSERM, U.F.R. d'Odontologie, Université Paris 7, Institut Biomédical des Cordeliers, 15 rue de l'Ecole de Médecine, 75270 Paris Cedex 06, France.
E-mail : Pierrette.Menuelle@bhdc.jussieu.fr

ABSTRACT

Glucocorticoids (GC) modulate insulin-like growth factor action in cartilage through mechanisms that are complex and insufficiently defined, especially in the context of cranio-facial growth. Because the family of IGF-binding proteins (IGFBP-1 to -6) is important in the regulation of IGF availability and bioactivity, we examined the effect of GC on chondrocyte differentiation in correlation with IGFBP production in cultured fetal rat chondrocytes isolated from nasal septum cartilage of fetal rat. Dexamethasone (DEX) effects were tested before and at the onset of extracellular matrix maturation. DEX induced a dose-dependent increase in the size of cartilage nodule formed, ⁴⁵Ca incorporation into extracellular matrix, alkaline phosphatase activity and sulfation of glycosaminoglycans, maximal effects being obtained with a 10 nM DEX concentration. The IGFBPs produced by cultured chondrocytes were characterized in culture medium which has been conditioned for 24 h under serum-free conditions by these cells. Western ligand blotting with a mixture of [¹²⁵I]IGF-I and -II revealed bands of 20 kDa, 24 kDa, 29 kDa, a 31-32 kDa doublet and a 39-41 kDa triplet which were differently regulated by DEX. Immunoblotting showed that following DEX exposure, IGFBP-3 and -6 were up-regulated whereas IGFBP-2, -5 and the 24 kDa band were down-regulated. The effect of DEX on both differentiation and IGFBP production showed a same dependence and developed when extracellular matrix maturation has been just induced. The results obtained in this chondrocyte culture system show that production of IGFBPs is modulated by DEX at physiological concentrations thus regulating IGF availability and action, a control which could promote the primordial role of the rat nasal septum in craniofacial growth.

Key words : chondrocyte, dexamethasone, IGFBP, mineralization.

Introduction

Glucocorticoid hormones play an essential role in tissue differentiation during development, by regulating the expression of genes that control development [Rousseau, 1984]. The influence of the glucocorticoids on expression of cartilage phenotype has been shown to be diverse in several model systems. For example, it has been demonstrated that glucocorticoids, at physiological concentrations, are essential for cartilage phenotype expression and maintain the integrity of cartilage matrix in organ culture, isolated primary cell populations, and rat chondrosarcoma cells [Horton et al., 1988 ; Takano et al., 1985 ; Bellows et al., 1989 ; Jennings and Ham, 1983 ; Kato and Gospodarowicz, 1985 ; Grigoradis et al., 1989]. Conversely, some studies have documented glucocorticoid-induced suppression of cartilage phenotype markers, both *in vitro* and *in vivo* [Silbermann, 1987 ; Grigoradis et al., 1996 ; Jux et al., 1998]. In that respect, the fetal rat system is particularly interesting : (i) there is a peak of fetal secretion of glucocorticoids between 17 and 20 days of gestation [Cohen, 1973 ; Henning, 1978], and (ii) during this particular period, the first centers of ossification arise [Johnson, 1993]. GC have been shown to be implicated in the maturation of several fetal tissues and could mediate these effects by modulate the IGF/IGFBP system. We have previously shown that the IGF system participate both to cell proliferation and glycogen storage, in cultured fetal rat hepatocytes [Menuelle et al., 1999]. Furthermore, both *in vivo* and *in vitro* studies demonstrate a participation for the IGF system in liver maturation (see discussion in Menuelle et al., 1999). Indeed during fetal life, serum levels of IGF-II are elevated [Moses et al., 1980], together with the strong expression of IGF-II mRNA in the liver [Daughaday et al., 1989], the main site of IGF production. The liver IGF-II production declines rapidly after birth, as well as the IGF-II serum level which is progressively replaced by IGF-I, a factor mediating GH action [Daughaday et al., 1989 ; Trippel, 1992].

Despite extensive research, no specific endocrine mechanism has as yet been identified in fetal growth which would play a role similar to GH established in postnatal growth. Consequently, several autocrine and paracrine actions of growth factors, especially the IGFs, were proposed to

control postnatal fetal growth (reviewed in Chard, 1994). IGFs (IGF-I and IGF-II) play essential role in cell metabolism, proliferation and differentiation, hence have major effects on fetal and postnatal development and organogenesis in mammals [Underwood and D'Ercole, 1984 ; Humbel, 1990]. Historically, the developmental impact of insulin-like growth factors (IGFs) has been initially discovered in cartilage by their ability to promote sulfate incorporation into proteoglycans [Salmon and Daughaday, 1957]. High levels of IGF-II gene expression are reported in growth plate chondrocytes in embryonic rodents [Wang et al., 1995] and chondrocytes in culture [Froger-Gaillard et al., 1989]. IGF-II stimulates clonal growth of human fetal chondrocytes [Vetter et al., 1986], as well as DNA and proteoglycan synthesis in cultured rabbit costal chondrocytes [Kato and Gospodarowicz, 1985 ; Trippel, 1992 ; Takigawa et al ; 1997]. On the other hand, the actions of both IGF-I and -II are modulated by non-covalent association with high affinity insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP-1 to -6) [Clemmons, 1998]. IGFBP-2 to -5 can be submitted to limited proteolysis which modulates IGF bioavailability [Binoux et al., 2000]. The regulation of the expression of IGFBPs has been characterized in chondrocytes of many species and several culture conditions : articular chondrocytes in human [Olney et al., 1995 ; DiBattista, 1996] rabbit [Froger-Gaillard et al., 1989], bovine [Olney et al., 1993 ; Morales, 1997], ovine [Sunic et al., 1998] and rat species [Matsumoto et al., 1996b] as well as human growth plate cartilage [Matsumoto et al., 2000], rabbit [Koedam et al., 2000], bovine [Olney et al., 1993 ; Olney and Mougey, 1999], ovine [Sunic et al., 1995 ; Borromeo et al., 1996 ; De los Rios and Hill, 2000] and mouse species [Bhaumick, 1993]. Despite these characterizations, no information concerning IGFBPs produced by rat growth plate chondrocytes is available. The developmental pathway of skeleton and growth diverge depending on its anatomical site. The cranio-facial skeleton derives from cephalic neural crest while the axial and appendicular ones are of mesodermal origin. All previously reported studies were performed on mesoderm-derived chondrocytes. Our work focuses on rat nasal septum cartilage, this cartilage acts as a pacemaker for the growth of the skull and the face [Scott, 1953 ; Wang et al., 1999]. Nasal septum cartilage is derived from a primordial cartilagenous mass called the chondrocranium, which originates from cephalic neural crests. The present study was performed in

order to investigate whether glucocorticoids together with IGFs could participate to this skeletal maturation.

We used cultured chondrocytes isolated from nasal septum cartilage of fetal rat which recapitulate the *in vivo* progressive acquisition of the chondrocyte phenotype until extracellular matrix mineralization is achieved [Sautier et al., 1993 ; Kergosien et al., 1998]. The secretion and regulation of IGFBP production by fetal chondrocytes from nasal septum cartilage of 17.5-day-old fetal rats were characterized in correlation with the influence of dexamethasone on the biomineralization of the extracellular matrix of these cells.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Culture Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) was purchased from Gibco (Grand Island, NY) and fetal calf serum was from Biosys (Compiègne, France). Antibiotics were obtained from Boehringer (Mannheim, Germany) and $^{45}\text{CaCl}_2$ (10-40 mCi/mg calcium) and [^{35}S]sulfate (20-40 Ci/mg of sulfur), from Amersham (Buckinghamshire, England). Collagenase, hyaluronidase and dexamethasone were purchased from the Sigma Chemical Co (St Louis, MO). Rabbit antisera raised against rat anti-IGFBP-2, -3, and -6 were kindly provided by S. Shimasaki, La Jolla, CA. hIGFBP-5 goat polyclonal antibody was purchased from Santa Cruz Biotechnology Inc., Ca. Antirabbit IgG polyclonal antibody coupled to horseradish peroxidase was purchased from the Sigma Chemical Co (St Louis, MO). Antigoat IgG polyclonal antibody coupled to horseradish peroxidase was purchased from Santa Cruz Biotechnology Inc., Ca.

Culture procedure

Chondrocytes were isolated as previously described [Sautier et al., 1993]. Briefly, nasal septa cartilages from 17.5-day-old fetal rats (Sprague Dawley) were dissected and dissociated enzymatically in a mixture of 0.25% collagenase (type I) and 0.1% hyaluronidase in phosphate-

buffered saline (PBS) for 2 h at 37°C. Cells were then dissociated from partially digested cartilage fragments by repeated pipetting, total cell dissociation being rapidly obtained. After three washes in PBS, cells were counted and seeded at a final density of 2×10^4 cells/cm² in DMEM culture medium supplemented with 10% fetal calf serum, 50 UI/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin, 50 µg/ml ascorbic acid. The non-adhering cells were removed 4 h after plating. Cells were cultured in a humidified atmosphere containing 95% ambient air and 5% CO₂ at 37°C. The medium was replaced every 48 h and experiments were initiated at two different times of culture. After 6 and 10 days of culture (time zero of the experiments), i.e. before or at the beginning of the initiation of matrix nodule mineralization, the medium was replaced by a medium deprived of serum and containing or not dexamethasone. 24 h later, β-glycerophosphate was added, and cells were cultured for a further 16 h period. At time 40 h for each set of experiments, i.e. at 8 and 12 days of culture, biochemical tests were performed.

Calcium incorporation into cell layer

Experiments were performed in the presence of ⁴⁵CaCl₂ (5 µci/ml), the total calcium concentration of the medium being 2 mM. Cells were incubated for 6 h with ⁴⁵CaCl₂ in serum-free medium supplemented with DEX. At the end of the incubation, cells were rapidly washed 4 times with serum-free medium and incubated at 37°C for five successive periods of 4 min. This chase step allowed the release of rapidly exchangeable ⁴⁵Ca [Anagnostou et al., 1996]. The high rate of the early ⁴⁵Ca release progressively decreased and might correspond to the slow turnover rate of ⁴⁵Ca deposits (result not shown). Cells were then washed once with PBS at 4°C, and the radioactive material of the cell layers was extracted in 10% formic acid for 24 h at room temperature [Bellows et al., 1991]. Aliquots were used to determine ⁴⁵Ca counts by liquid scintillation spectrometry. The results are expressed as micromole of calcium per milligram of cell protein.

Determination of the rate of proteoglycan synthesis

Proteoglycan synthesis was determined by measuring the incorporation of [³⁵S]sulfate in glycosaminoglycans, as previously described [Kato et al., 1980]. Briefly, the cells were labeled with 5 µCi/ml [³⁵S]sulfate for 6 h. After labeling, the cells were digested by pronase E, and the radioactivity in the material precipitated with cetylpyridinium chloride was measured in a scintillation counter.

Alkaline phosphatase activity

Alkaline phosphatase activity was determined in cell extracts and culture medium by measuring the pNPPase activity as previously described [Anagnostou et al., 1996]. Briefly, cells were harvested using a rubber policeman and solubilized in the assay buffer containing 0.2% Nonidet P-40. Then they were sonicated with 0.6 s/35W pulses at 4°C, and the pNPPase activity was determined on aliquots.

Western ligand blotting

The conditioned media obtained from cultures conducted in parallel with morphological and biochemical studies, were analyzed by Western ligand blotting according to previously described [Hossenlopp et al., 1986]. Briefly, lyophilized samples (0.750 µl equivalent of conditioned medium) were submitted to 12.5% SDS-PAGE under non-reducing conditions, followed by electrotransfer to nitrocellulose. The different IGFBP species were detected by incubation with a mixture of [¹²⁵I]IGF-I and [¹²⁵I]IGF-II and revealed by autoradiography. Molecular weights were calculated using broad range markers (Bio-Rad SA, Marnes-la-Coquette, France). Quantification of the bands on the blots was performed by phospho-imaging.

Immunoblotting

After SDS-PAGE and transfer to nitrocellulose, the blots were probed as previously described [Hossenlopp et al., 1986]. using rabbit anti-rat IGFBP-2, -3 and -6 at 1/400 dilution (generous gift from Shunichi Shimazaki [Liu et al., 1993] and goat anti-human IGFBP-5 and -4 at 1/100 dilution. The anti-rabbit IgG antibody-horseradish peroxydase conjugate at 1/5000 dilution and the antigoat IgG antibody-horseradish peroxydase conjugate at 1/1000 dilution were added to bind the immunocomplexes, which were then visualized by chemiluminescence (ECL) and Hyperfilm ECL film (Amersham, Les Ulis, France).

Definitions

For the responses to dexamethasone, a “stimulation index“ was used, defined as the ratio of the values obtained for treated cultures to the values obtained for controls. For each protocol considering biochemical tests at least three independent experiments were performed on different cell preparations. Data are expressed as mean \pm SD of triplicate culture measurements. Student’s test for paired samples was used for statistical analyses of treated cultures and corresponding controls. For Western blotting, at least two different samples were measured at least twice, representing a minimum of four points for each experimental condition.

RESULTS

Biom mineralization during cartilage cell culture

^{45}Ca incorporation into cell layers, previously used as an index of mineralization [Bellows et al., 1991 ; Anagnostou et al., 1996], was investigated at different times of culture using a 6 h-pulse in the presence of ^{45}Ca . A source of Pi was introduced as β -glycerophosphate at 10 mM. ^{45}Ca incorporation was measured during the last 6 h of the 16 h period of β -glycerophosphate presence. ^{45}Ca incorporation was not detectable at day 5 of culture, and became measurable at day 8 and increased 2.5 times between day 8 and day 12 to decrease after day 16 (Fig. 1, A). Alkaline

phosphatase activity in cell extracts and culture medium followed the same pattern as ^{45}Ca incorporation (Fig. 1, B and C). The culture periods of day 6-8 and day 10-12 were thus chosen to study the dexamethasone effect on extracellular matrix mineralization.

Effect of DEX on morphological aspects

Day 6 and 10 culture times corresponded to stages preceding and just at the onset of chondrocyte extracellular matrix maturation, respectively (Fig. 2, a and e). After 40 h of culture in the absence of DEX, an increase of matrix volume appeared as refringent material in phase contrast (Fig. 2, b and f) and stained by alcian blue (Fig. 3, a and c), concomitantly to appearance of von Kossa staining revealing the onset of extracellular matrix mineralization (Fig. 3, e and g). DEX induced an enlargement of three dimensional nodules formed and increased their refringent aspect at 1 and 10 nM DEX, while the beneficial effect of DEX was attenuated for upper concentrations, as seen by phase contrast examination (data not shown). These observations were completed by alcian blue staining, in presence of the more efficient concentration of 10 nM DEX. Obtained results supported the increase of extracellular matrix volume and proteoglycan accumulation (Fig. 3, b and d). Finally, von Kossa staining confirmed a stage- and DEX-dependent nodule size increase regarding the extent of extracellular matrix mineralization, mainly at day 12 (Fig. 3, f and h). Thus, DEX-induced increase of matrix maturation was associated with biomineralization in chondrocyte cultures.

Effect of dexamethasone on biomineralization

Increasing concentrations of DEX were added in culture medium at day 6 and day 10 for a period of 40 h. When ^{45}Ca incorporation was measured for the last 6 hours at day 12, a clear stimulation by DEX was already observed at 1 nM and maximal at 10 nM (stimulation index : 1.71 ± 0.20) (Fig. 4 A). In parallel experiments the incorporation of [^{35}S]sulfate into newly synthesized proteoglycans, which is known to be a biochemical marker of differentiated phenotype of

chondrocytes, and cellular alkaline phosphatase activity were measured (Fig. 4, B and C). Like ^{45}Ca incorporation they showed a maximal stimulation at 10 nM DEX (stimulation index : 1.55 ± 0.19 and 1.24 ± 0.13 , respectively). At day 8, all the biological effects studied appeared not to be significantly stimulated. It must be noted that in all these experiments the protein content was not modified by physiological concentrations of DEX, suggesting an absence of DEX effect on cell proliferation (result not shown). Thus the three parameters of chondrocyte biomineralization were equally regulated considering either the stage of culture or the dose dependence of the DEX stimulation.

Analysis of IGFbps secreted into the culture media

The IGFbps secreted into the culture media in the presence or absence of DEX were analyzed by Western ligand blotting at the two critical stages of culture differentiation. In media conditioned in the absence of DEX, IGFbps appeared as two major bands corresponding to a 39-41 triplet and a 31-32 kDa doublet and two minor-ones at 24 and 20 kDa, respectively (Fig. 5, A). At day 12, a weak 29 kDa band was present. In the presence of DEX, the 39-41 kDa triplet showed a biphasic effect at day 12 of culture with a maximal stimulation at 10 nM. Such an effect was not evidenced at day 8 (Fig. 5, A and B). The 31-32 kDa doublet and the 24 kDa band revealed a progressive dose-dependent decrease in the presence of DEX which was more pronounced at day 12 than at day 8. Reversely, the 20 kDa band showed a progressive increase as a function of DEX concentration, an effect even more accentuated in more differentiated cells. Thus, a differential DEX regulation for IGFBP expression was presently identified, which progressively emerged during chondrocyte maturation.

In order to further characterize IGFbps, the same conditioned media were also subjected to Western immunoblot analysis. As reported in other cell type and culture systems, native and degraded entities were identified based on their molecular weight profiles : a 32 kDa and a 18 kDa for IGFBP-2, a 39-41 triplet and a 27-29 doublet for IGFBP-3, a 29 kDa and a 20 kDa for IGFBP-5, a 27 kDa band as IGFBP-6. The 24 kDa band whose the apparent molecular weight is analog to that of the nonglycosylated form of IGFBP-4 [Grigoradis et al., 1989; Sunic et al., 1998] failed to be

recognized by an human IGFBP-4 antiserum and presented no cross-reactivity with any of the other antisera used. In basal conditions, the IGFBP-2 to -6 were expressed by chondrocytes. It should be noted that it is the first time that IGFBP-6 was identified in fetal rat cartilage, although it has been revealed in organotypic cultures of adult bovine articular cartilage [Morales, 1997]. Among the degraded entities, the 15 kDa IGFBP-2 fragment may be specific to mineralized tissues as it was not evidenced in non-mineralizing articular cartilage [Borromeo et al., 1996] and reported in fetal rat calvaria cells [McCarthy, 1994]. The 27-29 kDa doublet IGFBP-3 degradation product is found in human osteoblast-like cells [Lalou et al., 1994 ; Binoux et al., 2000]. The 20 kDa IGFBP-5 fragment is found in cultured fetal rat osteoblast cells [Chen et al., 1995] and in adult articular rat chondrocytes [Matsumoto et al., 1996a]. In regard to its capacity to bind [¹²⁵I]IGFs and its molecular mass, it can be postulated that this degradation fragment corresponds to the amino-terminal IGFBP-5¹⁻¹⁶⁹ fragment present in chronic renal failure serum and implicated in adult rat growth plate chondrocyte proliferation [Kiepe et al., 2001].

The two identified entities of IGFBP-2 appeared to show a dose-dependent decrease by DEX (1-100 nM) while those of IGFBP-3 presented, at day 12, a maximal increase at 10 nM DEX. Reversely, intact IGFBP-5 was decreased by DEX while the 20 kDa degradation product accumulated correlatively. DEX regulated diversely IGFBP-6 and IGFBP-4, with an increased and decreased expression, respectively. This complementary characterization of IGFBPs by Western blotting in our culture system validated the dose-dependent effects of DEX shown by Western ligand. Thus, a differential DEX regulation for IGFBP expression was presently identified, which progressively emerged during chondrocyte maturation.

DISCUSSION

Primary cultures of chondrocytes derived from fetal rat nasal septum cartilage, when cultured for less than 2 weeks in the presence of ascorbic acid and organic phosphate, reveal cell growth and differentiation resulting in the formation of macroscopic three-dimensional nodules of calcified cartilage [Sautier et al., 1993]. Using this system, we showed that the synthetic glucocorticoid DEX increased proteoglycan sulfatation, alkaline phosphatase activity and calcium deposition, three parameters of chondrocyte extracellular matrix maturation and mineralization, DEX effects being greater in more differentiated cells. In these chondrocyte primary cultures, it is obvious that DEX could not exert its differentiating effects before the extracellular matrix was engaged into its maturation program. Such a result is in agreement with previous reports in which glucocorticoids have been shown to increase proteoglycan synthesis in rabbit costal chondrocytes [Takano et al., 1985 ; Kato and Gospodarowicz, 1985], a model which however and conversely to ours, does not mineralize. Furthermore, the present maximally effective concentration (10 nM) and EC_{50} (1 nM) place this response unambiguously within the physiological range. Indeed, DEX appears to have a more efficient glucocorticoid activity when compared to corticosterone, the major glucocorticoid circulating in rat [Thompson et al., 1980]. The concentration found to cause a maximal response in 17.5-day-old-fetal rat chondrocytes was therefore similar to the plasma level of free glucocorticoids they would have been exposed to *in vivo* [Cohen, 1973]. Thus, this *in vitro* study suggests that glucocorticoids are implicated in endochondral mineralization process during late gestation period. One pathway of glucocorticoid action is the regulation of the IGF/IGFBP system. As IGFBP modulation plays a primordial role in IGF biological effects, the characterization of the IGFBP production was performed in our culture model.

To the best of our knowledge, the analysis of IGFBP released by chondrocytes isolated from fetal rat nasal septum has never been performed before ; in rat, only IGFBPs secreted by cultured adult articular chondrocytes has been analyzed [Kiepe et al., 2001]. In the present study, under

serum-free conditions, in conditioned media obtained in basal conditions, IGFBP-2 to -6 were detected. *In situ* reports in murine rib growth plate cartilage suggest that only mRNAs of IGFBP-5 and IGFBP-6 are expressed, primarily in the early stages of chondrogenesis [Wang et al., 1995]. But more recent studies, concerning ovine fetal epiphyseal growth plate, revealed the presence of mRNA for IGFBP-2 to -6 [De los Rios and Hill, 1999]. These results do not preclude the specific site of IGFBP production at the level of rat nasal septum. Further study will be necessary to clarify the origin of the differences observed in various species, types of cartilage, maturation stage or experimental procedure. In the present work important amounts of IGFBPs (-2 to -6) were secreted by cultured rat nasal septum chondrocytes, even in basal conditions, conversely to that found in other chondrocyte models, as for example in newborn rabbit growth plate [Koedam et al., 2000]. Thus differences may be related either to species-specific variations, rabbit [Koedam et al., 2000], versus rat (this study) or to site-specificity of cartilage associated with their differential origins, neural crest (this study) *versus* mesoderm (all other studies).

Glucocorticoids as well as IGFs have important effects on mineralized tissues, often opposite on IGFBP regulation, and thus the IGF/IGFBP system is believed to be implicated in the pathway of glucocorticoid action [Canalis, 1998 ; Jux et al., 1998]. The physiological roles of IGFBPs in many cell types have been reported but the regulation by physiological glucocorticoid concentrations of released IGFBPs has not been investigated before in rat chondrocytes in culture. We found that Dex addition, at the initiation period of extracellular matrix maturation, induced in a dose-dependent manner a biphasic effect on IGFBP-3 (stimulatory until 10 nM at physiological concentrations), a down-regulation of IGFBP-2, -5 and probably IGFBP-4, and an up-regulation of IGFBP-6. In newborn rabbit costal chondrocyte cultures when stimulated by DEX, a similar regulation pattern of IGFBP-5 and the peculiar biphasic one of IGFBP-3 are found [Koedam et al., 2000]. In fetal ovine chondrocyte cultures, cortisol decreased the abundance of IGFBP-2 and -5 mRNAs and peptide release and increased IGFBP-3 mRNAs, but observed only at supraphysiological concentrations of glucocorticoids [De los Rios and Hill, 2000] when compared to the circulating concentrations in ovine fetus [Li et al., 1993]. Thus, a local modulation of IGFBP

balance by glucocorticoids within the septum nasal cartilage could regulate IGF bioavailability and action, if we referred to already described IGF/IGFBP mode of action [reviewed in Collet-Solberg and Cohen, 2000]. IGFBP proteolysis generated IGFBP degradation products. The residual ability of these IGFBP fragments to bind IGF-I and -II may or may not be physiologically significant depending on their concentration. Indeed, despite their weak affinities for IGFs, they might allow a competition with IGF-receptor and IGFBP native forms or developed their intrinsic activities [Binoux et al., 2000].

In our cultured fetal chondrocytes undergoing terminal differentiation, the downregulation of IGFBP-2 by DEX, which was mainly on its 18 kDa degraded form, may have a physiological significance during chondrogenic differentiation. Few data are available about IGFBP-2 regulation in growth plate *in vivo* as well as *in vitro*. The precise regulation by DEX of IGFBP-3 and its 30 kDa carboxy-truncated fragment, in the present study, may be relevant and related to an important role of this IGFBP during extracellular matrix mineralization. IGFBP-3 can promote or inhibit growth, effects being either IGF-mediated or IGF-independent [Collet-Solberg and Cohen, 2000]. In a mesenchymal chondrogenic cell line, IGF-independent and -dependent effects of IGFBP-3 on chondrocyte proliferation associated with chondrocyte differentiation are evidenced [Spagnoli et al., 2000]. The present maturation stage-specific results suggest that only the IGF-dependent effect of IGFBP-3 was DEX-regulated. Indeed, IGFBP-3 DEX regulation was absent when matrix maturation was not engaged and IGFBP-3 DEX regulation was present when matrix maturation was engaged. Besides, the increase of chondrocyte biomineralization correlated with IGFBP-3 regulation and occurred apparently without affecting proliferation. Also, conversely to IGFBP-3, IGFBP-5 was decreased by DEX and its degradation fragment accumulated. Although the role of IGFBP-5 in articular chondrocytes is uncertain, it is possible that the IGFBP-5 protease acts on IGFBP-5 to release bioactive IGF peptides. In cultured epiphyseal rat chondrocytes, the 20 kDa degradation fragment inhibits cell proliferation whereas intact IGFBP-5 stimulates this process [Kiepe et al., 2001]. Divergent results were obtained in cultured human osteoblast-like cells, where the 23kDa carboxy-truncated fragment of IGFBP-5 stimulated mitogenesis [Andress et al., 1992].

Thus, in our culture model, where the amino-terminal form of IGFBP-5 accumulated under DEX stimulation, the ratio between intact and degraded IGFBP-5 forms may be important in preserving the cartilage-to-bone developmental sequence necessary for endochondral mineralization. The opposite regulation of IGFBP-3 and -5 by DEX is in agreement with the results obtained in immortalized human chondrocytes where the balance IGFBP-3/-5 influences chondrocyte proliferation and thereby cartilage metabolism [Matsumoto et al., 1996b]. Concerning IGFBP-6, its increase by DEX is in agreement with the one found in rat osteoblasts [Gabbitas and Canalis, 1996]. O-glycosylation of IGFBP-6 impedes its degradation [Bach, 1999]. Prenatally, IGFBP-6 mRNA identification in rat and mouse development shows that IGFBP-6 mRNAs are expressed in sites of cell differentiation and proliferation [Cerro et al., 1993]. However, it is noteworthy that IGFBP-6 is associated with quiescence or non-proliferation in many *in vitro* systems, showing its possible role as an autocrine inhibitor of cell proliferation [reviewed in Bach, 1999]. Our results suggest that DEX could act as a differentiating agent by increasing IGFBP-6 levels which may tightly regulate the effects of IGF-II.

In conclusion, in primary cultures of chondrocytes derived from fetal rat nasal septum cartilage, the precise regulation of IGFBPs and their degradation fragments considering their physiological functions, seemed to be in favour of Dex differentiating effects. The differential regulation of IGFBPs expressed by cartilage may be relevant to the pleiotrophic effects of glucocorticoids. The nasal septum being essential for the growth of the face, the developmental DEX regulation of IGFBP balance could allow an equilibrated balance between proliferation and differentiation and thus promote a normal craniofacial growth.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are indebted to Dr Michel Binoux and Pr Jean Michel Sautier for helpful discussions. They also thank Emile Marie-Rose for skillful secretariat and graphism assistance. This work was supported by the “Institut National de la santé et de la Recherche Médicale”.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1

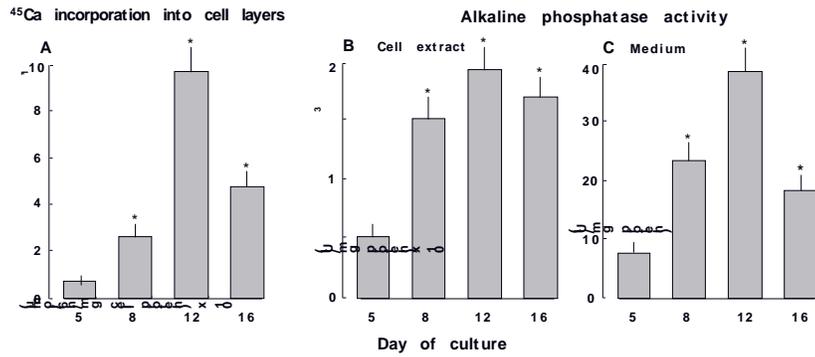


FIG. 1 : ⁴⁵Ca incorporation into cell layers and ALP activity during the culture period. At different times of the culture performed in the absence of DEX (5-16 days), the medium was replaced by a fresh medium deprived of serum and containing 10 mM β -glycerophosphate. 12 h later, the medium was renewed by an identical one but supplemented with ⁴⁵Ca (5 μ Ci/ml). ⁴⁵Ca incorporation into cell layers was measured 6 h later (A). In parallel cultures grown in the absence of ⁴⁵Ca, ALP activity in cell extracts (B) and culture medium (C) was measured. Statistical significance is represented by * for $P < 0.001$, as referred to corresponding cultures for 5 days.

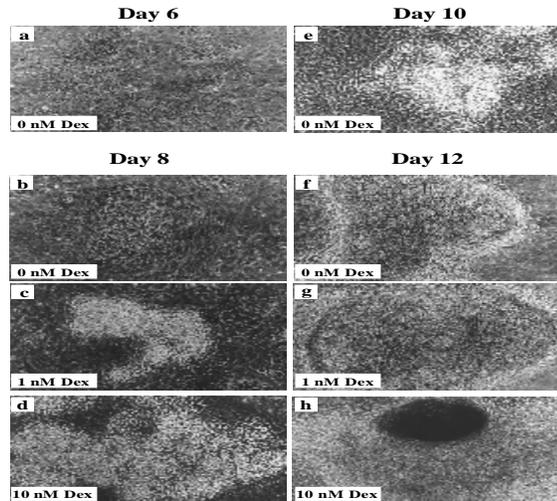
Figure 2

FIG. 2 : Phase contrast study of mineralizing rat chondrocyte cultures in the absence and presence of DEX. At day 6 or day 10 of culture, the medium was replaced by a fresh medium deprived of serum and containing or not 1 or 10 nM DEX, 10 mM β -glycerophosphate being added 24 h after DEX addition. Phase contrast study was performed at day 6 and day 10 of culture (a and e), and after 40 h of presence of DEX solvent (b and f) or DEX at 1 nM (c and g) and 10 nM (d and h), i.e. at day 8 and day 12 of culture (x 100).

Figure 3

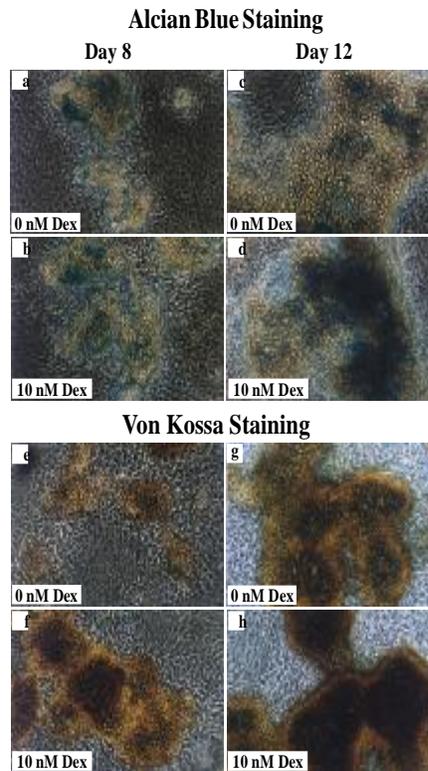


FIG. 3 : Influence of Dex on Alcian blue and von Kossa staining of chondrocyte cultures. At day 6 or day 10 of culture, the medium was replaced by a fresh medium deprived of serum and containing 10 nM DEX or ethanol vehicle, 10 mM β -glycerophosphate being added 24 h after DEX addition. After 40 h of presence of DEX solvent (a, c, e, g) or 10 nM DEX (b, d, f, h), Alcian blue (a-d) and von Kossa staining (e-h) was performed (x 100).

Figure 4

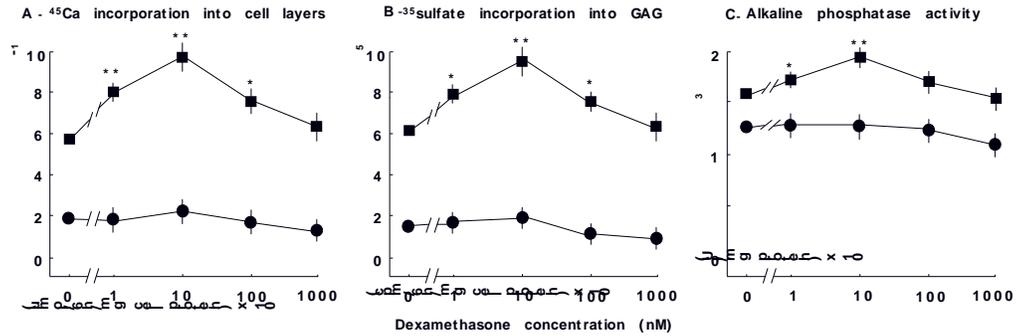
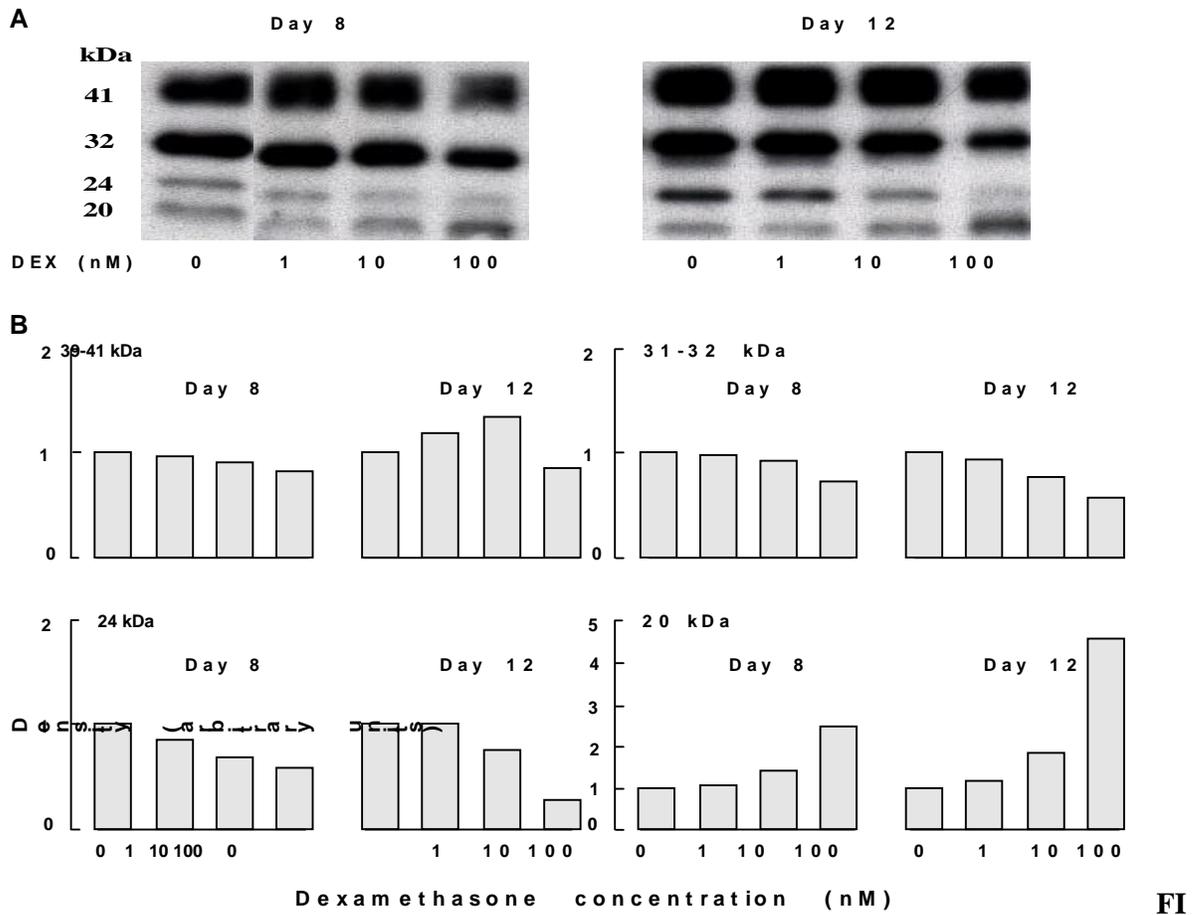


FIG. 4 : Dose dependence of DEX effect on ^{45}Ca incorporation into cell layers, proteoglycan synthesis and ALP activity. At day 6 or day 10 of culture, the medium was replaced by a fresh medium deprived of serum and containing increasing concentrations of DEX from 1 nM to 1 μM or ethanol vehicle, β -glycerophosphate at 10 mM being added 24 h after DEX addition. 34 h after DEX addition, the medium was renewed by an identical one but supplemented either with ^{45}Ca (5 $\mu\text{Ci/ml}$) or [^{35}S]sulfate (5 $\mu\text{Ci/ml}$). ^{45}Ca incorporation (A), [^{35}S]sulfate incorporation (B), and ALP activity (C) was measured 6 h later. The symbols correspond to day 6 (I) or day 10 (n) culture times followed by 40 h treatment with DEX. Statistical significance is represented by * for $P < 0.01$, and ** for $P < 0.001$, as referred to corresponding cultures grown in the absence of DEX.

Figure 5



G. 5 : Analysis of IGF-BPs in media conditioned by fetal rat chondrocytes cultured in presence or absence of DEX. From day 6 or day 10 of culture, cells were cultured in medium deprived of serum with and without increasing concentrations of DEX (1 nM to 100 nM) for 40 h, serum-free medium being renewed after 16 h. Samples of media conditioned during the last 24 h were submitted (0.750 ml eq/slot) to SDS-PAGE (12.5 %) under nonreducing conditions and transferred to nitrocellulose.

Autoradiogram of the Western ligand blot are shown in (A), the migrations of molecular size markers being indicated on the left. Lower panels show the quantification of separate bands on the blot by phospho-imaging (B). The results show the average of a typical experiment performed in duplicate.

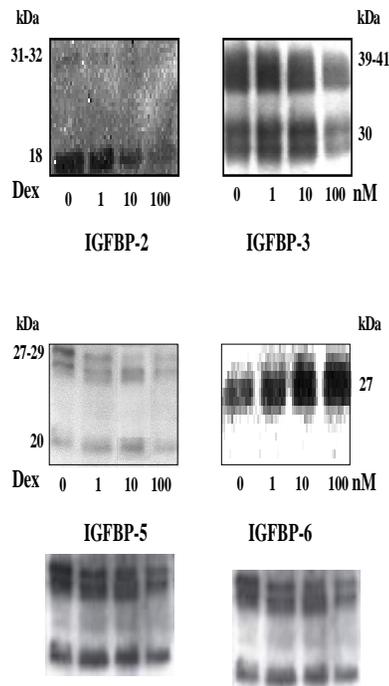


FIG. 6 : Immunoblotting of IGFBPs. From day 10 of culture, cells were cultured in medium deprived of serum with and without increasing concentrations of DEX (1 to 100 nM) for 40 h, serum-free medium being renewed after 16 h. Samples of media conditioned during the last 24 h were submitted (0.750 ml eq/slot) to SDS-PAGE (12.5 %) under nonreducing conditions and transferred to nitrocellulose. The blots were probed with IGFBP-2, -3, -5 and -6 antibodies as described in Materials and Methods.

REFERENCES

- Anagnostou F, Plas C, Forest N. 1996. Ecto-alkaline phosphatase considered as levamisole-sensitive phosphohydrolase at physiological pH range during mineralization in cultured fetal calvaria cells. *J Cell Biochem* 60:484-494.
- Andress DL, Birnbaum RS. 1992. Human osteoblast-derived insulin-like growth factor (IGF) binding protein-5 stimulates osteoblast mitogenesis and potentiates IGF action. *J Biol Chem* 267:22467-22472.
- Bach LA 1999 Insulin-like growth factor binding protein-6 :The “forgotten“ binding protein ? *Horm Metab Res* 31:226-234.
- Bellows CG, Aubin JE, Heersche JNM. 1991. Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed in vitro: the role of alkaline phosphatase and organic phosphate. *Bone and Mineral* 14:27-40.
- Bellows CG, Heersche JNM, Aubin JE. 1989. Effects of dexamethasone on expression and maintenance of cartilage in serum-containing cultures of calvaria cells. *Cell Tissue Res* 256:145-151.
- Bhaumick B. 1993. Insulin-like growth factor (IGF) binding proteins and insulin-like growth factor secretion by cultured chondrocyte cells: identification, characterization and ontogeny during cell differentiation. *Regulatory peptides* 48:113-122.
- Binoux M, Lalou C, Mohseni-Zadeh S. 2000. Biological actions of proteolytic fragments of the IGF binding proteins. In : Rosenfeld R and Roberts C (ed) *Contemporary endocrinology : The IGF system*, Humana press, pp. 281-313.
- Borromeo V, Bramani S, Holder AT, Carter C, Secchi C, Beattie J. 1996. Growth hormone stimulates the secretion of insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) by monolayer cultures of sheep costal growth plate chondrocytes. *Mol Cell Biochem* 162:145-151.
- Canalis E. 1998. Inhibitory actions of glucocorticoids on skeletal growth. Is local insulin-like growth factor-I to blame ? *Endocrinology* 139:3041-3042.
- Cerro JA, Grewal A, Wood TL, Pintar J. 1993. Tissue-specific expression of the insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) mRNAs in mouse and rat development. *Regulatory peptides* 48:189-198.
- Chard T 1994 Insulin-like growth factors and their binding proteins in normal and abnormal human fetal growth. *Growth Regul* 4:91-100.
- Chen Q, Johnson DM, Haudenschild DR, Goetinck PF. 1995. Progression and recapitulation of the chondrocyte differentiation program : cartilage matrix protein is a marker for cartilage maturation. *Developmental Biology* 172:293-306.
- Clemmons DR. 1998. Role of insulin-like growth factor binding proteins in controlling IGF actions. *Mol Cell Endocrinol* 140:19-24.
- Cohen A. 1973. Plasma corticosterone concentration in the foetal rat. *Horm Metab Res* 5:66.

- Collett-Solberg PF, Cohen P. 2000. Genetics, chemistry, and function of the IGF/IGFBP system. *Endocrine* 12:121-136.
- Daughaday WH, Rotwein P. 1989. Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocr Rev* 10:68-91.
- De los Rios P, Hill DJ. 1999. Cellular localization and expression of insulin-like growth factors (IGFs) and IGF binding proteins within the epiphyseal growth plate of the ovine fetus: possible functional implications. *Can J Physiol Pharmacol* 77:235-249.
- De los Rios P, Hill DJ. 2000. Expression and release of insulin-like growth factor binding proteins in isolated epiphyseal growth plate chondrocytes from the ovine fetus. *J Cell Physiol* 183:172-181..
- DiBattista JA, Dore S, Morin N, Abribat T. 1996. Prostaglandin E2 up-regulates insulin-like growth factor binding protein-3 expression and synthesis in human articular chondrocytes by a c-AMP-independent pathway : role of calcium and protein kinase A and C. *J Cell Biochem* 63:320-333.
- Froger-Gaillard B, Hossenlopp P, Adolphe M, Binoux M. 1989. Production of insulin-like growth factors and their binding proteins by rabbit articular chondrocytes : relationship with cell multiplication. *Endocrinology* 124:2365-2372.
- Gabbitas B, Canalis E. 1996. Cortisol enhances the transcription of insulin-like growth factor-binding protein-6 in cultured osteoblasts. *Endocrinology* 137:1687-1692.
- Grigoriadis AE, Aubin JE, Heersche JNM. 1989. Effects of dexamethasone and vitamin D₃ on cartilage differentiation in a clonal chondrogenic cell population. *Endocrinology* 125:2103-2110.
- Grigoriadis AE, Heersche JNM, Aubin JE. 1996. Analysis of chondroprogenitor frequency and cartilage differentiation in a novel family of chondrogenic rat cell lines. *Differentiation* 60:299-307.
- Henning SJ. 1978. Plasma concentrations of total and free corticosterone during development in the rat. *Am J Physiol* 235:E451-E456.
- Horton Jr WE, Cleveland J, Rapp U, Nemuth G, Bolander M, Doege K, Yamada Y, Hassell JR. 1988. An established rat cell line expressing chondrocyte properties. *Exp Cell Res* 178:457-468.
- Hossenlopp P, Binoux M. 1994. Use of peptide ligands for the detection of binding proteins by Western blotting. In : BS Dugar (ed) *Protein blotting : a practical approach*, Oxford University Press, pp. 169-186.
- Hossenlopp P, Seurin D, Segovia-Quison B, Hardouin S, Binoux M. 1986 . Analysis of insulin-like growth factor binding proteins using Western blotting : Use of the method of titration of the binding proteins and competitive binding studies. *Anal Biochem* 154:138-143.
- Humbel RE. 1990. Insulin-like growth factors I and II. *Eur J Biochem* 190:445-462.
- Jennings SD, Ham RG. 1983. Clonal growth of primary cultures of human hyaline chondrocytes in a defined medium. *Cell Biol Int Rep* 7:149-159.
- Johnson,ML. 1933. The time and order of appearance of ossification centers in the albino mouse. *Am J Anat* 52:241-271.
- Jux C, Leiber K, Hügel U, Blum W, Ohlsson C, Klaus G, Mehls O. 1998. Dexamethasone impairs growth hormone (GH)-stimulated growth by suppression of local insulin-like growth factor

- (IGF)-I production and expression of GH- and IGF-I-receptor in cultured rat chondrocytes. *Endocrinology* 139:3296-3305.
- Kato Y, Gospodarowicz D. 1985. Stimulation by glucocorticoids of the synthesis of cartilage matrix proteoglycans produced by rabbit costal chondrocytes in vitro. *J Biol Chem* 260:2364-2373.
- Kato Y, Nomura Y, Daikuhara Y, Nasu N, Tsuji M, Asada A, Suzuki F. 1980. Cartilage-derived factor (CDF). *Exp Cell Res* 130:73-81.
- Kergosien N, Sautier JM, Forest N. 1998. Gene and protein expression during differentiation and matrix mineralization in a chondrocyte cell culture system. *Calcif Tissue Int* 62:114-121
- Kiepe D, Andress DL, Mohan S, Ständker L, Ulinski T, Himmele R, Mehls O, Tönshoff B. 2001. Intact IGF-binding protein-4 and -5 and their respective fragments isolated from chronic renal failure serum differentially modulate IGF-I actions in cultured growth plate chondrocytes. *J Am Soc Nephrol* 12:2400-2410.
- Koedam JA, Hoogerbrugge CM, van Buul-Offers SC. 2000. Differential regulation of IGF-binding proteins in rabbit costal chondrocytes by IGF-I and dexamethasone. *J Endocrinol* 165:557-567.
- Lalou C, Silve C, Rosato R, Segovia B, Binoux M. 1994. Interactions between insulin-like growth factor-I (IGF-I) and the system of plasminogen activators and their inhibitors in the control of IGF binding protein-3 production and proteolysis in human osteosarcoma cells. *Endocrinology* 135:2318-2326.
- Li J, Saunders JC, Gilmour RS, Silver M, Fowden AL. 1993. Insulin-like growth factor-II messenger ribonucleic acid expression in fetal tissues of sheep during late gestation: effects of cortisol. *Endocrinology* 132:2083-2089.
- Liu XJ, Malkowski M, Guo Y, Erickson GF, Shimasaki S, Ling N. 1993. Development of specific antibodies to rat insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBP-2 to -6): Analysis of IGFBP production by rat granulosa cells. *Endocrinology* 132:1176-1183.
- Matsumoto T, Gargosky SE, Kelley K, Rosenfeld RG. 1996 a. Characterization of an insulin-like growth factor binding protein-5 protease produced by rat articular chondrocytes and a neuroblastoma cell line. *Growth regulation* 6:185-190.
- Matsumoto T, Gargosky SE, Oh Y, Rosenfeld RG. 1996b. Transcriptional and post-translational regulation of of insulin-like growth factor binding protein-5 in rat articular chondrocytes. *J Endocrinol* 148:355-369.
- Matsumoto T, Tsurumoto T, Goldring MB, Shindo H. 2000. Differential effects of IGF-binding proteins, IGFBP-3 and IGFBP-5, on IGF-I action and binding to cell membranes of immortalized human chondrocytes. *J Endocrinol* 166:29-37.
- McCarthy T, Casinghino S, Centrella M, Canalis E. 1994. Complex pattern of insulin-like growth factor binding protein expression in primary rat osteoblast enriched cultures: regulation by prostaglandin E2, growth hormone, and insulin-like growth factors. *J Cell Physiol* 160:163-175.
- Menuelle P, Babajko S, Plas C. 1999. Insulin-like growth factor (IGF) binding proteins modulate the glucocorticoid-dependent biological effects of IGF-II in cultured fetal rat hepatocytes. *Endocrinology* 140:2232-2240.

- Morales TI. 1997. The role and content of endogenous insulin-like growth factor binding proteins in bovine articular cartilage. *Arch Biochem Biophys* 343:164-172.
- Moses AC, Nissley SP, Short PA, Rechler MM, White RM, Knight AB, Higa OZ. 1980. Increased levels of multiplication stimulating activity, an insulin-like growth in fetal rat serum. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:3649-3653.
- Olney RC, Mougey EB. 1999. Expression of the components of the insulin-like growth factor axis across the growth plate. *Mol Cell Endoc* 156:63-71.
- Olney RC, Smith RL, Kee Y, Wilson DM. 1993. Production and hormonal regulation of insulin-like growth factor binding proteins in bovine chondrocytes. *Endocrinology* 133:563-570.
- Olney RC, Wilson DM, Mohtai M, Fielder PJ, Smith RL. 1995. Interleukin-1 and tumor necrosis factor- α increase insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) production and IGFBP-3 protease activity in human articular chondrocytes. *J Endocrinol* 146:279-286.
- Rousseau GG. 1984. Control and gene expression by glucocorticoid hormones. *Biochem J* 224:-12.
- Salmon WD, Daughaday WH. 1957. A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. *J Lab Clin Med* 49:825-836.
- Sautier JM, Nefussi JR, Forest N. 1993. In vitro differentiation and mineralization of cartilaginous nodules from enzymatically released rat nasal cartilage cells. *Biol Cell* 78:181-189.
- Scott JH. 1953. The cartilage of the nasal septum. A contribution to the study of facial growth. *British Dental J* 95:37-43.
- Silbermann M, von der Mark K, Maor G, van Menxel M.. 1987. Dexamethasone impairs growth and collagen synthesis in condylar cartilage in vitro. *Bone and Mineral* 2:87-106.
- Spagnoli A, Hwa V, Horton WA, Lunstrum GP, Roberts Jr CT, Chiarelli F, Torello M, Rosenfeld RG. 2000. Antiproliferative effects of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) in mesenchymal chondrogenic cell line RCJ3.1C5.18. Relationship to differentiation stage. *J Biol Chem* 276:5533-5540.
- Sunic D, Belford DA, McNeil JD, Wiebkin OW. 1995. Insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) in bovine articular and ovine growth-plate chondrocyte cultures: their regulation by IGFs and modulation of proteoglycan synthesis. *BBA* 1245:43-48.
- Sunic D, McNeil JD, Rayner TE, Andress DL, Belford DA. 1998. Regulation of insulin-like growth factor binding protein-5 by of insulin-like growth factor-1 and interleukin-1 α in ovine chondrocytes. *Endocrinology* 139:2356-2362.
- Takano T, Takigawa M, Suzuki F. 1985. Stimulation by glucocorticoids of the differentiated phenotype of chondrocytes and the proliferation of rabbit costal chondrocytes in culture. *J Biochem* 97:1093-1100.
- Takigawa M, Okawa T, Pan H-O, Aoki C, Takahashi K, Zue J-D, Suzuki F, Kinoshita A. 1997. Insulin-like growth factors I and II are autocrine factors in stimulating proteoglycan synthesis, a marker of differentiated chondrocytes, acting through their respective receptors on a clonal human chondrosarcoma-derived chondrocyte cell line, HCS2/8. *Endocrinology* 138:4390-4400.
- Thompson E, Venetianer A, Gelharter TD, Hager G, Granner DK, Norman MR, Schmidt TJ, Harmon JM. 1980. Multiple actions of glucocorticoids studied in cell culture systems. In: Roy

- AK, Clark JH (eds) Gene Regulation by Steroid Hormones. Springer-Verlag, New York, pp 126-152.
- Trippel SB. 1992. Role of the insulin-like growth factors in the regulation of chondrocytes. In : Adolphe M (ed) Biological regulation of chondrocytes. CRC Press, Boca Raton, pp. 161-190.
- Underwood LE, D'Ercole AJ. 1984. Insulin and insulin-like growth factors/somatomedins in fetal and neonatal development. Clin Endocrinol Metab 13:69-89.
- Vetter U, Zapf J, Heit W, Helbing G, Heinze E, Froesh ER, Teller WM. 1986. Human fetal and adult chondrocytes : effects of of insulin-like growth factors-I and -II, insulin, and growth hormone on clonal growth. J Clin Invest 44:1903-1908.
- Wang E, Wang J, Chin E, Zhou J, Bondy CA. 1995. Cellular patterns of insulin-like growth factor system gene expression in murine chondrogenesis and osteogenesis. Endocrinology 136:2741-2751.
- Wang Y, Spatz MK, Kannan K, Hayk H, Avivi A, Gorivodsky M, Pines M, Yayon A, Lonai P, Givol D. 1999. A mouse model for a achondroplasia produced by targeting fibroblast growth factor receptor 3. Proc Natl Acad Sci USA 96:4455-4460.

ARTICLE II

REGULATION BY GLUCOCORTICOIDS OF MINERALIZATION AND HOMEOPHENES MSX AND DLX DURING CALVARIA DIFFERENTIATION IN RAT FETUS

**Reem NADRA, Isabelle FERNANDES, Laurence PIBOUIN, Ariane BERDAL and Pierrette
MENUELLE**

Running title : Calvaria ; glucocorticoids, Msx2, Dlx5, Runx2, mineralization.

Address all correspondance and requests for reprints to Dr. P. Menuelle, Laboratoire de Biologie Oro-faciale et Pathologie, EMI-U 0110 INSERM, U.F.R. d'Odontologie, Université Paris 7, Institut Biomédical des Cordeliers, 15 rue de l'École de Médecine, 75270 Paris Cedex 06, France.
E-mail : Pierrette.Menuelle@bhdc.jussieu.fr

ABSTRACT

In late gestation, the first centers of ossification in the rat fetus develops concomitantly to the peak secretion of fetal glucocorticoids, physiological regulators of growth and differentiation of many organs. Furthermore, during the differentiation of mineralized tissues, including bone, cartilage and tooth, Msx and Dlx homeogenes are key elements of differentiation in mammals. Thus, we investigated the possible regulation by glucocorticoids of these homeogenes either in vitro, in primary cultures of 17-day-old fetal rat calvaria cells and in vivo, in calvaria from E15 to birth. In vitro, dexamethasone (DEX), in conditions mimicking glucocorticoid peak in rat late gestation, induced extracellular matrix mineralization : Ca 45 incorporation and alkaline phosphatase activity were increased. In vitro as well as in vivo, Msx2, Dlx5, Runx2 and osteocalcin were detected by RT-PCR technics. In vitro, Msx2, Dlx5 and Runx2 transcripts were up-regulated by physiological concentration of DEX together with the expression of osteocalcin gene, a marker of late differentiation. In vivo, Dlx5, Msx2 and Runx2 mRNAs were increased concomitantly to peak glucocorticoid appearance, whereas osteocalcin mRNAs were induced since E18. Thus, we can postulate that GC could act directly or indirectly on the inter-regulation between these transcription factors and osteocalcin expression during the induction of fetal cranio-facial mineralization and be, Swhether in part, essential for the differentiation of craniofacial structures.

INTRODUCTION

Bone formation *in vivo* is a dynamic complex process, involving the actions of multiple morphogens, growth factors and hormones (**Cooper, 1999**). During the development of mineralized tissues, including bone, cartilage and tooth, Msx and Dlx homeoproteins are key elements in the differentiation of bone in mammals (**Shapre, 1995; Ryoo, 1997; Davideau, 1999 ; Lézot, 2000**). These homeoproteins have complementary or antagonistic functions depending upon the context (**Bendall, 2000**). It is obvious that the homeobox genes have been identified in a number of vertebrates and that they act in combination with growth factors (**Vainio, 1993 ; Thesleff, 1995 ; Chen, 1996 ; Bei 1998 ; D'Souza, 1999**) and hormones (**Lezot, 2002**) to regulate the craniofacial development and tooth morphogenesis. Glucocorticoid hormones (GCs) have a primordial role in tissue differentiation by regulating the expression of several genes (**Rousseau, 1984**). They are physiological regulators of growth and development of many organs including bone (**Stein, 1990**). It has been reported that, *in vitro*, in 21 day-old cultured fetal rat calvaria cells, glucocorticoids at physiological concentration affect both proliferation and differentiation genes (**Bellows, 1989 ; Shalhoub, 1992 ; Stein, 1993**). Conversely, in fetal rat calvaria some studies *in vivo* and *in vitro* have documented that an excess of glucocorticoids induces bone loss (**Canalis E, 1996**). Moreover, fetal mouse palatogenesis (intramembranous ossification) is shown to be glucocorticoid receptors implicated but its relationship to cleft formation is not clear (**Hackeney, 1980**). However, during pregnancy in mice and rat, the teratogenic dose of GC administration induces a cleft palate in offspring (**Abbott, 1994**). Thus, GC regulate several determinants of osteoblast differentiation, proliferation and function. These effects are complex and depending upon the time, dose and stage of osteoblast differentiation. In that respect, the fetal rat system is very interesting because :1) in the course of rat development, there is a marked rise in plasma glucocorticoid levels between day 16 and 19.5 of gestation, followed by a drop (**Cohen, 1973 ; Henning, 1978**) and 2) within this particular period, the first centers of ossification arise (**Johnson, 1933**). To our knowledge, no

specific glucocorticoid regulating mechanism on Msx2 and Dlx5 mRNAs expression has been yet identified in fetal rat calvaria biomineralization which would play a role similar to tooth mineralization, especially around the particular period of maximal fetal glucocorticoid production *in vivo*.

The aim of our study is to study the GC implication, on the expression pattern of the homeogenes Msx2 and Dlx5, the essential factor of transcription Runx2 and osteocalcin, a marker of late differentiation, during mineralization process. This study is investigated either *in vivo*, in dissected rat calvaria at different stages of development, between day 15 of pregnancy until birth, and *in vitro*, in primary culture of 17 day-old fetal rat calvaria cells (Nefussi, 1985 ; Anagnostou, 1996) stimulated or not by physiological concentration of glucocorticoids, to examine the primordial role of glucocorticoids in the interregulation of these various genes during the biomineralization of fetal rat calvarial cells.

Materials and methods

Materials

Culture medium Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) was purchased from Gibco (Grand Island, NY) and fetal calf serum was from Biosys (Compiègne, France). Antibiotics were from Boehringer (Mannheim, Germany). $^{45}\text{CaCl}_2$ (10-40 mCi/mg calcium) was obtained from Amersham (Buckinghamshire, England). Collagenase and dexamethasone were purchased from Sigma Chemical Co (St Louis, MO). All primers used were from oligo express (France).

Culture procedure

Calvaria bone cells were isolated as previously described (Nefussi, 1985; Anagnostou, 1996). Briefly, calvaria bones from 17.5-day-old fetal rats (Sprague Dawley) were dissected and incubated with 2.5 mg/ml (type I) collagenase in phosphate-buffered saline (PBS) for 1 h at 37°C. Cells were then dissociated from partially digested bone fragments by repeated pipetting, total cell dissociation being rapidly obtained. After three washes in PBS, cells were counted and seeded at a final density of 2×10^4 cells/cm² in DMEM culture medium supplemented with 10% selected calf serum, 50 UI/ml penicillin, 50

$\mu\text{g/ml}$ streptomycin, $50 \mu\text{g/ml}$ ascorbic acid. The non-adhering cells were removed 4 h after plating. Cells were cultured in a humidified atmosphere containing 95% ambient air and 5% CO_2 at 37°C . The medium was replaced every 48 h and all experiments were initiated after 6 days of culture. At this time, time zero of the experiments, the cells were deprived of serum and dexamethasone added or not, β -glycerophosphate was added 24 h later for a further 16 h period. Then at day 9, corresponding to the initiation of matrix nodule mineralization, time 40 h of the experiments, biochemical tests were initiated.

Calcium incorporation into cell layer

Experiments were performed in the presence of $^{45}\text{CaCl}_2$ ($5 \mu\text{ci/ml}$), the total calcium concentration of the medium being 2 mM. Cells were incubated for 6 h with $^{45}\text{CaCl}_2$ in serum-free medium supplemented with DEX. At the end of the incubation, cells were rapidly washed 4 times with serum-free medium and incubated at 37°C for five successive periods of 4 min. This chase step allowed the release of rapidly exchangeable ^{45}Ca (Anagnostou, 1996). The high rate of the early ^{45}Ca release progressively decreased and might correspond to the slow turnover rate of ^{45}Ca deposits (result not shown). Cells were then washed once with PBS at 4°C , and the radioactive material of the cell layers was extracted in 10% formic acid for 24 h at room temperature (Bellows, 1991). Aliquots were used to determine ^{45}Ca counts by liquid scintillation spectrometry. The results are expressed as micromole of calcium per milligram of cell protein.

Alkaline phosphatase activity

Alkaline phosphatase activity was determined in cell extracts and culture medium by measuring the pNPPase activity as previously described (Anagnostou, 1996). Briefly, cells were harvested using a rubber policeman and solubilized in the assay buffer containing 0.2% Nonidet P-40. Then they were sonicated with 0.6 s/35W pulses at 4°C , and the pNPPase activity was determined on aliquots.

Total RNAs were extracted according to Chomczynski and Sacchi, 1987, using a guanidinium isothiocyanate phenol method (Euromedex, France). The concentration and the

purity of RNA samples were estimated by spectrophotometry at wavelengths of 260nm and 280nm using a UV/visible Spectrophotometer (Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech, Cambridge, England). RNA samples were stored at -80°C .

B- Reverse transcription–polymerase chain reaction (RT-PCR)

RT-PCR analysis was performed essentially as described by the manufacturer's protocol (Invitrogen, Life technologies, Cergy-Pontoise, FRANCE). Standard reagents included SUPERSCRIT II RNase H⁻ Reverse Transcriptase purified to near homogeneity from E.coli containing the pol gene of Moloney Murine Leukemia Virus, 3 μg of total RNA was reverse-transcribed with an oligo(dt) primer, RT negative controls were run in parallel and were consistently negative. PCRs were performed using EurobioTAQ[®] ADN polymerase kits from Eurobio (Les Ulis Cedex France). The PCR was performed in 50 μl with 2 μl of RT product and 10 pmol of each forward and reverse following primers for 20-30 cycles : Msx2 mouse 5'-*CCTCGGTCAAGTCGGAAAATTC-3'* and 5'-*CGTATATGGATGCTGCTTGCAG-3'*, Dlx5 mouse 5'-*TGGCAAACCAAAGAAAGTTC-3'* and 5'-*AATAGAGTGTCCCGGAGG-3'*, GAPDH *rat* 5'-*GACCCCTTCATTGACCTCAACTAC-3'* and 5'-*AAGTTGTCATGGATGACCTTGGCC-3'*, Runx2 mouse 5'-*GGACGAGGCAAGAGTTTAC-3'* and 5'-*TGCCTGCCTGGGATCTGTAA-3'*, osteocalcin mouse 5'-*CTCACTCTGCTGGCCCTG-3'* and 5'-*CCGTAGATGCGTTTGTAGGC-3'*. Under these conditions, preliminary experiments showed that all reactions remained within the exponential phase (data not shown). In all analysis, standard reagents without cDNA material served as a control for solution purity while RNA without prior RT served as second control for genomic DNA contamination. The resultant PCR product (10 μl) was resolved on 1-1.5% agarose gel, and the cDNA bands were visualized under UV after ethidium bromide staining. GAPDH PCR amplification served as internal control while mRNA without RT served as a negative control for the absence of genomic contamination. The images of cDNA bands on ethidium bromide-stained gels were recorded by densitometry scanning

Definitions

For the responses to dexamethasone, a “stimulation or inhibition index“ was used, defined as the ratio of the values obtained for treated cultures to the values obtained for controls. For each protocol considering biochemical tests at least three independent experiments were performed on different cell preparations. Data are expressed as means \pm SD of triplicate culture measurements. Student’s test for paired samples was used for statistical analyses of treated cultures and corresponding controls. For RT-PCR, at least three different samples were measured at least twice, representing a minimum of 6 points for each experimental condition.

RESULTS

Effect of dexamethasone on biomineralization *in vitro*

A - Effect of DEX on morphological aspect in vitro

We first examined the effect of DEX added to the cultured fetal rat calvaria cells (17 day-old of gestation), on day 7 just at the onset of extracellular matrix maturation (Fig.1, a). After 24 h of culture in the presence or absence of 100 nM DEX, no differences were observed after von Kossa staining, concerning the enhancement of mineral material deposit (Fig.1, b and c). After a 40 h exposure in the presence or absence of 100 nM DEX, there was an increased mineral deposit in the presence of DEX (Fig.1, d and e). Thus 40 h of glucocorticoid treatment since day 7, just at the onset of extracellular matrix maturation, von Kossa staining revealed a DEX-dose dependent nodule size increase regarding the extent of extracellular matrix mineralization.

B - Effect of Dex on markers of mineralization in vitro

Increasing concentrations of DEX were added in culture medium at day 7 for a period of 40 h. When ^{45}Ca incorporation was measured for the last 6 hours at day 9, a clear stimulation by DEX was already observed at 1 nM and maximal at 100 nM (stimulation index : 1.71 ± 0.20) (Fig.2, A). In parallel cultures, cellular alkaline phosphatase activity was measured (Fig.2, B). Unlike ^{45}Ca incorporation, alkaline phosphatase activity showed a maximal stimulation at 10 nM DEX

(stimulation index : 1.55 ± 0.19 and 1.24 ± 0.13 , respectively). It must be noted that in all these experiments the protein content was not modified by physiological concentrations of DEX, suggesting an absence of effect on cell proliferation (result not shown). Thus the two parameters of osteoblast biomineralization were dose dependently regulated by Dex, these stimulations confirmed the DEX differentiating effect shown by morphological study.

C - Developmental gene expression in response to DEX in vitro

At the same stage of differentiation as previously used, Msx2, Dlx5, Runx2 and osteocalcin transcripts were detected in absence of DEX by RT-PCR analysis. In presence of physiological concentration of DEX, Msx2, Dlx5, Runx2 and osteocalcin transcripts were up-regulated (Fig. 3). These results strongly support, in fetal rat calvaria primary culture stimulated by physiological concentration of DEX, a regulatory effect of DEX on the expression of homeogenes Msx2 and Dlx5 during the mineralization of fetal rat calvaria cells. The selective morphological and biochemical changes showed previously were in concomitance with the high level of biomineralization transcripts like osteocalcin.

D - Developmental gene expression in vivo

In order to verify these glucocorticoids induction, we investigated by RT-PCR analysis their expression in bone calvaria, at different stages of rat development from E15 to birth. The homeogenes Msx2, Dlx5 and Runx2 were detected in all stages studied and strongly increased during E17 and E19, during fetal glucocorticoids appearance. Then, until birth, their transcripts expression tended to decline. The osteocalcin transcripts were detected as soon as E18 and their expression was rather stable until birth (Fig 4).

DISCUSSION

The present studies aimed at the expression of the homeogenes Msx and Dlx during the biomineralized calvaria bone cells in vitro and in vivo and their regulation by glucocorticoids in the last period of development. Primary culture of osteoblast derived from fetal rat calvaria, when cultured for less than 2 weeks in the presence of ascorbic acid and organic phosphate, reveals cell growth and differentiation resulting in the formation of macroscopic three-dimensional nodules of calcified bone (Nefussi, 1985). It was found that most of the osteoblastic parameters concerning extracellular matrix maturation and mineralization, alkaline phosphatase activity, calcium deposition and osteocalcin were increased in presence of physiological concentrations of dexamethasone, the synthetic analogue of glucocorticoids used in vitro. Previous reports are in agreement with ours showing that glucocorticoids increase osteoblast extracellular matrix biomineralization of fetal rat calvaria (Pockwinse, 1995, Shalhoub, 1992 ; Canalis, 1983 ; Bellows, 1987). Furthermore, the present maximum effective concentration (100 nM) and EC50 (10 nM) place this response clearly within the physiological range whereas the cellular proliferative activity was not affected. Indeed, DEX appears to have a more efficient glucocorticoid activity when compared to corticosterone, the major circulating glucocorticoids in rat (Thompson, 1980). The concentration found to lead to a maximal response in 17-day-old-fetal rat osteoblast was therefore similar to the plasma level of free glucocorticoids they would have been exposed to in vivo (Cohen, 1973). Thus, our in vitro study shows that glucocorticoids could be implicated in intramembranous mineralization process during late gestation period.

Osteocalcin, a calcium binding protein, is expressed in mature osteoblasts undergoing mineralization, this protein regulate the rate of bone matrix deposition by differentiated osteoblasts, and its function is not redundant with other factors during development (Ducy, 2000). In rat calvaria, osteocalcin transcripts, the critical target gene of osteoblast differentiation, were increased by Dex in vitro and present in vivo as soon as E18, as previously shown (Cowles,

1998). The precise mechanisms of glucocorticoid actions in fetal rat calvaria bone are currently unknown, but it could be mediated, at least in part, by the regulation of homeogene expression like *Msx2*, *Dlx5* and *Runx2* around the fetal peak of glucocorticoids inducing an activation of the osteocalcin gene. This hypothesis was supported by our in vitro studies where the transcriptional factors such as *Runx2*, *Msx2*, *Dlx5* were present and regulated by Dex. These transcriptional factors were also detected in vivo and regulated concomitantly to GC peak appearance. *Runx2*, formerly called PEBP2 or *Cbfa1*, which is a runt domain transcription factor, is a direct inducer of the osteocalcin gene which expression is highly restricted to osteoblasts and odontoblasts (Geoffroy, 1995 ; Ducy, 1997 ; Zaidi, 2001). A total absence or haploinsufficiency of *Runx2* leads to an arrest or defects in osteoblast differentiation (Shirakabe, 2001). Data concluded that the mouse bone formation is critically dependent upon *Runx2* expression (Komori, 1997) which regulates the expression of all the major genes of differentiation expressed by osteoblasts (Shirakabe, 2001). *Msx2*, an homeodomain transcription factor, controls intramembranous calvarial bone development in the skull (Newberry, 1997). In transient cotransfection experiments, *Msx2* is shown to have opposite effects via cisacting elements on osteocalcin promoter gene, activation or repression depending upon the stage of osteoblast differentiation (Towler, 1994). However, latter experiments demonstrate that *Msx2* repression of osteocalcin gene is not due to its binding to DNA but to proteins associated with the TATA complex ; *Msx2* controls the timing of osteoblast differentiation, including the temporospatial patterns of OC expression in calvaria and teeth (Newberry, 1998). The *Msx1* and *Msx2* gene are absolutely required for craniofacial bone formation as shown by *Msx1/Msx2* knock-out mice (Satokata, 2000). In vivo and in vitro studies suggest that *Dlx5* may transrepress osteocalcin gene (Ryoo, 1997 ; Acampora, 1999), other studies have demonstrated transcriptional activation by *Dlx5* on osteocalcin and other osteogenic promoters (Newberry, 1998 ; Miyama, 1999). The *Dlx5* gene is expressed during early and late embryonic development in mouse. However, a previous study suggests that *Dlx5* is expressed selectively in differentiating calvaria cells (Ryoo, 1997). Heterozygous mice *Dlx5* +/- appear normal but homozygous mutants die after birth and

present craniofacial abnormalities, a delayed ossification in the skull and abnormal osteogenesis (Acampora, 1999). The overexpression of *Dlx5* in chicken calvaria cells accelerates osteoblast differentiation by inducing osteocalcin, col I, alkaline phosphatase and osteopontin (Tadic, 2002). Thus our results, on *Dlx5* expression, are in agreement with these previous works. The increase of *Msx2* (*Msx2* mRNA levels were increased by Dex in cultured neonate rat calvaria cells, Towler, 1994) and *Dlx5* mRNA levels from E17-E20 in fetal rat calvaria in vivo, around the peak of glucocorticoids, could be involved in osteocalcin expression at E18. The homeobox protein *Msx2* is able to repress the transcription activity of *Runx2* by interacting with it but the other homeobox protein *Dlx5* has an activity which interferes with *Msx2* activity : *Dlx5* can both repress the expression of *Msx2* gene and interact with it by protein-protein interaction (Shirakabe, 2001). Thus, the heterodimerization between *Msx2* and *Dlx5* induces derepression of *Runx2* and osteocalcin genes allowed indirectly or directly osteocalcin expression (Shirakabe, 2001 ; Newberry, 1998). We cannot exclude that in fetal rat calvaria the physiological action of GC was not mediated directly through up-regulation of *Runx2* promoter, as previously shown (Mc Carthy, 2003). However it is not evident that this direct activation, shown with pharmacological doses of GC, is effective with physiological concentrations. It has been shown that GC receptors interacts directly with osteocalcin promoter and modulated bone expressed genes in a developmental stage-specific manner (Shalhoub, 1998). Transient transfection in COS-7 line shows that GC exerce a direct transrepression on osteocalcin expression (Meyer, 1997). Dex effect on *Dlx5* has not been yet described.

In our primary culture model, 17 day-old fetal rat calvaria cells, GC induced extracellular matrix mineralization. This phenomenon could reflect the concomitance between fetal GC secretion peak and ossification center appearance observed in vivo. Osteocalcin, critical marker of ossification, was increased by GC in vitro and appeared in vivo simultaneously to ossification center appearance. Transcription factors that modulate osteocalcin expression, such as *Msx2*, *Dlx5* and *Runx2* were up-regulated in vitro by GC as well as in vivo during the same period.

Thus, we can postulate that GC could act directly or indirectly on the inter-regulation between these transcription factors and osteocalcin expression during the induction of fetal cranio-facial mineralization.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1

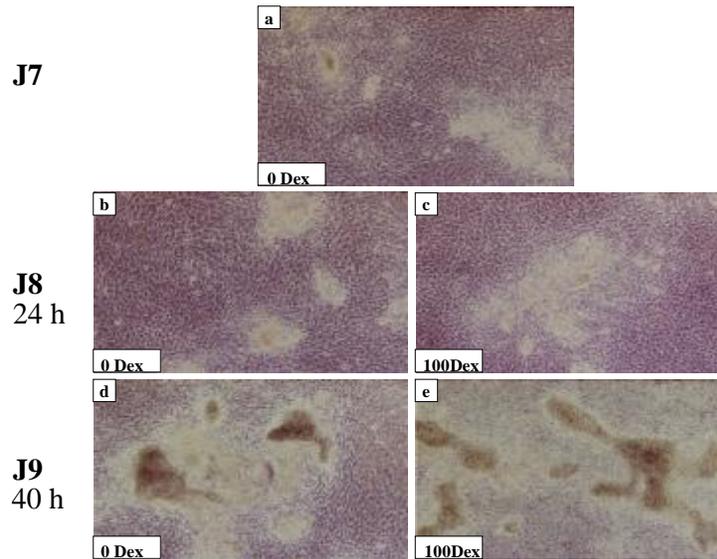


FIG. 1 : Influence of Dex on von Kossa staining of osteoblast cultures. At day 7 of culture, the medium was replaced by a fresh medium deprived of serum and containing 100 nM DEX or ethanol vehicle, 10 mM β -glycerophosphate being added 24 h after DEX addition. Von Kossa staining is shown at the time of DEX addition (a), after 24 or 40 h of presence of DEX solvent (b,d) or 100 nM DEX (c,e).

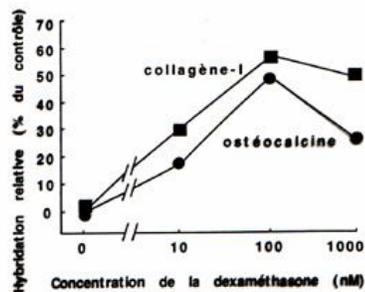
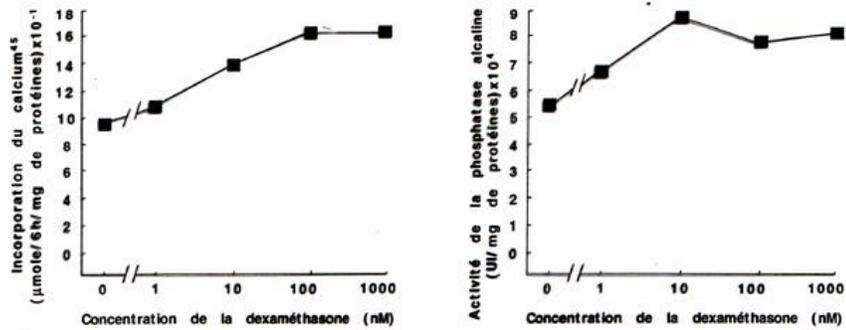


FIG. 2 : Dose dependence of DEX effect on mineralization matrix. At day 7 of culture, the medium was replaced by a fresh medium deprived of serum and containing increasing concentrations of DEX from 1 nM to 1 μ M or ethanol vehicle, β -glycerophosphate at 10 mM being added 24 h after DEX addition. 34 h after DEX addition, the medium was renewed by an identical one but supplemented either with ^{45}Ca (5 $\mu\text{Ci/ml}$) or not. ^{45}Ca incorporation (A) and ALP activity (B) were measured 6 h later, after 40 h of DEX presence, at day 9 of culture. Statistical significance is represented by * for $P < 0.01$, and ** for $P < 0.001$, as referred to corresponding cultures grown in the absence of DEX. Northern blotting analysis (C) of collagen type I and osteocalcin mRNA level in control and Dex treated culture. The analysis was done on RNA samples from two independent cell culture experiments and similar results were obtained.

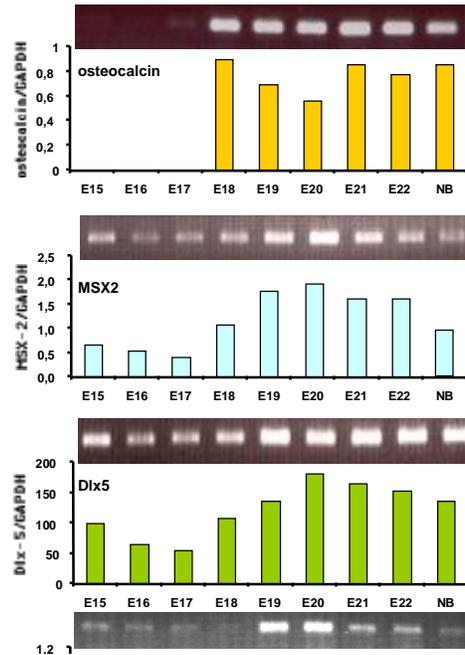


FIG. 3: RT-PCR analysis of the homeogenes expression in mineralization fetal rat calvaria primary culture and fetal rat calvaria from E15-P1.5. The same protocol as for Fig. 1 was used and then mRNA were isolated from primary cultured cells grown or not in the presence of increasing DEX (A lane :) Msx2, Dlx5, Runx2 and osteocalcin transcripts were analysed *in vitro* and *in vivo*. RT-PCR was carried out using primers specific for the products indicated, as described in Materials and **methods**.

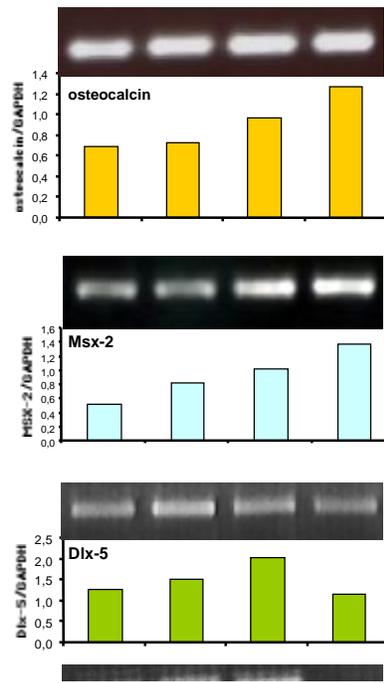


FIG.4. : RT-PCR analysis of the homeogenes expression fetal rat calvaria from E15-birth. mRNA were isolated from calvaria and Msx2, Dlx5, Runx2 and osteocalcin transcripts were analyzed. RT-PCR was carried out using primers specific for the products indicated, as described in Materials and methods.

REFERENCES

- Abbott BD, McNabb FM, Lau C 1994 Glucocorticoid receptor expression during the development of the embryonic mouse secondary palate. *J Craniofac Genet Dev Biol* 14:87-96
- Acampora D, Merlo GR, Palaria L, Zerega B, Postiglione MP, Mantero S, Bober E, Barbieri O, Simeone A, Levi G 1999 Craniofacial, vestibular and bone defects in mice lacking the Distal-less-related gene *Dlx5*. *Development*. 126:3795-809
- Anagnostou F, Plas C, Forest N 1996 Ecto-alkaline phosphatase considered as levamisole-sensitive phosphohydrolase at physiological pH range during mineralization in cultured fetal calvaria cells. *J Cell Biochem* 60:484-494
- Banerjee C, Hiebert SW, Stein JL, Lian JB, Stein GS 1996 An AML-1 consensus sequence binds an osteoblast-specific complex and transcriptionally activates the osteocalcin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:4968-73
- Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN 1987 Physiological concentrations of glucocorticoids stimulate formation of bone nodules from isolated rat calvaria cells *in vitro*. *Endocrinology* 121:1985-92
- Bellows CG, Aubin JE 1989 Determination of numbers of osteoprogenitors present in isolated fetal rat calvaria cells *in vitro*. *Dev Biol* 133:8-13
- Bendall AJ, Abate-Shen C 2000 Roles for *Msx* and *Dlx* homeoproteins in vertebrate development. *Gene* 247:17-31
- Bei M, Maas R 1998 FGFs and BMP4 induce both *Msx1*-independent and *Msx1*-dependent signaling pathways in early tooth development. *Development* 125:4325-33
- Canalis E 1983 Effect of glucocorticoids on type I collagen synthesis, alkaline phosphatase activity and deoxyribonucleic acid content in cultured rat calvariae. *Endocrinology* 112:931-939
- Canalis E 1996 Mechanisms of glucocorticoid action in bone: Implications to glucocorticoid-induced osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 81:3441-3447
- Chang DJ, Ji C, Kim KK, Casinghino S, McCarthy TL, Centrella M 1998 Reduction in transforming growth factor beta receptor I expression and transcription factor *Runx2* on bone cells by glucocorticoid. *J Biol Chem* 273:4892-4896
- Chen Y, Bei M, Woo I, Satokata I, Maas RL 1996 *Msx-1* Controls Reciprocal Inductive Signalling in Mammalian Tooth Morphogenesis. *Development* 122:3033-3044
- Cohen A 1973 Plasma corticosterone concentration in the foetal rat. *Horm Metab Res* 5:66-
- Cooper MS, Hewison M, Stewart PM 1999 Glucocorticoid activity, inactivity and the osteoblast. *J Endocrinol* 163:159-64
- Cowles EA, DeRome ME, Pastizzo G, Brailey LL, Gronowicz GA 1998 Mineralization and the expression of matrix proteins during *in vivo* bone development. *Calcif Tissue Int* 62:74-82
- Davideau JL, Demri P, Gu TT, Simmons D, Nessman C, Forest N, MacDougall M, Berdal A 1999 Expression of *DLX5* during human embryonic craniofacial development. *Mech Dev* 81:183-186

- Delany AM, Gabbitas BY, Canalis E 1995 Cortisol downregulates osteoblast alpha 1 (I) procollagen mRNA by transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *J Cell Biochem* 57:488-94
- Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G 1997 *Osf2/Runx2*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89:747-754
- Ducy P 2000 *Runx2*: a molecular switch in osteoblast biology. *Dev Dyn*. 219:461-471
- Geoffroy V, Ducy P, Karsenty G 1995 *J Biol Chem* 52:30973-30979
- Henning SJ. 1978 Plasma concentrations of total and free corticosterone during development in the rat. *Am J Physiol* 235:E451-456
- Hu G, Vastardis H, Bendall AJ, Wang Z, Logan M, Zhang H, Nelson C, Stein S, Greenfield N, Seidman CE, Seidman JG, Abate-Shen C 1998 Haploinsufficiency of *MSX1*: a mechanism for selective tooth agenesis. *Mol Cell Biol* 18:6044-6051
- Ishida H, Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN 1995 Tri-iodothyronine (T3) and dexamethasone interact to modulate osteoprogenitor cell differentiation in fetal rat calvaria cell cultures. *Bone* 16:545-549
- Jabs EW, Muller U, Li X, Ma L, Luo W, Haworth IS, Klisak I, Sparkes R, Warman ML, Mulliken JB, et al. 1993 A mutation in the homeodomain of the human *MSX2* gene in a family affected with autosomal dominant craniosynostosis. *Cell* 75:443-50
- Johnson ML 1933 The time and order of appearance of ossification centers in the albino mouse. *Am J Anat* 52:241-271
- Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Ronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T 1997 Targeted disruption of *Runx2* results in complete lack of bone formation owing to maturation arrest of osteoblasts. *Cell* 89:755-764
- Lezot F, Thomas B, Hotton D, Forest N, Orestes-Cardoso S, Robert B, Sharpe P, Berdal A 2000 Biomineralization, life-time of odontogenic cells and differential expression of the two homeobox genes *MSX-1* and *DLX-2* in transgenic mice. *J Bone Miner Res* 15:430-41
- Lezot F, Descroix V, Mesbah M, Hotton D, Blin C, Papagerakis P, Mauro N, Kato S, MacDougall M, Sharpe P, Berdal A 2002 Cross-talk between *Msx/Dlx* homeobox genes and vitamin D during tooth mineralization. *Connect Tissue Res* 43:509-14
- McCarthy TL, Chang WZ, Liu Y, Centrella M 2003 *Runx2* integrates estrogen activity in osteoblasts. 278:43121-43129
- MacKenzie A, Ferguson MWJ, Sharpe PT 1992 Expression patterns of the homeobox gene, *Hox-8*, in the mouse embryo suggest a role in specifying tooth initiation and shape. *Development* 115:403-420
- Meyer T, Carstedt-Duke J, Starr DB 1997 A weak TATA box is a prerequisite for glucocorticoid-dependent repression of the osteocalcin gene. *J Biol Chem* 272:30709-30714
- Nefussi JR, Boy-Lefevre ML, Boulekbache H, Forest N 1985 Mineralization *in vitro* of matrix formed by osteoblasts isolated by collagenase digestion. *Differentiation*. 29:160-1688

- Newberry EP, Latifi T, Towler DA 1998 Reciprocal regulation of osteocalcin transcription by the homeodomain proteins Msx2 and Dlx5. *Biochemistry* 37:16360-16368
- Newberry EP, Latifi T, Towler DA 1999 The RRM domain of MINT, a novel Msx2 binding protein, recognizes and regulates the rat osteocalcin promoter. *Biochemistry* Aug 17;38(33):10678-90. 1997 36:10451-62
- Newberry EP, Boudreaux JM, Towler DA 1997 Stimulus-selective inhibition of rat osteocalcin promoter induction and protein-DNA interactions by the homeodomain repressor Msx2. *J Biol Chem* 272:29607-29613
- Newberry EP, Latifi T, Battaile JT, Towler DA 1997 Structure-function analysis of Msx2-mediated transcriptional suppression. *Biochemistry* 36:10451-10462
- Pereira RM, Delany AM, Canalis E 2001 Cortisol inhibits the differentiation and apoptosis of osteoblasts in culture. *Bone* 28:484-490
- Pockwinse SM, Stein JL, Lian JB, Stein GS 1995 Developmental stage-specific cellular responses to vitamin D and glucocorticoids during differentiation of the osteoblast phenotype: interrelationship of morphology and gene expression by in situ hybridization. *Exp Cell Res.* 216:244-260
- Prince M, Banerjee C, Javed A, Green J, Lian JB, Stein GS, Bodine PV, Komm BS 2001 Expression and regulation of Runx2/Runx2 and osteoblast phenotypic markers during the growth and differentiation of human osteoblasts. *J Cell Biochem* 80:424-40
- Ryoo HM, Hoffmann HM, Beumer T, Frenkel B, Towler DA, Stein GS, Stein JL, van Wijnen AJ, Lian JB 1997 Stage-specific expression of Dlx5 during osteoblast differentiation: involvement in regulation of osteocalcin gene expression. *Mol Endocrinol* 11:1681-1694
- Rousseau GG. 1984 Control and gene expression by glucocorticoid hormones. *Biochem J* 224 :1-12. activity, inactivity and the osteoblast. *J Endocrinol.* 1999 163:159-64
- Satokata I, Ma L, Ohshima H, Bei M, Woo I, Nishizawa K, Maeda T, Takano Y, Uchiyama M, Heaney S, Peters H, Tang Z, Maxson R, Maas R 2000 Msx2 deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nat Genet* 24:391-395
- Shalhoub V, Conlon D, Tassinari M, Quinn C, Partridge N, Stein GS, Lian JB 1992 Glucocorticoids promote development of the osteoblast phenotype by selectively modulating expression of cell growth and differentiation associated genes. *J Cell Biochem* 50:425-440
- Shalhoub V, Aslam F, Breen E, van Wijnen A, Bortell R, Stein GS, Stein JL, Lian JB 1998 Multiple levels of steroid hormone-dependent control of osteocalcin during osteoblast differentiation: glucocorticoid regulation of basal and vitamin D stimulated gene expression. *J Cell Biochem* 69:154-168
- Shirakake K, Terasawa K, Miyama K, Shibuya H, Nishida E 2001 Regulation of the activity of the transcription factor Runx2 by two homeobox proteins, Msx2 and Dlx5. *Genes Cells* 6:851-856
- Sharpe PT 1995 Homeobox genes and orofacial development. *Connect Tissue Res* 32:17-25
- Stein GS, Lian JB, Owen TA 1990 Bone cell differentiation: a functionally coupled relationship between expression of cell-growth- and tissue-specific genes. *Curr Opin Cell Biol* 2:1018-10127

Stein GS, Lian JB 1993 Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocr Rev* 14:424-442.

Thesleff I 1995 Homeobox genes and growth factors in regulation of craniofacial and tooth morphogenesis. *Acta Odontol Scand* 53:129-134

Towler DA, Rutledge SJ, Rodan GA 1994 Msx2/Hox 8.1: a transcriptional regulator of the rat osteocalcin promoter. *Mol Endocrinol* 8:1484-1493.

Vainio S, Karavanova I, Jowett A, Thesleff I 1993 Identification of BMP-4 as a signal mediating secondary induction between epithelial and mesenchymal tissues during early tooth development. *Cell* 75:45-58.

Zhang H, Hu G, Wang H, Sciavolino P, Iler N, Shen MM, Abate-Shen C 1997 Heterodimerization of Msx and Dlx homeoproteins results in functional antagonism. *Mol Cell Biol* 17:2920-2932

V.Résultats non publiés

La dernière partie de ce travail poursuit les mécanismes de la différenciation ostéoblastique, plus précisément la biominéralisation de calvaria de fœtus de rat. Ces travaux sont focalisés sur un gène essentiel de la squelettogenèse craniofaciale, **le gène *Msx-1***. Dans notre laboratoire l'implication de ce gène lors de l'amélogenèse et la dentinogenèse ainsi que la présence de l'ARN antisens naturel de ce gène ont été montrés chez la souris. La structure de ce transcrite a été précisée, elle recouvre le second exon et une partie de l'intron. De plus, le site d'initiation de la transcription a pu être localisé dans une région de 60 pb strictement conservée chez l'homme, le rat et la souris et contenant une boîte TATA. **Le but** de ce travail est de vérifier la présence d'un ARN antisens du gène *Msx-1* chez le rat, d'étudier la cinétique d'expression de ce transcrite dans le calvaria, du 16^{ème} jour de la vie embryonnaire jusqu'à 1.5 jours post-natal et de caractériser la structure de cet ARN antisens afin d'aborder ultérieurement son rôle éventuel dans le développement du squelette craniofacial chez le rat. Tout d'abord, l'amplification du fragment d'ADN contenant **l'intron** du gène *Msx-1* (étant inconnu), le clonage et le séquençage ont été réalisés afin de préciser la structure intronique de ce gène et de mettre à notre disposition des outils moléculaires nécessaires pour cette étude. Ensuite, les techniques de **RT-PCR et de northern blotting** ont été utilisées pour mettre en évidence l'existence de ce transcrite dans différents stades du développement du calvaria du rat. De plus, l'utilisation des **ribosondes** spécifiques du brin ARN AS pourrait confirmer la présence et la taille du transcrite AS du gène *Msx-1* homologue à celui détecté chez la souris. La technique de **RACE RT-PCR** portant sur la recherche des ADNc chevauchants correspondants aux extrémités 5' et 3' du transcrite AS de ce gène permettra la confirmation de la taille de cet ARN AS, par une analyse de localisation des amorces introniques choisies et leur chevauchement. La structure de ce transcrite sera déterminée par le clonage et le séquençage en cours.

MATERIELS ET METHODES

Matériels

Le kit d'amplification de l'ADNc SMART Race et la solution d'hybridation ExpressHybTM sont fournis par CLONTECH Bioscience BD (USA). Le système de transcription *in vitro* des ribosondes, le marqueur de poids moléculaire ARN et les enzymes de restriction sont commercialisés par Promega Corporation (USA). Les filtres Glass Microfibres GF/A proviennent de Whatman (Angleterre). Toutes les amorces utilisées sont fournies par Oligo Express (France).

Amplification, clonage et séquençage de l'intron du gène *Msx-1* chez le rat

L'intron du gène *Msx-1* de rat est amplifié par "PCR nested" en utilisant des amorces choisies dans l'exon-1 et l'exon-2 : *Msx-1 SpeI* 5'ATGACTTCTTTGCCACTCGGTGTC-3' et *Msx-1 P₃rev* 5'ACATTGGCTTCGCGGCCATCTTCA-3' (**Figure 1**). La matrice est de l'ADN génomique (100 ng) d'une lignée de fibroblastes embryonnaires de rat (REF : Rat Embryonary Fibroblast). La PCR est réalisée à une température d'amorçage de 60°C, temps d'élongation 2 min, pendant 35 cycles. La PCR précédente est suivie d'une deuxième en utilisant le couple d'amorce *Msx-1 P₁rev* 5'GTACTGCTTCTGGCGGAACT-3' et *Msx-1 AS9* 5'CATAGTACACACACAGTCCC-3'. Le fragment amplifié est analysé sur gel d'agarose en présence de bromure d'éthidium. Le produit de PCR (400-500 ng) est cloné à l'aide du kit Sure Clone® ligation kit (Pharmacia-Biotech) dans le vecteur pUC 18 linéarisé par l'enzyme *SmaI* (bouts francs) pendant 4 h à 16°C. Des bactéries *Escherichia coli* XL1 bleue sont transformées par le plasmide recombinant selon le protocole décrit dans le kit de ligation. Les clones positifs sont sélectionnés par une PCR directe à l'aide d'amorces situées de part et d'autre du site de clonage et le plasmide est purifié par un système de purification plasmidique recombinant JET Star fourni par GENOMED (Angleterre). Enfin, le séquençage automatique est effectué par Genome Express (Montreuil, France).

Extraction des ARN

Les rattes *Sprague-Dawley* sont fournies par *Charles River, Saint-Aubin Les Elboeuf (France)*, les calvaria sont obtenus à partir de culture primaire à J9 et *in vivo* de différents stades du développement, du 15^{ème} jour de la vie embryonnaire jusqu'à 1 jour post-natal. L'extraction des ARN totaux est faite selon la méthode de Chomczynski et Sacchi (1987) à l'aide du réactif Tri Reagent selon le protocole fourni (*Euromedex, France*). La concentration et la pureté des échantillons sont estimées par spectrophotométrie à 260 nm et 280 nm (*Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech, Cambridge, Angleterre*). Les ARN sont conservés à -80°C.

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

La rétro-transcription a été effectuée par l'enzyme, SuperScript™ II RNase H Reverse Transcriptase, selon le protocole fourni par *Invitrogen Life Technologies (Gergy-Pontoise, France)*. 3 µg d'ARN totaux ont été transcrits par la reverse transcriptase à l'aide d'une amorce oligo dT. La PCR de 25-30 cycles a été réalisée en utilisant la *polymerase ADN EurobioTAQÒ (Eurobio, Les Ulis, France)*, 2 µl de produit de RT, 10 pmol de chaque amorce *forward* et *reverse* : ARN sens *Msx-1* rat (amorces situées dans l'exon-1) : 5' TCCTCAAGCTGCCAGAAGAT-3' et 5' TCAGGTGGTACATGCTGTAG-3'; ARN AS *Msx-1* rat 5'CTAAGCGATGCAAAGACCTAGCC -3' et 5' TGTGCTGGGCTATGGGACTT -3' (les amorces spécifiques du transcrit antisens sont

situées dans l'intron séquençé) GAPDH *rat* 5'GACCCCTTCATTGACCTCAACTAC-3' et 5' AAGTTGTCATGGATGACCTTGGCC-3'. Dans ces conditions, l'amplification des produits de PCR reste dans la phase exponentielle. Toutes les analyses par PCR ont été effectuées en parallèle avec deux contrôles négatifs : le premier sans matrice sert d'index de pureté des réactifs utilisés et le second sur les ARN non rétro-transcrits sert de contrôle d'une éventuelle contamination génomique. 10 µl de produit de la PCR ont été déposés sur gel d'agarose de 1-1.5%.

Analyse par northern blotting

L'analyse par northern blotting a été réalisée à partir d'ARN de calvaria de fœtus du rat prélevés du 16^{ème} jour de gestation jusqu'au 1^{er} jour post-natal. L'électrophorèse de 20 µg d'ARN totaux est effectuée sur un gel d'agarose de 1% , les ARN sont transférés sur une membrane de nylon (Hybond-N+, Amersham Pharmacia). Les membranes sont ensuite hybridées avec des sondes d'ADN Msx-1 (vecteur fourni par le Dr. Benoît Robert, Institut Pasteur, Paris, portant un insert de 950 pb situé dans la séquence codante de Msx-1 du second exon). Ce fragment est marqué avec [α -³²P] deoxy-CTP (3000 Ci/mmol ; Amersham) par la méthode de random priming (Kit Rediprime, Amersham). Les membranes sont hybridées à 42°C pendant 24 heures, puis lavées à température ambiante, par ensemencement : tampon citrate de sodium 2x SSC (avec 0.1 % SDS), 1x et 0.5x SSC (0.1% SDS) à 42°C pendant 10 min. Les membranes sont exposées avec des films Kodak X-OMAT AR ou BioMax pendant 3-21 jours. La ribosonde Msx-1 est synthétisée à partir du plasmide Bluescript-SK(+) linéarisé avec Pst1 contenant une séquence de 950 pb de l'exon-2 du gène Msx-1 de souris (Robert et coll., EMBO J., 8, 91-100, 1989). La ribosonde (650 pb) est générée par l'enzyme T7 polymerase, comme décrit dans le protocole du système de transcription des ribosondes *in vitro* (Promega). Cette sonde est marquée par 5[α -³²P] CTP (400 Ci/mmol ; Amersham) et les membranes sont hybridées puis lavées selon le protocole d'hybridation ExpressHybTM. (Ozyme, BD Bioscience Clontech). L'hybridation est visualisée après une exposition avec des films BioMax, développés après une heure, une nuit et 3 jours.

Recherche de l'ARN antisens du gène Msx-1 par RACE-PCR

L'extraction des ARN totaux est faite dans les conditions décrites précédemment. Des ADNc chevauchants correspondant aux extrémités 5' et 3' de l'ARN AS ont été recherchés à l'aide du kit SMARTTM RACE (Clontech BD Bioscience, USA). Les deux brins d'ADNc sont synthétisés à partir d'ARN de calvaria de fœtus de rat au stade J19 de gestation, 3 µg d'ARN totaux ont été rétro-transcrits selon le protocole du kit SMARTTM RACE cDNA Amplification (Clontech).

L'amplification de l'extrémité 5' de l'ARN antisens de Msx-1 est initiée par une première PCR en utilisant une amorce située dans l'intron de Msx-1 du rat (séquencé) Msx-1 AS/Spe1:5' CTAAGCGATGCAAAGACCTAGCCC-3'. L'amplification de l'extrémité 3' de l'ARN AS est effectuée avec une autre amorce intronique AS/Spe2 : 5' TGTGCTGGGCACTATGGGCACTT - 3'. L'amorce adaptateur Universal Primer Mix A 10x (UPM) est couplée avec les amorces précédentes (**Figure 4A**). La première PCR est suivie d'une PCR nested, utilisant des amorces introniques internes Msx-1 AS Race 5' GCGATGCACTTGGCGGGCACAAATAC -3' et Msx-1 AS Race 3' 5' GGGCAGAGACAGTGCCAACCTACCTT -3'. Les dernières amorces ont été associées avec une amorce Nested Universal Primer A (NUPM) afin d'amplifier les régions 5' et 3' de l'ARN AS du gène Msx-1. Le clonage et le séquençage de cet ARN antisens dans le calvaria du fœtus du rat sont en cours.

RESULTATS

Séquençage de l'intron de Msx-1 du rat

Lorsque nous avons initié ce travail, l'intron du gène Msx-1 du rat était inconnu. Nous avons tout d'abord amplifié par PCR un fragment d'ADN contenant cet intron à l'aide d'amorces situées dans l'exon 1 et l'exon 2 du gène, à partir d'ADN génomique de rat. Le fragment obtenu, de 2-2.5 kb, a été cloné dans le plasmide pUC 18. Le séquençage de l'insert a révélé une séquence de 2040 pb. Celle-ci contient un intron de x pb, encadré par les séquences connues de l'ADNc de rat, et présentant les sites consensus d'épissage (gt en 5' et ag en 3' de l'intron). Le site d'insertion de cet intron dans l'ADNc de rat est identique à celui décrit chez la souris. La séquence intronique du gène Msx-1 dérivée de ce travail est déposée dans les banques de données EMBL sous le numéro d'accession AJ555555 (**Figure 1**). Ces résultats nous ont permis de choisir des oligonucléotides et une sonde (intronique) dessinés pour détecter spécifiquement l'éventuel ARN AS Msx-1 de rat.

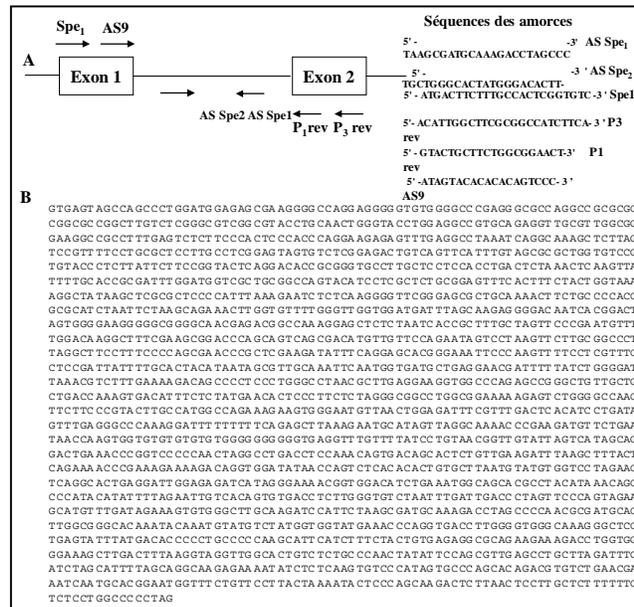


Figure 1. Séquençage de l'intron du gène *Msx-1* chez le rat. (A) : Les deux couples d'amorces Spe₁/P₃ rev, AS₉/P₁ rev, situées dans l'exon 1 et l'exon 2 et utilisés pour l'amplification de l'intron. Le couple d'amorce As spe₁/As spe₂ choisi dans la partie intronique a permis de mettre en évidence la présence de l'ARN AS du gène *Msx-1* dans le calvaria de fœtus du rat. (B) : Séquence de l'intron (2040 pb) (AC : AJ 555555).

Expression de l'ARN AS du gène *Msx-1* au cours du développement de calvaria de fœtus de rat

L'existence de l'ARN antisens du gène *Msx-1* a été confirmée dans le calvaria du fœtus de rat *in vivo* et *in vitro*. Nos résultats de RT-PCR indiquent la présence de cet ARN AS au cours du développement du calvaria du 15^{ème} jour jusqu'au 19^{ème} jour de gestation (**Figure 2**). D'autre part, l'analyse de northern blotting dans calvaria montre que les transcrits AS de *Msx-1* (2.1 kb) sont détectés du 16^{ème} jour de gestation jusqu'au 1^{er} jour post-natal (**Figure 3**). La détection de cet ARN AS a été confirmée par hybridation d'un northern blot avec une ribosonde détectant spécifiquement le brin antisens *Msx-1*.

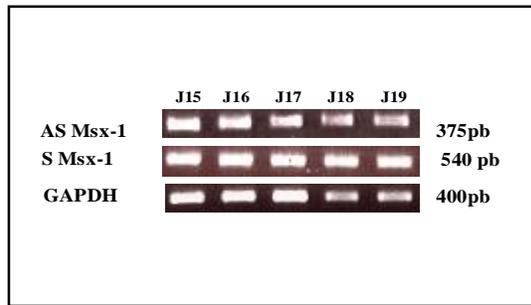


Figure 2. Expression des transcrits sens et antisens du gène *Msx-1* dans le calvaria de fœtus de rat détecté par RT-PCR.

Dans le calvaria *in vivo* à partir du 15^{ème} jour jusqu'au 19^{ème} jour de gestation ; l'ARN sens du gène *Msx-1a* a été mis en évidence avec des amorces P4-*Msx-1*/ P2- *Msx-1* situées dans l'exon1 et l'exon 2 de l'ADNc de rat. L'ARN AS de *Msx-1* est détecté à l'aide d'amorces introniques AS Spe1-*Msx-1*/AS Spe2-*Msx-1* spécifiques situées dans l'intron séquençé.

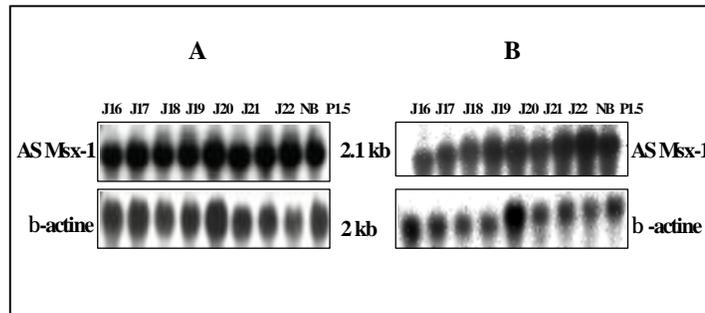


Figure 3. Analyse par northern blotting de l'ARN AS du gène *Msx-1* dans le calvaria de fœtus de rat.

(A) : Cinétique d'expression du transcrit antisens (2.1 kb) du gène *Msx-1* du 16^{ème} jour de la vie embryonnaire jusqu'au 1^{er} jour post-natal détecté avec une sonde d'ADN. (B) : Expression de l'ARN AS du gène *Msx-1* dans le calvaria au cours du développement, détecté par une ribsonde spécifique du brin de l'ARN AS.

Analyse de L'ARN AS de Msx-1 du rat

L'amplification par Race-PCR des extrémités 5' et 3' de l'ARN AS Msx-1, à partir de calvaria de fœtus au stade J19, montre la présence de deux fragments (chevauchant sur 200 pb). Un fragments Race 3' d'environ 650 pb et un fragment de Race 5' d'environ 1.7 kb. La taille de 2.1 kb de cet ANR AS a été confirmé par une analyse de localisation des amorces introniques choisies et leur chevauchement. La structure de ce transcrit AS sera confirmée par clonage et séquençage (en cours) (**Figure 4**).

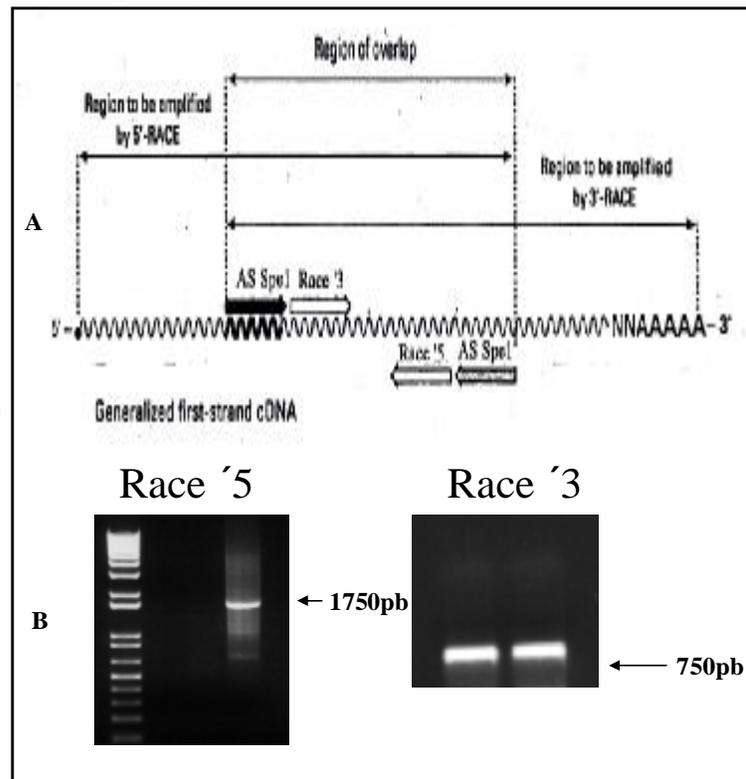


Figure 4. Amplification par Race-PCR des extrémités 5' et 3' du transcrit antisens du gène Msx-1 dans le calvaria du fœtus de rat. (A) : Le choix des amorces situées dans l'intron de Msx-1. La localisation de couple d'amorces AS Spe1/UPM et Race 3'/NUPM utilisé afin détecter l'extrémité 3'. L'utilisation de couples AS Spe2/UMP et Race 5'/NUPM a permis d'amplifier l'extrémité 5' de cet ARN AS. (B) : les fragments amplifiés par la PCR, ont des tailles de 750pb pour l'extrémité 3' et 1.75kb pour l'extrémité 5'.

VI. DISCUSSION GÉNÉRALE

Notre étude a été focalisée sur les mécanismes d'action des GC au cours de l'ossification endochondrale et membraneuse des structures craniofaciales chez le fœtus de rat. L'ensemble de nos résultats montre certains modes d'actions des GC au cours de la différenciation terminale des tissus cartilagineux et osseux : la régulation du système IGF/IGFBP, la régulation de l'expression des gènes tissu-spécifiques, les homéogènes de la famille Msx/Dlx et le gène maître Runx-2. D'autre part, ce travail a mis en évidence la présence chez le rat d'un ARN antisens codé par un des gènes essentiels de la squelettogenèse craniofaciale : le gène Msx-1.

Notre modèle d'étude est intéressant de plusieurs points de vue :

- 1- Chez le fœtus du rat, l'importance du septum nasal (cartilage de croissance) et du calvaria est dûe à leur apparition au sein du crâne entre le 17^{ème} et le 18^{ème} jour de la vie embryonnaire (Johnson, 1933). Cette apparition est en concomitance avec le pic des GC plasmatiques dosés au 18.5^{ème} jour de gestation (Cohen, 1973).
- 2- Nos cultures primaires de septum nasal (cartilage de croissance) et de calvaria de fœtus de rat, prélevés au 17.5^{ème} jour de gestation, représentent une acquisition progressive de l'ossification endochondrale et membraneuse *in vitro* (pendant 2 semaines en présence d'acide ascorbique et de β -glycérophosphate) jusqu'à la minéralisation de la matrice extracellulaire (Sautier et coll., 1993 ; Nefussi et coll., 1985). Ce modèle nous a permis d'étudier aussi la régulation hormonale de ces deux processus par la dexaméthasone (analogue synthétique des GC) en concentration physiologique mimant le taux circulant *in vivo*.
- 3- Chez les mammifères, le système IGF/IGFBP a été identifié dans la sphère orofaciale avec une haute sécrétion et notre étude s'est portée exclusivement sur l'action des GC modulant les effets biologiques autocrine/paracrine des IGF.
- 4- Le septum nasal et le calvaria sont des structures craniofaciales qui ont pour origine des cellules des crêtes neurales céphaliques, contrairement à la majorité des travaux réalisés dans ce domaine et portant sur des tissus d'origine mésodermique. De plus, le septum nasal et le calvaria jouent un rôle directeur dans le développement correct du crâne et de la face au vu des malformations craniofaciales humaines associées à un développement incorrect de ces deux structures.
- 5- A l'heure actuelle, la régulation des homéogènes par les GC est un sujet peu abordé, d'où l'importance de notre étude qui porte sur le décryptage des mécanismes d'action des GC lors de la phase terminale de la différenciation des structures cartilagineuses et osseuses de la sphère orofaciale.

1 - Maintenance de l'intégrité du système cartilagineux et osseux par les GC

La culture primaire de chondrocytes (septum nasal de fœtus du rat) et d'ostéoblastes (calvaria), présente différentes phases : la prolifération, la différenciation et la formation des nodules minéralisés dans le cartilage et l'os développés. Notre étude montre que la DEX, en concentration équivalente à 10 nM pour le cartilage et à 100 nM pour l'os, induit une réponse maximale similaire à celle observée *in vivo* dans le sérum fœtal de rat (Cohen, 1973). Morphologiquement, l'effet de cette hormone est plus accentué dans les chondrocytes et les ostéoblastes engagés dans le programme de différenciation que dans les cellules moins différenciées. L'effet différenciant de la DEX (à 10 nM) augmente trois paramètres de la biominéralisation chondrocytaire, tels que la sulfatation des protéoglycanes, l'activité de la phosphatase alcaline et le dépôt de calcium. Des travaux précédents réalisés chez le lapin ont montré que la DEX induit plusieurs paramètres cartilagineux (Kato et Gospodarowicz, 1985 ; Takano et coll., 1985). Notre étude biochimique et moléculaire montre que l'effet différenciant de la DEX (à 100 nM) augmente les marqueurs de différenciation ostéoblastique tels que l'activité de la phosphatase alcaline, le dépôt de calcium et les transcrits codant pour le collagène de type I. Ces résultats montrent donc que les glucocorticoïdes sont impliqués dans le processus d'ossification endochondrale et membraneuse en fin de gestation chez le rat.

2 - Modulation des IGFBP du septum nasal par les GC

Dans des conditions basales, les chondrocytes du septum nasal (cartilage de croissance) du fœtus de rat en culture primaire sécrètent les IGFBP-2 à -6. L'analyse des IGFBP a été réalisée dans différents modèles : *chez le rat* dans le cartilage articulaire (Kièpe et coll., 2001), *chez la souris* dans le cartilage de croissance durant les stades précoces de la chondrogenèse, les transcrits codant pour l'IGFBP-5 et -6 étant détectés (Wang et coll., 1995) et *chez le fœtus du mouton* dans le cartilage de croissance, les ARN codant pour IGFBP-2 à -6 étant exprimés (De los Rios et Hill, 1999). Dans notre modèle, les IGFBP-2 à -6 sont sécrétées en quantité importante (condition basale). Cette sécrétion pourrait être due à la spécificité du site anatomique du septum nasal, contrairement à un autre modèle de cartilage de croissance chez le nouveau-né du lapin où la détection des IGFBP est faible (Koedam et coll., 2000).

Dans les tissus minéralisés, l'implication des GC dans la voie du système IGF/IGFBP a été démontrée (Canalis, 1998 ; Jux et coll., 1998). Le rôle physiologique des IGFBP dans de nombreux types cellulaires a été étudié, mais la régulation hormonale des IGFBP par les GC reste mal définie. Dans notre culture de chondrocytes de septum nasal du fœtus de rat, la DEX en dose-dépendante, induit la production de l'IGFBP-3 (effet biphasique à 10 nM), cet effet

hormonal de la DEX est similaire à celui observé dans le cartilage de croissance de nouveau-né du lapin concernant l'IGFBP-3 et -5 (Koadam et coll., 2000). Par contre, nos résultats montrent une diminution des IGFBP-2 et IGFBP-5 dans les mêmes conditions de culture. Cette diminution des IGFBP-2 et -5 est identique dans les chondrocytes fœtaux du mouton, mais en concentration supraphysiologique de DEX (De los Rios et Hill, 2000). En conclusion, la production des IGFBP-2 à -6, sécrétées localement par les chondrocytes fœtaux du septum du rat, est régulée par des concentrations physiologiques de GC. En effet, cette hormone module la balance des IGFBP, et par conséquent, modifie les effets biologiques des IGF et leur disponibilité, mode d'action des IGFBP (Collet-Solberg et Cohen, 2000).

3 - Régulation des fragments de dégradation des IGFBP par les GC

Dans notre système de culture du septum nasal du fœtus du rat, différents fragments de dégradation des IGFBP sont détectés en condition basale, tels que la forme 18 kDa de l'IGFBP-2, la forme 30 kDa de l'IGFBP-3 et la forme 20 kDa de l'IGFBP-5. La sécrétion des formes intactes et dégradées des IGFBP sont régulées par la DEX lors la phase terminale de la différenciation chondrocytaire. Le rôle physiologique de l'IGFBP-2 est mal connu *in vitro* et *in vivo*. Cependant dans notre culture, la régulation de la forme dégradée de l'IGFBP-2 (18 kDa) par la DEX est plus accentuée que la forme intacte (31-32 kDa), ce qui pourrait expliquer son rôle lors de la biominéralisation. Par contre, la forme dégradée de l'IGFBP-3 (30 kDa) est régulée par la DEX aussi bien que la forme intacte (39-41 kDa). De plus, la régulation de la forme intacte de l'IGFBP-3 par la DEX est attribuée à l'IGF-dépendant (anti-prolifératif) au cours de la maturation de la MEC des chondrocytes du septum nasal de fœtus de rat. Cela peut être confirmé par le fait que cette régulation est absente dans les chondrocytes moins différenciés (augmentation d'IGFBP-3 à J12 mais pas à J8 de la culture en présence de DEX). En outre, le ratio entre la forme dégradée de l'IGFBP-5 (20 kDa) et sa forme intacte (27-29 kDa) est augmenté vue l'accumulation de la forme dégradée en concentration croissante de la DEX jusqu'à 10 nM. Cette forme dégradée pourrait avoir un rôle essentiel dans la transition du cartilage non minéralisé à un tissu minéralisé. Cette constatation est basée sur l'accumulation du même fragment dans le cartilage articulaire du rat favorisant la différenciation (Kièpe et coll., 2001). Dans différents systèmes *in vitro*, la présence de l'IGFBP-6 dans les cellules quiescentes (non prolifératives), montre son rôle autocrine inhibant la prolifération cellulaire (Bach, 1999). Dans notre modèle, l'IGFBP-6 est régulée positivement par la DEX, cela confirme son rôle différenciant dans le site spécifique du septum nasal, inhibant les effets biologiques des IGF-II (liaison préférentielle avec IGFBP-6 hautement sécrétée).

En conclusion, la protéolyse des IGFBP-2, -3 et -5 dans notre modèle est régulée par la DEX, cette régulation est en relation avec la différenciation chondrocytaire (minéralisation). Le mécanisme d'action de ces fragments est probablement dû à leurs récepteurs propres (IGF-indépendante) et reste à identifier et à caractériser.

4 - Expression des homéogènes dans le calvaria et leur régulation par les GC

Dans notre modèle, la présence des transcrits *Dlx-5*, *Msx-2* et *Runx-2* a été confirmée durant le stade terminal de la minéralisation du calvaria du fœtus du rat. L'expression de ces ARNm est détectée dans les calvaria *in vitro* (en condition basale de la culture) et *in vivo* dans tous les stades du développement étudiés, du 16^{ème} jour de la vie embryonnaire jusqu'au 1^{er} jour post-natal. D'autre part, l'expression de ces transcrits est régulée *in vitro* par la DEX en concentration physiologique (100 nM) et *in vivo* autour du pic des GC (16^{ème} jour-19^{ème} de gestation). Dans notre système, l'expression du gène maître *Runx-2* est induite par des concentrations physiologiques des GC aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Ce résultat est en accord avec d'autres travaux qui montrent le rôle physiologique de ce gène dans la différenciation des ostéoblastes humains, dans l'induction du gène d'ostéocalcine (Ducy, 2000 ; Prince et coll., 2001 ; Zaidi et coll., 2001) et dans l'ossification entière du squelette (souris délétées de *Runx-2*) (Shirakabe et coll., 2001). De même, notre étude a montré que l'expression des transcrits codant pour la protéine *Msx-2* est augmentée par les GC, dans le calvaria *in vitro* et *in vivo*. Des études précédentes ont prouvé le rôle primordial de ce gène dans l'ossification membraneuse du calvaria et dans la dent, en particulier son rôle dans la régulation du gène de l'ostéocalcine (Newberry et coll., 1997 ; 1998 ; Towler et coll., 1994).

Parallèlement, dans nos modèles de calvaria étudiés, les transcrits du gène *Dlx-5* sont régulés positivement par les GC. Des études antérieures avaient montré le rôle de ce gène dans la différenciation ostéoblastique du calvaria (Ryoo et coll., 1997). En outre, les souris *Dlx-5*^{-/-} meurent à la naissance et présentent des défauts craniofaciaux, un retard d'ossification crânien et une ostéogenèse anormale (Acampora et coll., 1999). Dans le calvaria de poulet, l'homéoprotéine *Dlx-5* induit plusieurs marqueurs spécifiques de l'os, tels que l'ostéocalcine, l'ostéopontine, le collagène de type I et l'activité de la phosphatase alcaline (Tadic et coll., 2002). Dans notre système comme dans le calvaria de fœtus de rat au 21^{ème} jour de gestation, les glucocorticoïdes en concentration physiologique induisent l'expression du gène de l'ostéocalcine (Shalhoub et coll., 1998).

En conclusion, différents travaux avaient montré l'implication des gènes *Msx-2*, *Dlx-5*, *Runx-2* et le gène de l'ostéocalcine dans le développement des tissus minéralisés. Nos résultats

montrent que les glucocorticoïdes stimulent l'expression du gène de l'ostéocalcine directement ou indirectement en régulant l'expression Msx-2, Dlx-5 et Runx-2. Les glucocorticoïdes sont donc impliqués dans la mise en place des centres d'ossification du calvaria de fœtus de rat en fin gestation. Un mode d'action des GC est la modulation de l'expression de différents facteurs de transcription tels que Msx-2, Dlx-5 et Runx-2 pour qu'ils soient suffisamment disponibles pour réguler le promoteur de l'ostéocalcine. Les glucocorticoïdes pourraient également s'avérer nécessaires dans la stabilité du complexe RG-GC et le GRE du promoteur de l'ostéocalcine.

5 - Expression de l'ARN antisens du gène Msx-1 dans calvaria de fœtus de rat

Nos travaux portant sur l'expression des homéogènes et leur régulation par les GC dans le calvaria au cours du dernier 1/3 de gestation chez le rat, nous ont conduit à nous intéresser au gène Msx-1. Dans notre laboratoire, il a été montré que le gène Msx-1 joue un rôle clé dans la différenciation odontoblastique et présente un mode de régulation original impliquant un ARN AS codé par le même gène et produit par une lecture inversée du gène.

Afin d'étudier le gène Msx-1 et son ARN AS dans nos modèles, nous avons entrepris la caractérisation de l'ARN AS Msx-1 de rat et initié l'étude de son expression dans nos modèles. Le clonage et le séquençage de l'intron du gène Msx-1 de rat, nous ont fourni les outils (amorces et sondes) nécessaires. Nous avons ainsi montré l'existence d'un ARN AS Msx-1 chez le rat. Celui-ci est exprimé au cours du développement du calvaria *in vivo* et dans nos modèles *in vitro*. La taille (2.1 kb) et la structure de cet ARN AS sont proches de celles de l'ARN AS Msx-1 de souris. Leur structure recouvre la totalité de l'exon-2 et la moitié de l'intron (Blin et coll., 2001). Parallèlement, l'analyse préliminaire de nos résultats (le choix des amorces et des sondes utilisés) indiquerait que cet ARN contient l'exon-2 et une partie de l'intron. La structure sera confirmée après le clonage et le séquençage qui sont en cours. Cela suggère une conservation structurale de ce transcrite antisens entre la souris et le rat qui pourrait refléter un rôle physiologique identique au cours de la biominéralisation des structures orofaciales (dent et calvaria).

Différentes études ont révélé l'existence d'ARN AS naturels dans de nombreuses espèces, telles que la drosophile, xénope, souris et l'homme. Le rôle inhibiteur de l'ARN dans la régulation de l'expression des gènes cibles a été décrit dans plusieurs cas (Kumar, 1998). Leurs fonctions sont variées et peuvent affecter, par exemple, la maturation, le transport ou la dégradation des ARN sens, et la traduction. Ainsi, une étude précédente a montré le rôle d'un ARN AS contenant une portion intronique dans la régulation de l'épissage de l'ARN pré-messager (Wolloch, 1991). Par ailleurs, certains ARN AS ont la même taille que le transcript

sens mais la direction est opposée. Ils forment un duplex ARN AS/S avec complémentarité parfaite. Dans ce domaine, différents ARN AS ont été mis en évidence, par exemple, le transcript AS de l'FGF (xenope et rat) codant pour une protéine très conservée de la famille Mult (hydrolase), l'ARN AS C-myc et le transcript de Xist (inactivation du chromosome X après fécondation) (Knee, 1997 ; Bentley, 1986 ; Lee, 1999). Le rôle physiologique des ARN AS commence à être élucidé, par exemple ; leur rôle a été confirmé dans la régulation des perturbations psychiatriques, la leucémie chronique, l'ostéogenèse, le contrôle de l'hypertension.

Il a été montré dans notre laboratoire que l'ARN AS est associé, chez la souris, au développement des tissus minéralisés (Blin, 2001). Nos résultats montrant l'expression d'un ARN AS *Msx-1* au cours de la biominéralisation du calvaria de fœtus de rat, permettront de poursuivre l'étude du rôle de cet ARN AS dans des modèles *in vitro* et *in vivo*. Ces modèles permettront également d'aborder les mécanismes d'action de cet ARN AS.

VII. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Dans la sphère orofaciale, nous avons pu mettre en évidence que les glucocorticoïdes exerçaient leur effets par au moins deux modes d'action différents. Lors de l'ossification endochondrale, plus précisément au cours de la biominéralisation du cartilage de croissance de fœtus de rat en fin gestation, les glucocorticoïdes modifient les effets biologique des IGF en modulant la production des IGFBP. Dans le cartilage de croissance (septum nasal), la présence des formes intactes et des fragments de dégradation des IGFBP indiquerait qu'un clivage des IGFBP sécrétées s'effectue par action de protéases qui restent à identifier. Le rôle physiologique des IGFBP et de leurs fragments de dégradation, indépendant des IGF, a été montré au cours de la chondrogenèse (Spagnoli et coll., 2000 ; Kiepe et coll., 2001) et dans l'os humain (Binoux et coll., 2000). Les GC pourraient aussi réguler les récepteurs propres des formes intactes et dégradées des IGFBP, ce qui s'ajouterait aux modes d'action des GC au cours du développement du squelette craniofacial.

Nous avons montré également que les GC interviennent dans l'ossification membraneuse du calvaria de fœtus de rat, en régulant l'expression du marqueur fonctionnel de la différenciation ostéoblastique, le gène de l'ostéocalcine. L'action de cette hormone sur la transcription du gène de l'ostéocalcine est directe ou indirecte et régule l'expression de deux gènes majeurs des tissus minéralisés, les gènes *Msx-2*, *Dlx-5* et un facteur de transcription d'importance *Runx-2*. Il serait intéressant de voir si une même régulation est présente lors de l'ossification endochondrale.

Dans le calvaria de rat au cours du développement, nous avons mis en évidence la présence d'un ARN antisens du gène *Msx-1*. L'analyse préliminaire de nos résultats (le choix des amorces et des sondes utilisées) indiquerait que cet ARN contient l'exon-2 et une partie de l'intron ; la structure sera confirmée après le clonage et le séquençage qui sont en cours. Le rôle des ARN AS de haut poids moléculaire contenant une portion intronique a été décrit dans la régulation de l'épissage de l'ARN pré-messager. Ceci ouvre des voies de recherche passionnantes sur les mécanismes d'action de ce transcrit AS au cours du développement des tissus minéralisés du squelette craniofacial.

VIII. BIBLIOGRAPHIE

- Abad V, Meyers JL, Weise M, Gafni RI, Barnes KM, Nilsson O, Bacher JD, Baron J.** (2002). The role of the resting zone in growth plate chondrogenesis. *Endocrinology* 143(5) : 1851-7.
- Abbott BD, McNabb FM, Lau C.** (1994). Glucocorticoid receptor expression during the development of the embryonic mouse secondary palate. *J Craniofac Genet Dev Biol* 14(2) : 87-96.
- Abe Y, Aida Y, Abe T, Hirofuji T, Anan H, Maeda K.** (2000). Development of mineralized nodules in fetal rat mandibular osteogenic precursor cells : requirement for dexamethasone but not for beta-glycerophosphate. *Calcif Tissue Int* 66(1) : 66-9.
- Acampora D, Merlo GR, Paleari L, Zerega B, Postiglione MP, Mantero S, Bober E, Barbieri O, Simeone A, Levi G.** (1999). Craniofacial, vestibular and bone defects in mice lacking the Distal-less-related gene *Dlx5*. *Development* 126(17) : 3795-809.
- Acampora D, Boyl PP, Signore M, Martinez-Barbera JP, Ilengo C, Puelles E, Annino A, Reichert H, Corte G, Simeone A.** (2001). OTD/OTX2 functional equivalence depends on '5 and 3' UTR-mediated control of *Otx2* mRNA for nucleo-cytoplasmic export and epiblast-restricted translation. *Development* 128 : 4801-4813.
- Akner G, Wikstrom AC, Gustafsson JA.** (1995). Subcellular distribution of the glucocorticoid receptor and evidence for its association with microtubules. *J Steroid Biochem Mol Biol* 52(1) : 1-16.
- Bach LA.** (1999). Insulin-like growth factor binding protein-6 : The "forgotten" binding protein ? *Horm Metab Res* 31 : 226-234.
- Banerjee C, Hiebert SW, Stein JL, Lian JB, Stein GS.** (1996). An AML-1 consensus sequence binds an osteoblast-specific complex and transcriptionally activates the osteocalcin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(10) : 4968-73.
- Baylink DJ, Finkelman RD, Mohan S.** (1993). Growth factors to stimulate bone formation. *J Bone Miner Res* 8 : S565-72.
- Beato M, Klug J.** (2000). Steroid hormone receptors: an update. *Hum Reprod Update* 6(3) : 225-36.
- Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN.** (1987). Physiological concentrations of glucocorticoids stimulate formation of bone nodules from isolated rat calvaria cells in vitro. *Endocrinology* 121(6) : 1985-92.
- Bellows CG, Ciaccia A, Heersche JN.** (1998). Osteoprogenitor cells in cell populations derived from mouse and rat calvaria differ in their response to corticosterone, cortisol, and cortisone. *Bone* 23(2) : 119-25.
- Bellows CG, Heersche JNM, Aubin JE.** (1989). Effects of dexamethasone on expression and maintenance of cartilage in serum-containing cultures of calvaria cells. *Cell Tissue Res* 256 : 145-151.
- Ben Lagha N, Menuelle P, Seurin D, Binoux M, Lebouc Y, Berdal A.** (2002). Bone formation in the context of growth retardation induced by hIGFBP-1 overexpression in transgenic mice. *Connect Tissue Res* 43(2-3) : 515-9.
- Benoît R.** (2001). Development Biology cranio-facial genetic. *Journal de l'Edgewise* VI : 44.

- Bethan LT, Tucker AS, Qui M, Ferguson CA, Hardcastle Z, Rubenstein JLR, Sharpe PT.** (1997). Role of Dlx-1 and Dlx-2 genes in patterning of the murine dentition. *Development* 124, 4811-4818.
- Bhaumick B.** (1993). Insulin-like growth factor (IGF) binding proteins and insulin-like growth factor secretion by cultured chondrocyte cells : identification, characterization and ontogeny during cell differentiation. *Regulatory Peptides* 48 : 113-122.
- Bianchi ML.** (2002). Glucocorticoids and bone: some general remarks and some special observations in pediatric patients. *Calcif Tissue Int* 70(5) : 384-90.
- Binoux M, Lalou C, Mohseni-Zadeh S.** (2000). Biological actions of proteolytic fragments of the IGF binding proteins. In : Rosenfeld R and Roberts C (ed) *Contemporary Endocrinology : The IGF system*, Humana Press, pp. 281-313.
- Biola A, Pallardy M.** (2000). [Mode of action of glucocorticoids]. *Presse Med* 29(4) : 215-23.
- Blair HC, Zaidi M, Schlesinger PH.** (2002). Mechanisms balancing skeletal matrix synthesis and degradation. *Biochem J* 364(Pt 2) : 329-41.
- Bland R.** (2000). Steroid hormone receptor expression and action in bone. *Clin Sci (Lond)* 98(2) : 217-40.
- Blin-Wakkach C, Lezot F, Ghoul-Mazgar S, Hotton D, Monteiro S, Teillaud C, Pibouin L, Orestes-Cardoso S, Papagerakis P, Macdougall M, Robert B, Berdal A.** (2001). Endogenous Msx1 antisense transcript : in vivo and in vitro evidences, structure, and potential involvement in skeleton development in mammals. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(13) : 7336-41.
- Birnbaum RS, Bowsher RR, Wiren KM.** (1995). Changes in IGF-I and -II expression and secretion during the proliferation and differentiation of normal rat osteoblasts. *J Endocrinol* 144(2) : 251-9.
- Borromeo V, Bramani S, Holder AT, Carter C, Secchi C, Beattie J.** (1996). Growth hormone stimulates the secretion of insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) by monolayer cultures of sheep costal growth plate chondrocytes. *Mol Cell Biochem* 162 : 145-151.
- Brosnan PG.** (2001). The hypothalamic pituitary axis in the fetus and newborn. *Semin Perinatol* 25(6) : 371-84.
- Brown JM, Wedden SE, Millburn GH, Robson LG, Hill RE, Davidson DR, Tickle C.** (1993). Experimental analysis of the control of expression of the homeobox-gene Msx-1 in the developing limb and face. *Development* 119 : 41-48.
- Burnstein KL, Cidlowski JA.** (1989). Regulation of gene expression by glucocorticoids. *Annu Rev Physiol* 51 : 683-99.
- Canalis E.** (1983). Effect of glucocorticoids on type I collagen synthesis, alkaline phosphatase activity and deoxyribonucleic acid content in cultured rat calvariae. *Endocrinology* 112 : 931-939.
- Canalis E, Centrella M, McCarthy TL.** (1991). Regulation of insulin-like growth factor-II production in bone cultures. *Endocrinology* 129(5) : 2457-62.

- Canalis E.** (1998). Inhibitory actions of glucocorticoids on skeletal growth. Is local insulin-like growth factor-I to blame ? *Endocrinology* 139 : 3041-3042.
- Candelieri GA, Liu F, Aubin JE.** (2001). Individual osteoblasts in the developing calvaria express different gene repertoires. *Bone* 28(4) : 351-61.
- Chambers D, McGonnell IM.** (2002). Neural crest : facing the facts of head development. *Trends Genet* 18(8) : 381-4.
- Clarke CH, Norfleet AM, Clarke MS, Watson CS, Cunningham KA, Thomas ML.** (2000). Perimembrane localization of the estrogen receptor alpha protein in neuronal processes of cultured hippocampal neurons. *Neuroendocrinology* 71(1) : 34-42.
- Clemmons DR.** (1998). Role of insulin-like growth factor binding proteins in controlling IGF actions. *Mol Cell Endocrinol* 140(1-2) : 19-24.
- Clever U, Karlson P.** (1960). Induction of puff changes in the salivary gland chromosomes of *Chironomus tentans* by ecdysone. *Exp Cell Res* 20 : 623-6.
- Cohen A.** (1973). Plasma corticosterone concentration in the foetal rat. *Horm Metab Res* 5 : 66.
- Collett-Solberg PF, Cohen P.** (2000). Genetics, chemistry, and function of the IGF/IGFBP system. *Endocrine* 12 : 121-136.
- Collet-Solberg PF, Cohen P.** (1996). The role of insulin-like growth factor binding proteins and IGFBP protease in modulating IGF action. *Endocrinol Metab Clin North Am* 25 : 591-614.
- Couly G, Creuzet S, Bennaceur S, Vincent C, Le Douarin NM.** (2002). Interactions between Hox-negative cephalic neural crest cells and the foregut endoderm in patterning the facial skeleton in the vertebrate head. *Development* 129(4) : 1061-73.
- Couly G, Grapin-Botton A, Coltey P, Ruhin B, Le Douarin NM.** (1998). Determination of the identity of the derivatives of the cephalic neural crest: incompatibility between Hox gene expression and lower jaw development. *Development* 125(17) : 3445-591.
- Couly GF, Coltey PM, Le Douarin NM.** (1993). The triple origin of skull in higher vertebrates : a study in quail-chick chimeras. *Development* 117(2) : 409-29.
- Cowles EA, DeRome ME, Pastizzo G, Brailey LL, Gronowicz GA.** (1998). Mineralization and the expression of matrix proteins during in vivo bone development. *Calcif Tissue Int* 62(1) : 74-82.
- Daughaday WH.** (1989). A personal history of the origin of the somatomedin hypothesis and recent challenges to its validity. *Perspect Biol Med* 32(2) : 194-211.
- Davidson D.** (1995). The function and evolution of Msx genes : pointers and paradoxes. *Trends Genet* 11(10) : 405-11.
- Defranco DB.** (2000). Role of molecular chaperones in subnuclear trafficking of glucocorticoid receptors. *Kidney Int* 57(4) : 1241-9.
- De los Rios P, Hill DJ.** (1999). Cellular localization and expression of insulin-like growth factors (IGFs) and IGF binding proteins within the epiphyseal growth plate of the ovine fetus : possible functional implications. *Can J Physiol Pharmacol* 77 : 235-249.

- De Los Rios P, Hill DJ.** (2000). Expression and release of insulin-like growth factor binding proteins in isolated epiphyseal growth plate chondrocytes from the ovine fetus. *J Cell Physiol* 183 : 172-181.
- Demarquay D, Dumontier MF, Bourguignon J, Hintz RL, Corvol MT.** (1992). Stimulation by GH of IGF1 proforms synthesized by rabbit chondrocytes cultured with bFGF in serum-free medium. *Exp Cell Res* 202(2) : 412-22.
- Ducy P.** (2000). Runx-2 : a molecular switch in osteoblast biology. *Dev Dyn* 219(4) : 461-71.
- Ducy P.** (2001). Contrôle génétique de la squelettogenèse. *Médecine/Science* 17 : 1242-51.
- Ducy P.** (2000). Cbfa1 : a molecular switch in osteoblast biology. *Dev Dyn* 219(4) : 461-71.
- Efstratiadis A.** (1998). Genetics of mouse growth. *Int J Dev Biol* 42(7) : 955-76.
- Engelbrecht Y, de Wet H, Horsch K, Langeveldt CR, Hough FS, Hulley PA.** (2003). Glucocorticoids induce rapid up-regulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and dephosphorylation of extracellular signal-regulated kinase and impair proliferation in human and mouse osteoblast cell lines. *Endocrinology* 144(2) : 412-22.
- Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, Wehling M.** (200). Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev* 52(4) : 513-56.
- Firth SM, Baxter RC.** (2002). Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocr Rev* 23(6) : 824-54.
- Franceschi RT.** (1999). The developmental control of osteoblast-specific gene expression: role of specific transcription factors and the extracellular matrix environment. *Crit Rev Oral Biol Med* 10(1) : 40-57.
- Francis-West P, Ladher R, Barlow A, Graveson A.** (1998). Signalling interactions during facial development. *Mech Dev* 75(1-2) : 3-28.
- Ghosh B, Wood CR, Held GA, Abbott BD, Lau C.** (2000). Glucocorticoid receptor regulation in the rat embryo: a potential site for developmental toxicity? *Toxicol Appl Pharmacol* 164(2) : 221-9.
- Gouilleux F.** (1999). [Interactions between the glucocorticoid receptor and transcription factors]. *J Soc Biol* 193(4-5) : 369-73.
- Frédéric Mallein-Gerin, Michel Van der Rest.** (1996). La culture de chondrocytes outil d'analyse de la différenciation et l'organisation moléculaire du cartilage. *Médecine/Science* n°10, vol. 12.
- Froger-Gaillard B, Hossenlopp P, Adolphe M, Binoux M.** (1989). Production of insulin-like growth factors and their binding proteins by rabbit articular chondrocytes : relationship with cell multiplication. *Endocrinology* 124 : 2365-2372.
- Graham J. Robert, Victoria S. Lucas.** (1994). Growth of nasal septum in the snell strain of hypopituitary dwarf mouse. *Eur J Orthodont* 16 : 138-148.
- Grigoriadis AE, Aubin JE, Heersche JNM.** (1989). Effects of dexamethasone and vitamin D3 on cartilage differentiation in a clonal chondrogenic cell population. *Endocrinology* 125 : 2103-2110.

- Hall BK.** (1983). Cell-tissue interactions : a rationale and resume. *J Craniofac Genet Dev Biol* 3(1) : 75-82.
- Harada S, Rodan GA.** (2003). Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* 423(6937) : 349-55.
- Hines ER, Collins JF, Jones MD, Serey SH, Ghishan FK.** (2002). Glucocorticoid regulation of the murine PHEX gene. *Am J Physiol Renal Physiol* 283(2) : F356-63.
- Hodgkinson JE, Davidson CL, Beresford J, Sharpe PT.** (1993). Expression of a human homeobox-containing gene is regulated by 1,25(OH)₂D₃ in bone cells. *Biochim Biophys Acta* 1174(1) : 11-6.
- Hochberg Z.** (2002). Mechanisms of steroid impairment of growth. *Horm Res* 58(1) : 33-8.
- Holleville N, Quilhac A, Bontoux M, Monsoro-Burq AH.** (2003). BMP signals regulate Dlx5 during early avian skull development. *Dev Biol* 257(1) : 177-89.
- Horton Jr WE, Cleveland J, Rapp U, Nemuth G, Bolander M, Doege K, Yamada Y, Hassell JR.** (1988). An established rat cell line expressing chondrocyte properties. *Exp Cell Res* 178 : 457-468.
- Humbel RE.** (1990). Insulin-like growth factors I and II. *Eur J Biochem* 190(3) : 445-62.
- Hunt P, Krumlauf R.** (1992). Hox codes and positional specification in vertebrate embryonic axes. *Ann Rev Cell Biol.* 8 : 227-56.
- Ishida H, Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN.** (1995). Tri-iodothyronine (T₃) and dexamethasone interact to modulate osteoprogenitor cell differentiation in fetal rat calvaria cell cultures. *Bone* 16(5) : 545-9.
- Jabs EW, Muller U, Li X, Ma L, Luo W, Haworth IS, Klisak I, Sparkes R, Warman ML, Mulliken JB et al.** (1993). A mutation in the homeodomain of the human MSX2 gene in a family affected with autosomal dominant craniosynostosis. *Cell* 75(3) : 443-50.
- Jenkins BD, Pullen CB, Darimont BD.** (2001). Novel glucocorticoid receptor coactivator effector mechanisms. *Trends Endocrinol Metab* 12(3) : 122-6.
- Jiang X, Iseki S, Maxson RE, Sucov HM, Morriss-Kay GM.** (2002). Tissue origins and interactions in the mammalian skull vault. *Dev Biol* 241(1) : 106-16.
- Johnson ML.** (1933). The time and order of appearance of ossification centers in the albino mouse. *Am J Anat* 52 : 241-271.
- Jux C, Leiber K, Hügel U, Blum W, Ohlsson C, Klaus G, Mehls O.** (1998). Dexamethasone impairs growth hormone (GH)-stimulated growth by suppression of local insulin-like growth factor (IGF)-I production and expression of GH- and IGF-I-receptor in cultured rat chondrocytes. *Endocrinology* 139 : 3296-3305.
- Karsenty G.** (1998). Genetics of skeletogenesis. *Dev Genet* 22(4) : 301-13.

- Kato Y, Gospodarowicz D.** (1985). Stimulation by glucocorticoids of the synthesis of cartilage matrix proteoglycans produced by rabbit costal chondrocytes in vitro. *J Biol Chem* 260 : 2364-2373.
- Knee R, Murphy PR.** (1999). Regulation of gene expression by natural antisense RNA transcripts. *Neurochem Int* 31(3) : 379-92.
- Kiepe D, Andress DL, Mohan S, Ständker L, Ulinski T, Himmele R, Mehls O, Tönshoff B.** (2001). Intact IGF-binding protein-4 and -5 and their respective fragments isolated from chronic renal failure serum differentially modulate IGF-I actions in cultured growth plate chondrocytes. *J Am Soc Nephrol* 12 : 2400-2410.
- Koedam JA, Hoogerbrugge CM, van Buul-Offers SC.** (2000.) Differential regulation of IGF-binding proteins in rabbit costal chondrocytes by IGF-I and dexamethasone. *J Endocrinol* 165 : 557-567.
- Kumar M, Carmichael GG.** (1998). Antisense RNA : Function and Fate of Duplex RNA in Cells Of higher Eukaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, pp. 1415-1434.
- Le Bouc Y.** (1996). *Biologie des IGF. Médecine & Thérapeutique*, vol. 2.
- Lee JT, Davidow LS, Warshawsky D.** (1999). Tsix, a gene antisense to Xist at the X-inactivation centre. *Nat Genet* 21 : 400-404.
- Lefebvre V, Li P, de Crombrughe B.** (1998). A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *EMBO J* 17(19) : 5718-33.
- Le Roith D, Bondy C, Yakar S, Liu JL, Butler A.** (2001). The somatomedin hypothesis. *Endocr Rev* 22(1) : 53-74.
- LeRoith D, Charles T, Roberts Jr.** (2003). The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer Lettres* 195 : 127-137.
- Lezot F, Thomas B, Hotton D, Forest N, Orestes-Cardoso S, Robert B, Sharpe P, Berdal A.** (2000). Biomineralization, life-time of odontogenic cells and differential expression of the two homeobox genes MSX-1 and DLX-2 in transgenic mice. *J Bone Miner Res* 15(3) : 430-41.
- Lezot F, Descroix V, Mesbah M, Hotton D, Blin C, Papagerakis P, Mauro N, Kato S, MacDougall M, Sharpe P, Berdal A.** (2002). Cross-talk between Msx/Dlx homeobox genes and vitamin D during tooth mineralization. *Connect Tissue Res* 43(2-3) : 509-14.
- Lian JB, Shalhoub V, Aslam F, Frenkel B, Green J, Hamrah M, Stein GS, Stein JL.** (1997). Species-specific glucocorticoid and 1,25-dihydroxyvitamin D responsiveness in mouse MC3T3-E1 osteoblasts : dexamethasone inhibits osteoblast differentiation and vitamin D down-regulates osteocalcin gene expression. *Endocrinology* 138(5) : 2117-27.
- Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A.** (1993). Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type I IGF receptor (Igf1r). *Cell* 75(1) : 59-72.

- Liu W, Toyosawa S, Furuichi T, Kanatani N, Yoshida C, Liu Y, Himeno M, Narai S, Yamaguchi A, Komori T.** (2001). Overexpression of Cbfa1 in osteoblasts inhibits osteoblast maturation and causes osteopenia with multiple fractures. *J Cell Biol* 155(1) : 157-66.
- Liu YH, Kundu R, Wu L, Luo W, Ignelzi MA Jr, Snead ML, Maxson RE, Jr.** (1995). Premature suture closure and ectopic cranial bone in mice expressing Msx2 transgenes in the developing skull. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(13) : 6137-41.
- Liu YH, Tang Z, Kundu RK, Wu L, Luo W, Zhu D, Sangiorgi F, Snead ML, Maxson RE.** (1999). Msx2 gene dosage influences the number of proliferative osteogenic cells in growth centers of the developing murine skull : a possible mechanism for MSX2-mediated craniosynostosis in humans. *Dev Biol* 205(2) : 260-74.
- Ludwig T, Eggenschwiler J, Fisher P, D'Ercole AJ, Davenport ML, Efstratiadis A.** (1996). Mouse mutants lacking the type 2 IGF receptor (IGF2R) are rescued from perinatal lethality in Igf2 and Igf1r null backgrounds. *Dev Biol* 177(2) : 517-35.
- McCarthy TL, Casinghino S, Centrella M, Canalis E.** (1994). Complex pattern of insulin-like growth factor binding protein expression in primary rat osteoblast enriched cultures : regulation by prostaglandin E2, growth hormone, and the insulin-like growth factors. *J Cell Physiol* 160(1) : 163-75.
- Maité Corvol.** (1996). Biologie du cartilage de croissance. *Médecine & Thérapeutique*, vol.2.
- Martin JL, Baxter RC.** (1992). Insulin-like growth factor binding protein-3 : biochemistry and physiology. *Growth Regul* 2(2) : 88-99.
- Marie Pierre.** (2001). Différenciation, fonction et contrôle de l'ostéoblaste. *Médecine/Science* 17 : 1252-9.
- Matsumoto T, Tsurumoto T, Goldring MB, Shindo H.** (2000). Differential effects of IGF-binding proteins, IGFBP-3 and IGFBP-5, on IGF-I action and binding to cell membranes of immortalized human chondrocytes. *J Endocrinol* 166 : 29-37.
- McGonnell IM, Graham A.** (2002). Trunk neural crest has skeletogenic potential. *Curr Biol* 12(9) : 767-71.
- Menuelle P, Babajko S, Plas C.** (1999). Insulin-like growth factor (IGF) binding proteins modulate the glucocorticoid-dependent biological effects of IGF-II in cultured rat hepatocytes. *Endocrinology* 140 : 2232-2240.
- Miyakoshi N, Richman C, Kasukawa Y, Linkhart TA, Baylink DJ, Mohan S.** (2001). Evidence that IGF-binding protein-5 functions as a growth factor. *J Clin Invest* 107(1) : 73-81.
- Mohan S, Baylink DJ.** (2002). IGF-binding proteins are multifunctional and act via IGF-dependent and -independent mechanisms. *J Endocrinol* 175(1) : 19-31.
- Mohan S, Thompson GR, Amaar YG, Hathaway G, Tschesche H, Baylink DJ.** (2002). ADAM-9 is an insulin-like growth factor binding protein-5 protease produced and secreted by human osteoblasts. *Biochemistry* 41(51) : 15394-403.
- Moss ML.** (1954). Growth of the calvaria in the rat ; the determination of osseous morphology. *Am J Anat* 94(3) : 333-61.

- Nadra R, Menuelle P, Chevallier S, Berdal A.** (2003). Regulation by glucocorticoids of cell differentiation and insulin-like growth factor binding protein production in cultured fetal rat nasal chondrocytes. *J Cell Biochem* 88(5) : 911-22.
- Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B.** (2002). The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108(1) : 17-29.
- Nefussi JR, Boy-Lefèvre ML, Boulekbache H, Forest N.** (1985). Mineralization in vitro of matrix formed by osteoblast isolated by collagenase digestion. *Differentiation* 29 : 160-168.
- Nefussi JR.** (1998). L'entité fonctionnelle odontologie et le déplacement dentaire provoqué. Dans : *Orthopédie Dento-faciale : une approche bioprogressive*. Quintessence Internationale, Chap.6.
- Newberry EP, Latifi T, Battaile JT, Towler DA.** (1997). Structure-function analysis of Msx2-mediated transcriptional suppression. *Biochemistry* 36(34) : 10451-62.
- Newberry EP, Latifi T, Towler DA.** (1998). Reciprocal regulation of osteocalcin transcription by the homeodomain proteins Msx-2 and Dlx-5. *Biochemistry* 37(46) : 16360-8.
- Newberry EP, Latifi T, Towler DA.** (1999). The RRM domain of MINT, a novel Msx2 binding protein, recognizes and regulates the rat osteocalcin promoter. *Biochemistry* 38(33) : 10678-90.
- Newton R.** (2000). Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important ? *Thorax* 55(7) : 603-13.
- O'Carroll AM, Don AL, Lolait SJ.** (2003). APJ receptor mRNA expression in the rat hypothalamic paraventricular nucleus: regulation by stress and glucocorticoids. *J Neuroendocrinol* 15(11) : 1095-101.
- O'Dell SD, Day IN.** (1998). Insulin-like growth factor II (IGF-II). *Int J Biochem Cell Biol* 30(7) : 767-71.
- Ogata N, Chikazu D, Kubota N, Terauchi Y, Tobe K, Azuma Y, Ohta T, Kadowaki T, Nakamura K, Kawaguchi H.** (2000). Insulin receptor substrate-1 in osteoblast is indispensable for maintaining bone turnover. *J Clin Invest* 105(7) : 935-43.
- Ohbayashi N, Shibayama M, Kurotaki Y, Imanishi M, Fujimori T, Itoh N, Takada S.** (2002). FGF18 is required for normal cell proliferation and differentiation during osteogenesis and chondrogenesis. *Genes Dev* 16(7) : 870-9.
- Olney RC, Mougey EB.** (1999). Expression of the components of the insulin-like growth factor axis across the growth plate. *Mol Cell Endocrinol* 156 : 63-71.
- Opperman LA.** (2000). Cranial sutures as intramembranous bone growth sites. *Dev Dyn* 219(4) : 472-85.
- Polani PE.** (1973). Incidence of developmental and other genetic abnormalities. *Proc R Soc Med.* 66(11) : 1118-9.
- Poole AR.** (1991). *Cartilage Molecular Aspects*. B. Hall, S Newman. CRC Press.

- Prince M, Banerjee C, Javed A, Green J, Lian JB, Stein GS, Bodine PV, Komm BS.** (2001). Expression and regulation of Runx2/Runx-2 and osteoblast phenotypic markers during the growth and differentiation of human osteoblasts. *J Cell Biochem* 80(3) : 424-40.
- Qiu Mn Bulfone A, Ghattas I, Meneses JJ, Christensen L, Sharpe PT, Presley R, Pedersen RA, Rubenstein JL.** (1997). Role of Dlx homeobox genes in proximodistal patterning of the branchial arches : mutations of Dlx-1, Dlx-2, and Dlx-1 and Dlx-2 alter morphogenesis of proximal skeletal and soft tissue structures derived from the first and second arches. *Dev Biol* 185 : 165-184.
- Robledo RF, Rajan L, Li X, Lufkin T.** (2002). The Dlx5 and Dlx6 homeobox genes are essential for craniofacial, axial, and appendicular skeletal development. *Genes Dev* 16(9) : 1089-101.
- Roodman GD.** (1996). Advances in bone biology : the osteoclast. *Endocr.Rev.*17:308-32
- Rooman R, Koster G, Bloemen R, Gresnigt R, van Buul-Offers SC.** (1999). The effect of dexamethasone on body and organ growth of normal and IGF-II-transgenic mice. *J Endocrinol.* 163(3) : 543-52.
- Ryoo HM, Hoffmann HM, Beumer T, Frenkel B, Towler DA, Stein GS, Stein JL, van Wijnen AJ, Lian JB.** (1997). Stage-specific expression of Dlx-5 during osteoblast differentiation : involvement in regulation of osteocalcin gene expression. *Mol Endocrinol* 11(11) : 1681-94.
- Saklatvala J.** (2002). Glucocorticoids: do we know how they work ? *Arthritis Res* 4(3) : 146-50.
- Sasaki N, Kusano E, Ando Y, Yano K, Tsuda E, Asano Y.** (2001). Glucocorticoid decreases circulating osteoprotegerin (OPG) : possible mechanism for glucocorticoid induced osteoporosis. *Nephrol Dial Transplant*16(3) : 479-82.
- Satokata I, Ma L, Ohshima H, Bei M, Woo I, Nishizawa K, Maeda T, Takano Y, Uchiyama M, Heaney S, Peters H, Tang Z, Maxson R, Maas R.** (2000). Msx2 deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nat Genet* 24(4) : 391-5.
- Satokata I, Maas R.** (1994). Msx1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nat Genet* 6(4) : 348-56.
- Sautier JM, Nefussi JR, Forest N.** (1993). In vitro differentiation and mineralization of cartilaginous nodules from enzymatically released rat nasal cartilage cells. *Biol Cell* 78(3) : 181-9.
- Schneider MR, Wolf E, Hoeflich A, Lahm H.** (2002). IGF-binding protein-5 : flexible player in the IGF system and effector on its own. *J Endocrinol* 172(3) : 423-40.
- Searles JC.** (1977). A radioautographic study of chondrocytic proliferation in nasal septal cartilage of the newborn rat. *Am J Anat* 150(4) : 659-3.
- Shalhoub V, Aslam F, Breen E, van Wijnen A, Bortell R, Stein GS, Stein JL, Lian JB.** (1998). Multiple levels of steroid hormone-dependent control of osteocalcin during osteoblast differentiation: glucocorticoid regulation of basal and vitamin D stimulated gene expression. *J Cell Biochem* 69(2) : 154-68.
- Shalhoub V, Conlon D, Tassinari M, Quinn C, Partridge N, Stein GS, Lian JB.** (1992). Glucocorticoids promote development of the osteoblast phenotype by selectively modulating expression of cell growth and differentiation associated genes. *J Cell Biochem* 50(4) : 425-40.

- Shepherdley CA, Daniels CB, Orgeig S, Richardson SJ, Evans BK, Darras VM.** (2002). Glucocorticoids, thyroid hormones, and iodothyronine deiodinases in embryonic saltwater crocodiles. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283(5) : R1155-63.
- Shirakabe K, Tresawa K, Miyama K, Shibuya H, Nishida E.** (2001). Regulation of the activity of the transcription factor Runx2 by two homeobox proteins, Msx-2 and Dlx-5. *Genes cells* 6 : 851-856.
- Siebler T, Robson H, Shalet SM, Williams GR.** (2001). Glucocorticoids, thyroid hormone and growth hormone interactions : implications for the growth plate. *Horm Res* 56 : 7-12.
- Smink JJ, Buchholz IM, Hamers N, van Tilburg CM, Christis C, Sakkers RJ, de Meer K, van.** (2003). Short-term glucocorticoid treatment of piglets causes changes in growth plate morphology and angiogenesis. *Osteoarthritis Cartilage* 11(12) : 864-71.
- Spagnoli A, Hwa V, Horton WA, Lunstrum GP, Roberts CT, Jr, Chiarelli F, Torello M, Rosenfeld RG.** (2000). Antiproliferative effects of insulin-like growth factor-binding protein-3 in mesenchymal chondrogenic cell line RCJ3.1C5.18. Relationship to differentiation stage. *J Biol Chem* 276(8) : 5533-40.
- Stockner T, Sterk H, Kaptein R, Bonvin AM.** (2003). Molecular dynamics studies of a molecular switch in the glucocorticoid receptor. *J Mol Biol* 328(2) : 325-34.
- Sunic D, Belford DA, McNeil JD, Wiebkin OW.** (1995). Insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) in bovine articular and ovine growth-plate chondrocyte cultures : their regulation by IGFs and modulation of proteoglycan synthesis. *BBA* 1245 : 43-48.
- Sutter-Dub MT.** (2002). Rapid non-genomic and genomic responses to progestogens, estrogens, and glucocorticoids in the endocrine pancreatic B cell, the adipocyte and other cell types. *Steroids* 67(2) : 77-93.
- Takano T, Takigawa M, Suzuki F.** (1985). Stimulation by glucocorticoids of the differentiated phenotype of chondrocytes and the proliferation of rabbit costal chondrocytes in culture. *J Biochem* 97 : 1093-1100.
- Takeda S, Bonnamy JP, Owen MJ, Ducy P, Karsenty G.** (2001). Continuous expression of Cbfa1 in nonhypertrophic chondrocytes uncovers its ability to induce hypertrophic chondrocyte differentiation and partially rescues Cbfa1-deficient mice. *Genes Dev* 15(4) : 467-81.
- Takigawa M, Okawa T, Pan H-O, Aoki C, Takahashi K, Zue J-D, Suzuki F, Kinoshita A.** (1997). Insulin-like growth factors I and II are autocrine factors in stimulating proteoglycan synthesis, a marker of differentiated chondrocytes, acting through their respective receptors on a clonal human chondrosarcoma-derived chondrocyte cell line, HCS2/8. *Endocrinology* 138 : 4390-4400.
- Thesleff I.** (1995). Homeobox genes and growth factors in regulation of craniofacial and tooth morphogenesis. *Acta Odontol Scand* 53(3) : 129-34.
- Thomas BL, Tucker AS, Qui M, Ferguson CA, Hardcastle Z, Rubenstein JL, Sharpe PT.** (1997). Role of Dlx-1 and Dlx-2 genes in patterning of the murine dentition. *Development* 124(23) : 4811-8.

- Towler DA, Rutledge SJ, Rodan GA.** (1994). Msx-2/Hox 8.1 : a transcriptional regulator of the rat osteocalcin promoter. *Mol Endocrinol* 8(11) : 1484-93.
- Trainor PA, Krumlauf R.** (2001). Hox genes, neural crest cells and branchial arch patterning. *Curr Opin Cell Biol* 13(6) : 698-705.
- Twigg SM, Baxter RC.** (1998). Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein 5 forms an alternative ternary complex with IGFs and the acid-labile subunit. *J Biol Chem* 273(11) : 6074-9.
- Underwood LE, D'Ercole AJ.** (1984). Insulin and insulin-like growth factors/somatomedins in fetal and neonatal development. *Clin Endocrinol Metab* 13 : 69-89.
- Van den Boogaard MJ, Dorland M, Beemer FA, van Amstel HK.** (2000). MSX1 mutation is associated with orofacial clefting and tooth agenesis in humans. *Nat Genet* 24(4) : 342-3.
- Van der Rest M.** (1987). Biologie du collagène et des maladies héréditaires de la matrice extracellulaire. *Médecine/Sciences* 3 : 411-420.
- Vastardis H, Karimbux N, Guthua SW, Seidman JG, Seidman CE.** (1996). A human MSX1 homeodomain missense mutation causes selective tooth agenesis. *Nat Genet* 13(4) : 417-21.
- Volloch V, Schweitzer B, Rits S.** (1991). Inhibition of Pre-messenger RNA splicing by antisense RNA containing sequences complementary to introns. *Biochem Biophys Res Commun* 179(3) : 1600-5
- Wang E, Wang J, Chin E, Zhou J, Bondy CA.** (1995). Cellular patterns of insulin-like growth factor system gene expression in murine chondrogenesis and osteogenesis. *Endocrinology* 136 : 2741-2751.
- Webster JC, Cidlowski JA.** (1999). Mechanisms of Glucocorticoid-receptor-mediated Repression of Gene Expression. *Trends Endocrinol Metab* 10(10) : 396-402.
- Weiss K, Stock D, Zhao Z, Buchanan A, Ruddle F, Shashikant C.** (1998). Perspectives on genetic aspects of dental patterning. *Eur J Oral Sci* 106(1) : 55-63.
- Whittle WL, Patel FA, Alfaidy N, Holloway AC, Fraser M, Gyomerey S, Lye SJ, Gibb W, Challis JR.** (2001). Glucocorticoid regulation of human and ovine parturition: the relationship between fetal hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation and intrauterine prostaglandin production. *Biol Reprod* 64(4) : 1019-32.
- Wilkie AO.** (1997). Craniosynostosis : genes and mechanisms. *Hum Mol Genet* 6(10) : 1647-56.
- Wurtz T, Berdal A.** (2003). Osteoblast precursors at different anatomic sites. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 13(2-4) : 147-61.
- Yamaguchi A, Komori T, Suda T.** (2000). Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr Rev* 21(4) : 393-411.
- Youssef EH.** (1966). The chondrocranium of the albino rat. *Acta Anat (Basel)* 64(4) : 586-617.
- Yudt MR, Cidlowski JA.** (2001). Molecular identification and characterization of a and b forms of the glucocorticoid receptor. *Mol Endocrinol* 15(7) : 1093-103.

Yudt MR, Cidlowski JA. (2002). The glucocorticoid receptor : coding a diversity of proteins and responses through a single gene. *Mol Endocrinol* 16(8) : 1719-26.

Zapf J, Froesch ER, Humbel RE. (1981). The insulin-like growth factors (IGF) of human serum : chemical and biological characterization and aspects of their possible physiological role. *Curr Top Cell Regul* 19 : 257-309.

Zhang H, Hu G, Wang H, Sciavolino P, Iler N, Shen MM, Abate-Shen C. (1997). Heterodimerization of Msx and Dlx homeoproteins results in functional antagonism. *Mol Cell Biol* 17(5) : 2920-32.

Zhang Z, Song Y, Zhang X, Tang J, Chen J, Chen Y. (2003). Msx1/Bmp4 genetic pathway regulates mammalian alveolar bone formation via induction of Dlx5 and Cbfa1. *Mech Dev* 120(12) : 1469-79.

Zhang Z, Song Y, Zhao X, Zhang X, Fermin C, Chen Y. (2002). Rescue of cleft palate in Msx1-deficient mice by transgenic Bmp4 reveals a network of BMP and Shh signaling in the regulation of mammalian palatogenesis. *Development* 129(17) : 4135-46.

Zhao G, Monier-Faugere MC, Langub MC, Geng Z, Nakayama T, Pike JW, Chernausk SD, Rosen CJ, Donahue LR, Malluche HH, Fagin JA, Clemens TL. (2000). Targeted overexpression of insulin-like growth factor I to osteoblasts of transgenic mice : increased trabecular bone volume without increased osteoblast proliferation. *Endocrinology* 141(7) : 2674-82.

Melle NADRA (Rim) - Effets des glucocorticoïdes sur la mise en place des centres d'ossification chez l'embryon de rat. Implication de certains gènes du développement. / Rim NADRA. - 2004. - 100 f. ; 17 Figs. ; 3 Tab. ; 30 cm.

Diplôme de Doctorat : Biologie Orale et Ostéoarticulaire . Biomatériaux et Biofonctionnalité Paris 7. 2004.

Chez le fœtus de rat, en fin de gestation, le taux de glucocorticoïdes (GC) fœtal présente un pic de sécrétion entre le 16ème et le 20ème jour de la vie embryonnaire, phénomène concomitant à l'apparition des centres d'ossification du 17ème au 19ème jour de gestation pour le calvaria et pour le septum nasal, respectivement. Dans le cartilage, les GC modulent l'effet des facteurs insulino-mimétiques (IGF-I et -II) par des mécanismes complexes et mal définis, auxquels nous nous sommes intéressés. Nos résultats montrent que les GC, en concentrations physiologiques, peuvent induire la biominéralisation des matrices extracellulaires des chondrocytes de septum nasal et des ostéoblastes du calvaria de fœtus du rat en culture primaire (augmentation de la phosphatase alcaline, du dépôt minéral, des GAG et du Co I). Dans le septum nasal, cette induction est liée à une régulation différentielle des IGFBP et de leurs fragments de dégradation. Les mécanismes moléculaires gouvernant la différenciation des structures craniofaciales par les GC, en particulier, la régulation des homéogènes de la famille Msx et Dlx par cette hormone, sont peu connus. Une partie de notre travail a donc consisté à décrypter l'effet des GC sur l'expression des gènes Msx-2, Dlx-5 et Runx-2 au cours de la minéralisation de calvaria de fœtus du rat. Nos résultats indiquent que les GC induisent, in vitro et in vivo, dans le calvaria de fœtus de rat, l'expression des homéogènes Msx-2, Dlx5 et du gène maître Runx-2, nécessaires à l'induction d'un marqueur fonctionnel de la biominéralisation, l'ostéocalcine. Dans notre laboratoire, l'implication du gène Msx-1 lors de l'amélogénèse et de la dentinogénèse ainsi que la présence d'un ARN antisens naturel de ce gène ont été montrées chez la souris. Nous avons mis en évidence un homologue de cet ARN AS chez le rat. Nos résultats montrent que ce dernier est exprimé au cours de la biominéralisation du calvaria de fœtus de rat, et permettront d'une part de poursuivre l'étude du rôle de cet ARN AS dans des modèles in vitro et in vivo, et d'autre part, d'aborder les mécanismes d'action de cet ARN AS.

Rubrique de classement : BIOLOGIE MOLECULAIRE - BIOCHIMIE

Mots-clés français : Glucocorticoïdes
Minéralisation chondrocytaire
Minéralisation ostéoblastique
Facteur insulino-mimétique (IGF)
Protéine de liaison aux IGF
Msx-2
Dlx-5
Runx-2
ARN antisens du gène Msx1

Mots-clé anglais : Glucocorticoids
Chondrocyte mineralization
Osteoblast mineralization
Insulin-like growth factor
Insulin-like growth factor binding protein

Msx-2
Dlx-5
Runx-2

RNA antisens of Msx1 gene

Adresse de l'auteur : Laboratoire Biologie Orofaciale et Pathologie, INSERM EMI-U
0110-UP7- IFR-58, Institut Biomédical des Cordeliers, Escalier E, 2ème étage, 15-21 rue
de l'Ecole de Médecine - 75006 PARIS.