



**HAL**  
open science

# La sialoprotéine osseuse dans le développement osseux, l'ostéogenèse et l'angiogenèse : régulations croisées avec l'ostéopontine

Wafa Bouleftour

## ► To cite this version:

Wafa Bouleftour. La sialoprotéine osseuse dans le développement osseux, l'ostéogenèse et l'angiogenèse : régulations croisées avec l'ostéopontine. Médecine humaine et pathologie. Université Jean Monnet - Saint-Etienne, 2013. Français. NNT : 2013STET017T . tel-01077892

**HAL Id: tel-01077892**

**<https://theses.hal.science/tel-01077892>**

Submitted on 27 Oct 2014

**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.

# THESE DE DOCTORAT

Spécialité « Sciences de la Vie »

Présentée par

Wafa BOULEFTOUR

Pour l'obtention du Diplôme de Doctorat de

**L'Université Jean Monnet**

**- Saint Etienne -**

**La Sialoprotéine osseuse dans le  
développement osseux, l'ostéogenèse, et  
l'angiogenèse - Régulations croisées avec  
l'Ostéopontine**

Soutenue le 16 Décembre 2013

**Membres du jury :**

**Dr Akeila Bellahcène - Rapporteur**

**Dr Céline Colnot - Rapporteur**

**Dr Edith Bonnelye - Examineur**

**Dr Laurence Vico - Examineur**

**Dr Luc Malaval - Directeur de Thèse**

## Remerciements

Tout commença au milieu des gloussements des poulettes, qui m'ont subtilement glissé une idée dans la tête. Écoutant le conseil de mes copines « Qui naît poule aime gratter », yallah j'ai pris mes bagages pour partir à l'aventure. Il est vrai qu'après six années passées dans mes élevages, le retour à la fac me donna la chair de poule.

Ainsi, je me retrouvai sur les bancs d'écoles cherchant un stage en recherche, et quelle fût belle la rencontre avec mesdames et monsieur **Georges Boivin**, **Delphine Farlay**, **Hélène Follet** et toute leur sympathique équipe, que je remercie énormément, qui m'ont envoûté avec un « pit » de résorption en forme de cœur. Qui dit résorption dit ostéoclastes, je remercie **Dr Edith Bonnelye** de m'avoir transmis les secrets de la culture de ces cellules « trop classe », et d'avoir accepté d'être examinateur de ce travail. De là, le diagnostic était posé, j'étais contaminée, passionnée, mon nouveau dada c'était le tissu osseux. Ainsi l'année suivante je me suis aventurée dans l'Hôpital Edouard Herriot, dans une thématique passionnante : « La polyarthrite Rhumatoïde », où j'ai pu rencontrer messieurs **Pierre Miossec**, **Hubert Marotte**, **Arnaud Hot**, sans oublier l'équipe Biomérieux que je remercie beaucoup pour leur accueil.

Ensuite, la recherche de la thèse a commencé, pratiquement en train d'astiquer ma porcelaine à Limoges, j'ai choisi encore une fois le tissu osseux en me liant avec une petite protéine, la « BSP ». Chaleureusement accueillie par madame **Laurence Vico**, que je remercie énormément pour sa gentillesse, son aide, et pour avoir accepté d'être examinateur de ce travail. Intégrant ainsi la « BSP Team », sous la direction du boss **Luc Malaval**, qui déteste être appelé de la sorte. **Luc** je te remercie beaucoup d'avoir dirigé cette aventure, d'avoir géré mon stress permanent, d'avoir répondu à mes mels étranges, merci pour toutes les connaissances que tu partages, l'aventure n'est pas encore finie, j'espère que je saurai honorer la confiance que tu m'as accordé. Je n'oublierai pas les autres membres de la « BSP team » : Um grande Obrigado pour **Renata**, **Guénaëlle** une rencontre entre une raie manta et un fennec et bienvenue à **Laura**.

Installée dans la ville des mines et des terrils, rapidement intégrée dans le chaudron stéphanois du tissu osseux, j'ai pu rencontrer des personnes inoubliables. Sans l'aide de tous ceux que je vais citer, je n'aurais pas réalisé le dixième de ce travail : **Marité**: tu es plus qu'une collègue, **Mireille**: j'ai adoré travailler avec toi, **Sylvie**: merci pour tes remontes morales, j'ai pris quelques kilos mais c'était trop bon, **Arnaud** : tu as su me motiver, m'apprendre plein de choses, bonne route à toi. **Norbert** : Merci pour ton encouragement au quotidien, **Marie-Hélène** : merci pour les leçons d'articulation et les répètes à 6 h du mat, c'était vraiment efficace. **Aline** : Tu étais toujours là, quand ça n'allait pas merci. **Alain** : merci pour ta bonne humeur, **Chantal** : merci pour ton aide administrative, **Myriam Normand**, **Céline Dion** oops **Richard**. Je n'oublierai pas le personnel de l'animalerie celle qui n'est plus là ; **Fanny** et celles qui y sont toujours ; **Gislaine** et **Priscilla**. Une mention spéciale pour mes collègues du ptit chaudron 123 A : **Cédric** : je ne saurai comment te remercier, **Bernard** : une grande fan des coiffeurs pour dames, **Marion** : ma pipelette préférée ; et les nouveaux : **Rim**, **Ximena** et **Damien** à qui je souhaite une bonne continuation.

Большое спасибо, pour **Vasily** qui m'a appris mes premières bases en russe, et pour **Guillaume** qui a vraiment assimilé et compris les symptômes de la mutation de la BSP. Je n'oublie pas les personnes qui étaient de passage : **Emilien**, **Malika** et son éternel sourire, **Antoine**, **pierre**, **robin** -le trio infernal-, **Nanci** obrigado pela cactus.

Mes amis de la fac de médecine, **Marine**, **Pauline**, **Binh minh**, **Yann**, **Olivier** et tous les autres, du karaoké au ski, que d'aventures merci!!!!!!!!!!!!

Je tenais à remercier également **Angèle** qui me tenait un peu compagnie les heures tardives au labo. Enfin une mention spéciale pour **Myriam** et **Alex** mes grandes amies outre-Atlantique ; je vous remercie les filles pour votre soutien, encouragement et pour les moments agréables passés à Baltimore. Je n'oublierai pas mon amie, ma collègue, mon ex coloc **Fiona**, pour son amitié tout simplement.

Mes dernières pensées iront à ma famille, ma belle-famille, mes parents pour m'avoir encouragée et permis d'entreprendre ce grand voyage. Sans eux, je n'en serais pas là. Merci **ma Maman** pour ton soutien, ton aide au quotidien, tu m'as laissé m'envoler loin de

toi mais n'oublie jamais que je suis tout près. Un grand merci à **mon Papa**, à mon frère **Yanis** ; je te souhaite plein de bonnes choses.

**Tata Nicole, François** et tous les **Esquis** merci de m'avoir accepté comme je suis vous êtes ma deuxième famille. Mes remerciements ne seraient pas complets sans une pensée pour **ma Grand-mère** à qui je n'ai pas pu dire au revoir ; repose en paix **Nana**. Je terminerai par remercier ma moitié ; **Daniel** sans toi je n'aurai jamais tenu le coup, tu as su être présent dans mes moments de doute, tu as su gérer mon éternel stress, tu es mon pilier, mon âtre, mon petit nid douillet méthodiquement déchiqueté.

Ainsi s'achève mon petit périple, le grand jour approche à grands pas, je remercie le Dr **Akeila Bellahcène** et le Dr **Celine Colnot** d'avoir révisé mon travail.

A mes parents

A Nassim Ali

## RESUME

Le bon fonctionnement de l'organe osseux dépend de l'activité intégrée de trois tissus majeurs: le tissu osseux au sens strict, la moelle osseuse et les vaisseaux sanguins. Les facteurs qui coordonnent la mise en place concomitante de l'angiogenèse et de l'ostéogenèse nécessaires à la formation de l'os primaire, c'est-à-dire au développement embryonnaire du squelette ou à la formation des cals de réparation fracturaire, sont encore largement inconnus. Les cellules de l'os et les vaisseaux communiquent en particulier grâce à des molécules d'adhésion telles que les intégrines, qui lient des composantes de la matrice extracellulaire. Parmi ces dernières, les "Small Integrin Binding Ligand N-Linked Glycoproteins" ou SIBLING, constituent un groupe de protéines matricellulaires très fortement impliquées dans la formation et la minéralisation osseuse, et qui inclut la Sialoprotéine Osseuse (BSP) et l'Ostéopontine (OPN), une protéine fortement angiogénique et qui est un puissant inhibiteur de la minéralisation. BSP et OPN sont coexprimées par les ostéoblastes et les ostéoclastes, et nous avons tenté d'analyser dans ce travail les synergies et les régulations croisées entre ces deux facteurs et leur impact sur la biologie osseuse.

Notre laboratoire a déjà bien caractérisé le phénotype de souris présentant une extinction génique de la BSP (BSP<sup>-/-</sup>). Celles-ci ont un squelette hypominéralisé, et sont dès la naissance plus petites que les souris sauvages, avec des os longs plus courts à l'âge adulte. L'analyse de leur développement s'est trouvée compliquée par un trouble comportemental des femelles BSP<sup>-/-</sup>, qui ne forment pas de nid après la mise bas. Afin d'établir si le retard de croissance des souris BSP<sup>-/-</sup> résulte du comportement des mères mutantes, nous avons d'abord réalisé des séries de croisements entre souris <sup>-/-</sup>, <sup>+/+</sup> et <sup>+/-</sup> qui ont établi que le phénotype osseux des souris déficientes en BSP est d'origine purement génétique. L'analyse des souris dans les jours suivant la naissance a montré une altération de la plaque de croissance. Les souriceaux BSP<sup>-/-</sup> montrent aussi un taux circulant d'OPN plus élevé, qui pourrait expliquer l'hypominéralisation observé chez les souris BSP<sup>-/-</sup>, et qui suggère une compensation de l'absence de la BSP par l'OPN

Pour tester cette hypothèse, nous avons développé un modèle d'injection de PTH 1-84 sur la moitié droite de l'os pariétal. La PTH induit localement une forte augmentation des paramètres histologiques, microtomographiques et moléculaires de formation osseuse dans les deux génotypes, et en particulier une expression accrue de l'OPN. L'injection *in vivo* de siARN antisens bloquant l'expression d'OPN ne change pas l'effet anabolique de la PTH chez les souris sauvages. Au contraire, la PTH n'a plus d'effet anabolique sur les calvaria de souris BSP<sup>-/-</sup> lorsqu'elle est co-injectée avec le siARN bloquant l'OPN. Ces résultats suggèrent que l'OPN pourrait remplacer la BSP dans certaines de ses fonctions, et que l'absence ou la réduction simultanée de ces deux SIBLING bloque la réponse osseuse à la PTH. Sachant que l'OPN est surexprimée en l'absence de BSP et qu'elle est fortement angiogénique, nous avons utilisé un modèle d'ablation médullaire, qui permet d'analyser sur un temps très court la revascularisation et la recolonisation hématopoïétique du conduit osseux. Trois jours après l'ablation (J3), l'os des souris BSP<sup>-/-</sup> présentait une densité vasculaire considérablement plus élevée que les BSP<sup>+/+</sup>, qui n'était rejointe chez ces derniers qu'à J8. La recolonisation hématopoïétique était également plus rapide chez les mutants. La qRT-PCR a montré en particulier une expression plus élevée d'OPN et de VEGF-A dans les os ablatés de souris BSP<sup>-/-</sup>, suggérant l'intervention de l'un ou de ces deux facteurs dans la stimulation de l'angiogenèse.

En conclusion, la BSP est un facteur clé dans le développement osseux, dont l'absence affecte l'interaction entre l'ostéogenèse, l'angiogenèse et l'hématopoïèse. L'effet anabolique de la PTH nécessite, au moins dans le modèle d'injection sur les calvaria, la coexpression de l'OPN et la BSP. Ces résultats suggèrent que l'OPN compense fonctionnellement l'absence de BSP en réponse à ce défi hormonal. Un tel effet de « vicariance » contribue au phénotype des souris BSP<sup>-/-</sup>, et nos travaux constituent donc un début d'analyse des interactions fonctionnelles existant entre ces deux protéines.

## ABSTRACT

The bone organ integrates the activity of bone tissue, bone marrow and blood vessels and the factors ensuring this coordination remain still undefined. The SIBLING (Small Integrin Binding Ligand N-Linked Glycoproteins) family is involved in bone formation, hematopoiesis and angiogenesis, and it includes bone sialoprotein (BSP), and osteopontin (OPN), which is a highly angiogenic protein and a potent inhibitor of mineralization. These two factors are coexpressed by osteoblasts and osteoclasts. In this work, we analyzed the synergies and cross regulation between these two factors and their impact on bone biology.

Our laboratory has already characterized the phenotype of mice with a gene silencing of BSP (BSP<sup>-/-</sup>). These mice have a hypomineralised skeleton, and are therefore smaller than wildtype, presenting shorter long bone in adulthood. The analysis of their development has been complicated by a behavioral disorder of female BSP<sup>-/-</sup>, which do not form a nest after parturition.

To determine whether the stunted growth of mouse BSP<sup>-/-</sup> results from the behavior of mutant mothers, we first performed a series of crossfoster breedings, which established that the bone phenotype of BSP<sup>-/-</sup> is of purely genetic origin. After birth, BSP<sup>-/-</sup> pups showed an altered growth plate, and a higher circulating level of OPN, which could explain the hypomineralization observed in BSP<sup>-/-</sup> mice, and suggests a compensation of the lack of BSP by OPN.

To test the latter hypothesis, we developed a model of intermittent injection of hPTH1-84 over the periosteum of the right mouse hemicalvaria. PTH induced a local increase of histological, microtomographic and molecular bone formation parameters in both genotypes, in particular a higher OPN expression. Inhibition of this protein by *in vivo* injection of antisense siRNA did not change the anabolic effect of PTH in wild mice. In contrast, PTH had no anabolic effect on the calvaria of BSP<sup>-/-</sup> mice when it was co-injected with the siRNA blocking OPN. These results suggest that OPN could replace BSP in some of its functions, and that the simultaneous absence or reduction of both SIBLING blocks the bone response to PTH.

Knowing that OPN is overexpressed in the absence of BSP and is highly angiogenic, we used a model of bone marrow ablation to analyze the revascularization and hematopoietic recolonization of bone shaft. Three days after ablation (d3), BSP<sup>-/-</sup> femurs showed higher vessel density than BSP<sup>+/+</sup> mice, which reached BSP<sup>-/-</sup> values only by d8. Hematopoietic recolonization was also faster in the mutants. QRT-PCR showed particularly higher expression of both OPN and VEGF-A in ablated BSP<sup>-/-</sup> mice, suggesting the involvement of one or both of these factors in the stimulation of angiogenesis.

In conclusion, BSP is a key factor in bone development; its absence affects the interplay between osteogenesis, angiogenesis and hematopoiesis. The anabolic effect of PTH requires, at least in the ectopic calvaria injection model, the coexpression of OPN and BSP. These results suggest that OPN functionally compensates the absence of BSP in response to an hormonal challenge. This compensation effect largely contributes to the phenotype of BSP<sup>-/-</sup> mice, and our work is but the beginning of the analysis of the functional interactions between these two proteins.

# Table des matières

Liste des abréviations .....	14
Liste des figures et des tableaux.....	16
Introduction .....	18
<b>Revue bibliographique : De l'os au vaisseau sanguin (Rôle des SIBLING)</b> .....	19
A. Eléments de biologie du tissu osseux : développement, matrice extracellulaire.....	20
A.1. Développement du tissu osseux ou modelage osseux .....	21
A.1.1. Ossification endochondrale : .....	22
A.1.1.1. Mécanismes généraux : .....	22
A.1.1.2. Les effets de l'IGF-1 sur l'ossification endochondrale : .....	24
A.1.2. Mécanismes généraux de l'ossification membranaire : .....	25
A.2. Le remodelage osseux .....	27
A.3. Des composants cruciaux de la matrice osseuse, les SIBLING : .....	27
A.3.1. Composition générale des matrices extracellulaires osseuses : .....	28
A.3.2. Les Small Integrin Binding Ligand N-Linked Glycoproteins : .....	28
A.3.2.1. Structure et origine évolutive : .....	28
A.3.2.2. La Dentin Matrix Protein-1 (DMP1) : .....	31
A.3.2.3. La Dentin SialoPhosphoProtein (DSPP) : .....	32
A.3.2.4. La Matrix Extracellular PhosphoglycoprotEin (MEPE) : .....	33
A.3.3. L'ostéopontine (OPN) : .....	34
A.3.3.1. Présentation générale : .....	34
A.3.3.2. Rôle de l'OPN dans l'os : .....	36
A.3.4. La SialoProtéine Osseuse (BSP) : .....	38
A.3.4.1. Présentation générale : .....	38
A.3.4.2. Rôle de la BSP : .....	39
A.4. Vascularisation du tissu osseux .....	44
A.4.1. Mécanisme de la vascularisation durant l'ossification endochondrale : .....	44
A.4.2. Vascularisation des os long : .....	46

A.4.2.1. Anatomie de la circulation intraosseuse: .....	46
A.4.2.2. Vascularisation et croissance osseuse : .....	47
A.4.3. L'angiogenèse - définition et mécanisme - : .....	50
A.4.3.1. Les étapes de l'angiogenèse : .....	50
A.4.3.1.1. Activation endothéliale, vasodilatation et perméabilité endothéliale:.....	50
A.4.3.1.2. Dégradation de la matrice extracellulaire : .....	50
A.4.3.1.3. Prolifération et Migration des cellules endothéliales : .....	51
A.4.3.1.4. Formation de la lumière vasculaire et des tubules et maturation des néovaisseaux : .....	51
A.4.3.2. Rôle des SIBLING dans la vascularisation : .....	54
A.4.3.2.1. DMP1 : .....	54
A.4.3.2.2. MEPE : .....	55
A.4.3.2.3. DSPP : .....	55
A.4.3.2.4. OPN : .....	56
A.4.3.2.5. BSP : .....	57
B. L'hormone parathyroïdienne (PTH) : action sur la physiologie osseuse .....	59
B.1. Régulation de l'homéostasie osseuse : .....	59
B.1.1. La PTH et la régulation de l'homéostasie calcique : .....	59
B.1.2. La PTH et la régulation de l'homéostasie du phosphate : .....	61
B.2. Régulation du métabolisme osseux par la PTH : .....	63
B.3. Action de la PTH sur les différentes SIBLING : .....	68
B.3.1. Sur MEPE et DMP1 : .....	68
B.3.2. Sur la DSPP : .....	69
B.3.3. Sur l'OPN : .....	69
B.3.4. Sur la BSP : .....	71
<b>Objectifs de l'étude</b> .....	74
<b>Travaux Réalisés</b> .....	78
(1) Développement squelettique post-natal et croissance des souris déficientes en sialoprotéine osseuse (BSP) (Manuscrit soumis à PlosOne).....	79

Introduction: .....	80
Matériels et méthodes: .....	80
Résultats : .....	82
Discussion: .....	86
(2) L'expression de la Sialoprotéine osseuse et de l'Ostéopontine est nécessaire à l'action anabolique de la PTH sur l'os pariétal (Manuscrit en préparation) .....	88
Introduction : .....	89
Extinction of both bone sialoprotein (BSP) and osteopontin (OPN) expression impairs the anabolic action of PTH in mouse calvaria bone.....	90
Résultats et discussion complémentaire : .....	113
(3) La revascularisation du conduit osseux après ablation médullaire est dramatiquement accélérée chez les souris BSP <sup>-/-</sup> , et s'accompagne d'une recolonisation hématopoïétique plus rapide. ....	116
Introduction : .....	117
Matériels et méthodes: .....	119
Résultats : .....	122
Discussion : .....	130
<b>Discussion générale et perspectives</b> .....	133
BSP et comportement maternel : .....	134
Vicariance entre la BSP et l'OPN : .....	135
BSP et angiogenèse : .....	136
<b>Bibliographie</b> .....	138
Annexe 1: Publications et communications personnelles .....	161
Annexe 2: Curriculum Vitae .....	164
Annexe 3: Manuscrit de l'article:"Skeletal development of mice lacking bone sialoprotein (BSP) - Impairment of long bone growth and progressive establishment of high trabecular bone mass" (soumis à PlosOne) .....	167

# Liste des abréviations

## A

**ACE**: Angiotensin-Converting Enzyme  
**AMPc**: Adénosine monophosphate cyclique  
**Ang-1 / Ang-2**: Angiopoïétines 1 ou 2  
**ASARM**: Acidic serine and aspartate-rich motif

## B

**BAD**: BCL2-antagonist of cell death  
**Bcl-2**: B-cell lymphoma 2  
**Bcl-xL**: B-cell lymphoma-extra large  
**BFR**: Bone Formation Rate  
**BMP1**: Bone Morphogenic Protein1  
**BSP**: Bone SialoProtein

## C

**Ca**: Calcium  
**CaSR**: Calcium Sensing Receptor  
**CHM-I**: Chondromoduline-I  
**Col1 $\alpha$ 1**: Collagène type 1 alpha 1  
**CSH**: Cellule souche hématopoïétique

## D

**DGP**: Dentin glycoprotein  
**DMP1**: Dentin Matrix Protein-1  
**DPP**: Dentin phosphoprotein  
**DPSC**: Cellules souches de la pulpe dentaire  
**DSP**: Dentin Sialoprotein  
**DSPP**: Dentin SialoPhosphoProtein

## E

**E2**: Oestrogènes  
**ECF**: Fluide ExtraCellulaire  
**EDF-1**: Endothelial Differentiation related Factor-1  
**EDG-1**: Endothelial Differentiation Gene-1  
**EGF**: Epidermal Growth Factor  
**Egr-1**: Early growth response protein-1  
**ERK**: Extracellular signal-regulated kinases

## F

**FGF2**: Fibroblast Growth Factor  
**FGF23**: Fibroblast Growth Factor 23  
**FTIRM**: Fourier Transform Infrared Microscopic Analysis

## G

**GH**: Growth Hormone

## H

**HA**: Hydroxyapatite  
**Hchiamp**: chondrocyte inhibitor of Angiogenesis and m metalloproteinase activity  
**Hyp**: Primary defects in X-linked Hypophosphatemic rickets

## I

**IGF-1**: Insulin Growth Factor  
**IGF-2**: Insulin Growth Factor 2  
**IGFR1**: Récepteur de l'IGF-1  
**Ihh**: Indian hedgehog homolog  
**IL-11**: Interleukine 11

## L

**LPS**: Lipopolysaccharides  
**LRP5/6**: LDL-receptor-related protein 5/6

## M

**MAPK**: Mitogen-Activated Protein Kinases  
**MAR**: Mineral Apposition Rate  
**MEC**: La matrice extracellulaire  
**MEF2**: Myocyte Enhancer Factor 2  
**MEPE**: Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein  
**Mg**: Magnésium  
**MGP**: Protéine Gla matricielle  
**MMP13**: métalloprotéinase matricielle 13  
**MMP2**: métalloprotéinase matricielle 2  
**MMP20**: métalloprotéinase matricielle 20

**MMP9**: métalloprotéinase matricielle 9  
**Mn**: Manganèse

## N

**NFATC-2**: Nuclear Factor of activated T-cells cytoplasmic 2  
**NF- $\kappa$ B**: nuclear factor-kappa B  
N-Linked Glycoproteins  
**NO**: Monoxyde d'azote

## O

**OCN**: Ostéocalcine  
**OPG**: Osteoprotegerin  
**OPN**: Osteopontin  
**OSX**: Osterix

## P

**PAL**: Phosphatase Alkaline  
**PCN**: protéines non collagéniques  
**PDGF**: Platelet-Derived-Growth-Factor  
**PECAM**: Patelet Endothelial Cell  
**PGE2**: Prostaglandines 2 Adhesion Molecule  
**PHEX**: Phosphate-regulating gene with homology to endopeptidases on X-chromosome  
**Pit-1**: pituitary-specific transcription factor 1  
**PI3K**: Phosphatidylinositol 3-kinase  
**PTH**: Parathormone  
**PTHr1**: parathyroid hormone 1 receptor  
**PTHrP**: Parathyroid-hormone-related peptide

## R

**RANK**: Receptor Activator of Nuclear Factor  $\kappa$  B  
**RANKL**: Receptor Activating NF Kappa B Ligand  
**RDG**: Arginine-Glycine-Aspartique  
**ROCK 1/2**: Rho-associated Kinase 1/2  
**Runx2**: Runt-related transcription Factor2

## S

**SCPP**: Secreted Calcium-binding Phosphoproteins  
**SIBLING**: Small Integrin Binding  
**Sfrp1**: Secreted frizzled-related protein 1  
**SPARCL1**: Secreted Protein Acidic Cysteine-Rich Like1  
**SRLP**: Small Leucine Rich Protéoglycanes

## T

**TGF- $\beta$** : Transforming Growth factor beta1  
**Tie**: tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homologydomain  
**TIMP-1/2**: TIMP metallopeptidase inhibitor 1/2  
**TNF- $\alpha$** : Tumor Necrosis Factor- $\alpha$   
**TRAP**: Tartrate Résistante Acide Phosphate

## U

**uPa**: Plasminogène

## V

**VEGF-A**: Vascular Endothelial Growth Factor A

# Liste des figures et des tableaux

FIGURE 1: DEVELOPPEMENT SQUELETTIQUE.....	21
FIGURE 2: STADES DE L'OSSIFICATION ENDOCHONDRALE.....	23
FIGURE 3: A GAUCHE: STRUCTURE DE LA PLAQUE DE CROISSANCE ET STADES SUCCESSIFS DE DIFFERENCIATION DES CHONDROCYTES A DROITE : ROLE DES FACTEURS SYSTEMIQUE (ROUGE), LOCALEMENT SECRETES (BLEU) ET DE TRANSCRIPTION (VERT) IMPLIQUES DANS LA REGULATION DE LA PROLIFERATION ET DE L'HYPERTROPHIE DES CHONDROCYTES AU COURS DE L'OSSIFICATION ENDOCHONDRALE .....	24
FIGURE 4: STADES DE L'OSSIFICATION MEMBRANAIRE.....	25
FIGURE 5: PHYLOGENIE ET DUPLICATION GENIQUE DE SPARC, SPARCL1 ET DES SCPP. EVOLUTION ET LOCALISATION CHROMOSOMIQUE DES GENES DES SIBLING ET SCPP A PARTIR DE LA SPARC/OSTEONECTINE.....	29
FIGURE 6: MISE EN EVIDENCE DES PRINCIPAUX DOMAINES STRUCTURAUX ET DES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DES SIBLING .....	30
FIGURE 7: ROLE DE DMP1 DANS LA MINERALISATION, LA MATURATION DES OSTEOCYTES ET L'HOMEOSTASIE DU PHOSPHATE. ....	31
FIGURE 8: SCHEMA ILLUSTRANT LE MECANISME MOLECULAIRE ET LE ROLE DE PHEX, MEPE ET LE PEPTIDE ASARM DANS LA MINERALISATION. PHEX PROTEGE MEPE DE SON CLIVAGE SPECIFIQUE PAR LA CATHEPSINE B, EMPECHANT AINSI LA LIBERATION DU PEPTIDE ASARM, QUI POSSEDE UN ROLE INHIBITEUR DE LA MINERALISATIONS.....	33
FIGURE 9: SCHEMA ILLUSTRANT LE ROLE DE L'OSTEOPONTINE DANS LE REMODELAGE ET LA BIOMINERALISATION DES TISSUS CALCIFIES .....	36
FIGURE 10 : PHENOTYPE OSSEUX DES SOURIS BSP-/- . (A) MORPHOLOGIE DES SOURIS BSP+/+ ET BSP-/-, (B) IMAGES EN $\mu$ -CT DE FEMURS ENTIERS (C) IMAGERIE EN $\mu$ -CT DE L'OS CORTICAL (D) EVALUATION DU BV/TV DE L'OS TRABECULAIRE.....	41
FIGURE 11: SCHEMA DE LA VOIE DE SIGNALISATION IMPLIQUANT LA BSP DANS L'AUGMENTATION DE LA DIFFERENCIATION OSTEOBLASTIQUE .....	42
FIGURE 12: PROCESSUS DE VASCULARISATION DURANT L'OSSIFICATION ENDOCHONDRALE.....	45
FIGURE 13: SCHEMA DE LA VASCULARISATION D'UN OS LONG. A GAUCHE : LA VASCULARISATION ARTERIELLE. A DROITE : LA VASCULARISATION VEINEUSE.....	46
FIGURE 14 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES EFFETS DE L'ADMINISTRATION D'UN RECEPTEUR SOLUBLE DU VEGF-RECEPTEUR (mFLT [1-3]-IGG) SUR LA DIFFERENCIATION ET LA MATURATION CHONDROCYTAIRE DANS LA PLAQUE DE CROISSANCE .....	47
FIGURE 15 : LES DIX PRINCIPALES ETAPES CELLULAIRES ET MOLECULAIRES DE L'ANGIOGENESE.....	53
FIGURE 16 : ROLE DE LA DMP1 DANS LE BLOCAGE DE LA SIGNALISATION DU VEGF .....	54
FIGURE 17 : ANALYSE DES IMAGES 3D OBTENUES PAR MICROTOMOGRAPHIEE DU RESEAU VASCULAIRE RENAL. AUGMENTATION DU NOMBRE DES PETITS VAISSEAUX SANGUINS DANS LE REIN LORS DE LA SUREXPRESSION DE MEPE .....	55
FIGURE 18 : EFFET DE L'ABSENCE DE L'OSTEOPONTINE SUR LA VASCULARISATION.....	56
FIGURE 19 : SCHEMA ILLUSTRANT L'HOMEOSTASIE CALCIQUE.....	60
FIGURE 20 : REGULATION DE L'HOMEOSTASIE DU PHOSPHATE.....	62
FIGURE 21 : SCHEMA ILLUSTRANT L'HYPOTHESE D'INTERACTION DMP1 ET PHEX DANS LA REGULATION DE FGF23 ET LA MINERALISATION OSSEUSE .....	63
FIGURE 22: MECANISMES DE LA STIMULATION DE LA SURVIE OSTEOBLASTIQUE PAR LA PTH .....	64
FIGURE 23: SCHEMA REPRESENTATIF DES CIBLES CELLULAIRES POTENTIELLES DE LA PTH POUR OBSERVER UN EFFET ANABOLIQUE .	65
FIGURE 24 : SCHEMA EXPLICATIF DE L'ACTIVATION DES CELLULES BORDANTES SOUS L'ACTION DE LA PTH .....	66
FIGURE 25: A GAUCHE : REGULATIONS DE L'EXPRESSION DE LA SCLEROSTINE OSTEOCYTAIRE PAR LA PTH. A DROITE : SOST INHIBE LA VOIE CANONIQUE DE WNT .....	67

FIGURE 26 : REGULATION PHYSIOLOGIQUE DU PHOSPHATE ET DE LA MINERALISATION OSSEUSE .....	68
FIGURE 27 : IMAGES EN TROIS DIMENSIONS OBTENUES EN MICRO-CT, DE LA PARTIE DISTALE DU FEMUR ET DU CALVARIUM .....	70
FIGURE 28 : VOIES DE SIGNALISATION DE L'EXPRESSION DE LA BSP DANS LES OSTEOBLASTES.....	71
FIGURE 29 : DEVELOPPEMENT DES SOURIS BSP-/- .....	83
FIGURE 30 : L'IMPACT DE L'ABSENCE DE BSP SUR LE COMPORTEMENT MATERNEL .....	84
FIGURE 31 : DOSAGE ELISA (A) DE LA CONCENTRATION DE L'IGF-1 CIRCULANT DANS LE SERUM DE NOUVEAUX-NES DE 6 J. (B) DE L'OPN DANS LE SERUM DE NOUVEAUX NES DE 6 J ET DES SOURIS DE 12 MOIS.....	85
FIGURE 32 : EXPRESSION EN ARNm DU RECEPTEUR A LA PTH CHEZ LES SOURIS DEFICIENTES EN BSP .....	113
FIGURE 33 : IMPACT DE L'EXTINCTION DE L'OPN SUR L'EFFET ANGIOGENIQUE DE LA IPTH .....	114
FIGURE 34 : SCHEMA DE LA PROCEDURE D'ABLATION MEDULLAIRE ET DE SON RESULTAT .....	117
FIGURE 35 : LA REVASCULARISATION ET LA RECOLONISATION DE LA MOELLE ABLATEE SONT BEAUCOUP PLUS RAPIDES EN L'ABSENCE DE BSP. (A) QUANTIFICATION DU VOLUME OSSEUX AU NIVEAU DE LA ZONE ABLATEE AUGMENTATION DE L'EXPRESSION EN ARNm DES FACTEURS ANGIOGENIQUES EN ABSENCE DE BSP, 3 JOURS APRES ABLATION .....	123
FIGURE 36 : AUGMENTATION DE L'EXPRESSION EN ARNm DES FACTEURS ANGIOGENIQUES EN ABSENCE DE BSP, 3 JOURS APRES ABLATION .....	125
FIGURE 37 : LA DENSITE VASCULAIRE OSSEUSE EST AUGMENTEE CHEZ LES SOURIS BSP-/- .....	127
FIGURE 38 : AUGMENTATION DE L'EXPRESSION EN ARNm DES FACTEURS ANGIOGENIQUES EN L'ABSENCE DE BSP .....	129
FIGURE 39 : MESURE DE LA CONCENTRATION EN Pg/ $\mu$ L DU VEGF-A DANS LES LYSATS DE MOELLE OSSEUSE 3 JOURS APRES ABLATION EN ABSENCE DE BSP.....	132
TABLEAU 1 : LISTE DES FACTEURS ANGIOGENIQUES ET ANTI-ANGIOGENIQUES EXPRIMES PAR LES CHONDROCYTES DANS LA PLAQUE DE CROISSANCE.....	49
TABLEAU 2 : PHENOTYPE OSSEUX DANS LES MODELES MURINS D'EXTINCTION OU DE SUREXPRESSION DES SIBLING.....	75
TABLEAU 3 : LISTE ET SEQUENCES DES AMORCES UTILISEES ( <b>TRAVAUX REALISES (3) ABLATION MEDULLAIRE</b> ).....	121

# Introduction

De nombreuses études mettent en avant la participation active des protéines de la famille des SIBLING (*Small Integrin Binding N-Linked Glycoproteins*) dans le modelage et remodelage osseux et vasculaire. Cette famille regroupe l'OPN (*Osteopontin*), la BSP (*Bone SialoProtein*), la DSPP (*Dentin SialoPhosphoProtein*), la DMP1 (*Dentin Matrix Protein-1*) et MEPE (*Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein*). Ces différentes protéines partagent de nombreuses caractéristiques biochimiques, structurales et génétiques communes. Cependant, l'étude des extinctions géniques de ces protéines montre des phénotypes distincts, qui suggèrent l'existence de spécificités fonctionnelles quant à leur action sur le développement, le remodelage, la minéralisation osseuse et l'angiogenèse.

Dans le présent travail, nous avons analysé l'expression phénotypique des effets de l'absence de la protéine BSP, en nous intéressant en particulier au rôle joué par une autre protéine SIBLING, l'OPN. Ces investigations ont commencé par l'analyse du développement des souris BSP<sup>-/-</sup>, puis se sont poursuivies dans un modèle d'ostéogenèse ectopique sous injection d'hormone parathyroïdienne, puis enfin dans un modèle de modelage osseux rapide après ablation médullaire dans un os long.

L'ensemble de nos résultats établit l'existence de redondances, de mécanismes compensatoires et d'actions croisées entre la BSP et l'OPN, et confirme le rôle important joué par ces deux protéines dans le développement, le modelage et le remodelage osseux.

La revue bibliographique qui suit détaillera les composants de la matrice osseuse en soulignant le rôle des SIBLING, et plus spécifiquement la BSP et l'OPN, notamment dans la minéralisation de cette matrice, le remodelage et le développement osseux. Par la suite nous mettrons en avant le rôle des SIBLING dans l'angiogenèse, et enfin nous traiterons du rôle de la PTH dans l'homéostasie osseuse et de ses principaux effets sur les différentes SIBLING. Les résultats de nos travaux seront exposés sous forme de deux manuscrits (un soumis à la publication, et l'autre en cours de préparation), accompagnés des résultats, encore incomplets, des expériences d'ablation médullaire.

# Revue bibliographique :

**De l'os au vaisseau sanguin**

**(Rôle des SIBLING)**

## **A. Éléments de biologie du tissu osseux : développement, matrice extracellulaire**

Le tissu osseux est cet intrigant et complexe tissu conjonctif, qui possède des caractéristiques bien spécifiques :

C'est l'unique organe dans le corps humain qui contient des cellules, les ostéoclastes, dont la fonction majeure est de détruire ou résorber leur propre tissu. Cette réaction pseudo-auto-immune de résorption osseuse est nécessaire tout au long de la vie des vertébrés. Dans le modelage osseux, elle permet la croissance du squelette durant l'enfance et sa réparation ; dans le remodelage osseux, elle est nécessaire à l'entretien du capital osseux acquis chez l'adulte.

C'est l'un des tissus les plus résistants de l'organisme, capable de supporter d'intenses contraintes mécaniques, donnant au squelette son rôle de soutien du corps et de protection des organes.

C'est un organe qui représente une grande surface d'échanges dans l'organisme, et dans lequel le tissu osseux au sens strict interagit avec de multiples autres types tissulaires et cellulaires. Il renferme ainsi dans son espace médullaire, des cellules souches stromales susceptibles de donner naissance aux fibroblastes, chondrocytes, ostéoblastes et adipocytes, mais aussi des cellules souches hématopoïétiques génératrices des cellules sanguines.

C'est un tissu dynamique, constamment remodelé en particulier sous l'effet des contraintes mécaniques, entraînant la libération ou le stockage de sels minéraux, et assurant (conjointement avec l'intestin et les reins) le contrôle du métabolisme phosphocalcique.

C'est un tissu qui consomme de grandes quantités d'énergie afin d'assurer toutes les fonctions suscitées, ce qui implique que son activité doit être strictement coordonnée avec le métabolisme énergétique global et de fait, de récentes études ont démontré l'implication de l'os dans la régulation du métabolisme du glucose.

C'est un tissu très richement innervé. Des travaux récents montrent que le système nerveux autonome module le remodelage osseux via un ensemble de neurotransmetteurs dont les récepteurs adrénergiques sont exprimés, entre autres, par les ostéoblastes.

C'est bien sûr un tissu sous multiples régulations hormonales, notamment par les hormones stéroïdes sexuelles comme le montre l'existence de l'ostéoporose, pathologie du remodelage qui survient suite à la ménopause. Des études récentes ont démontré que l'os à son tour régulerait la fertilité. Globalement, toutes les fonctions, les régulations et les interactions assurées par le tissu osseux correspondent à la définition d'une "glande endocrine".

### A.1. Développement du tissu osseux ou modelage osseux

Le squelette des vertébrés comprend : le squelette axial, qui englobe le crane, la colonne vertébrale, le sternum et les côtes, et le squelette appendiculaire qui comprend les membres antérieurs et postérieurs. L'origine embryonnaire du tissu osseux est le mésoderme, exception faite pour le squelette craniofacial qui lui est issu en partie du neuro-ectoderme (Figure 1). Deux types d'ossification, membranaire et endochondrale, contribuent au développement squelettique (Horton and Degnin, 2009; Zelzer and Olsen, 2003).

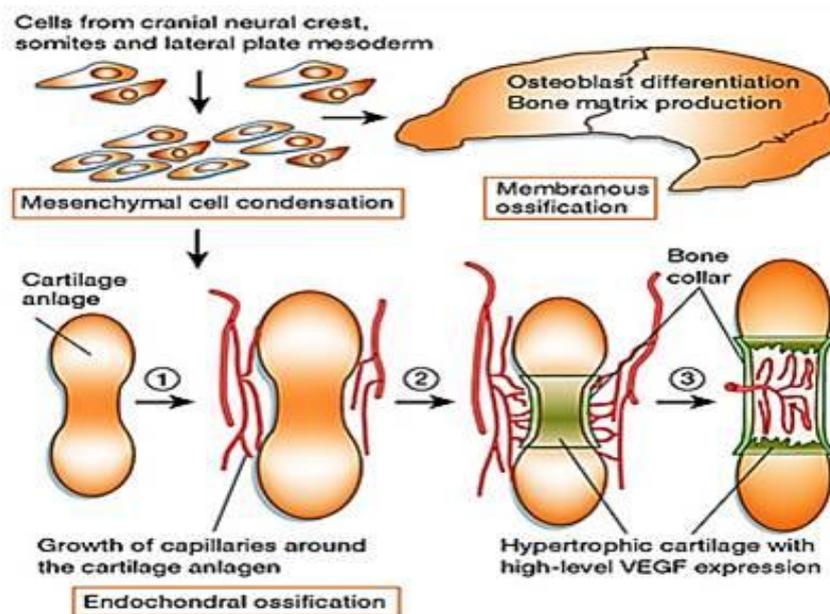


Figure 1 : Développement squelettique. Les cellules des crêtes neurales, les somites et le mésoderme des plaques latérales forment des condensations mésenchymateuses au niveau des sites des futurs os. Dans le cas de l'ossification membranaire, il y a différenciation des cellules mésenchymateuses en ostéoblastes et production de matrice osseuse. Par contre, dans le cas de la différenciation endochondrale, les cellules se différencient en chondrocytes et forment une trame cartilagineuse qui sera ensuite remplacée par de l'os (Zelzer et Olsen., 2003)

Le point de départ de ces deux types d'ossification est la condensation à partir de progéniteurs mésenchymateux. Ceux-ci sont à l'origine de la formation du tissu osseux avec trois origines embryologiques différentes : les crêtes neurales, les somites et les plaques latérales du mésoderme (Day and Yang, 2008 ; Cohen, 2006; Figure 1). Ces progéniteurs communs aux ostéoblastes et chondrocytes sont parfois appelés progéniteurs ostéochondraux (Day and Yang, 2008; Zelzer and Olsen, 2003).

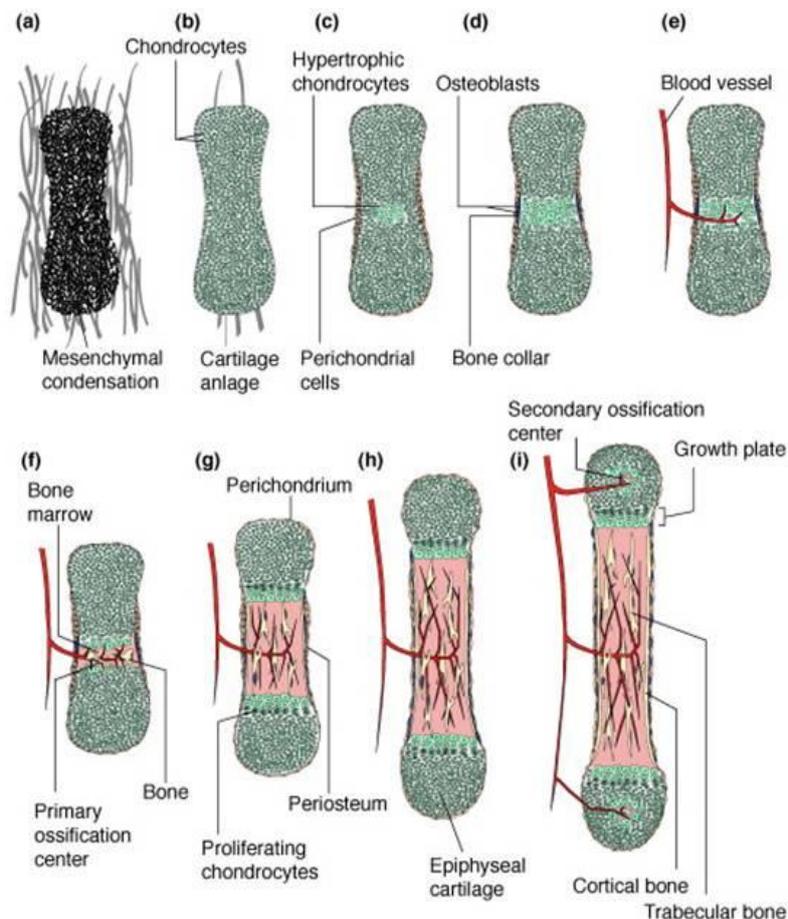
### **A.1.1. Ossification endochondrale :**

#### **A.1.1.1. Mécanismes généraux :**

Le processus d'ossification endochondrale est responsable de la genèse et de la croissance en longueur des os longs, mais aussi des vertèbres et des os de la base du crâne. Il repose sur la formation d'une matrice cartilagineuse qui sera remplacée progressivement pendant le développement fœtal et après la naissance par de l'os. Les matrices cartilagineuses sont issues de la condensation cellulaire des cellules mésenchymateuses (Figure 2a) qui se différencieront ensuite en chondrocytes. Le premier signe de l'ossification endochondrale est l'apparition du gène maître de la différenciation chondrocytaire (Figure 2b) : Sox9, dont l'augmentation semble refléter l'influence décroissante des signaux FGF et Wnt sécrétés à partir de la crête apicale ectodermique et qui maintiendraient les cellules dans un état indifférencié (Ten Berge et al., 2008; Yang, 2009).

Sox9 active des gènes cibles dans des cellules chondrogéniques, ce qui entraîne la sécrétion de protéines de la matrice du cartilage, tels que des collagène de types II, IX et XI, et le protéoglycane aggrécane. Par la suite, les chondrocytes cessent de proliférer et entament des phases de maturation et d'hypertrophie (Kronenberg, 2003). Ce processus implique une diminution de Sox9 et d'autres gènes spécifiques du cartilage, et une augmentation de l'expression de Runx2 induite par Ihh («Indian hedgehog homolog» ; Mariani et al., 2008) et des gènes caractéristiques des phénotypes préhypertrophiques et hypertrophiques des chondrocytes, tels que le collagène de type X, l'OPN, la BSP, la MMP 13 et le VEGF (Figure 2c). Ces modifications de profil d'expression sont accompagnées par un élargissement considérable des cellules et la minéralisation de la matrice entourant les chondrocytes hypertrophiques. (Chung, 2004).

Parallèlement à ces changements, les cellules mésenchymateuses entourant l'ébauche du cartilage se différencient en ostéoblastes formant un collier péri-chondral (Kronenberg, 2003 ; Long et al., 2004). Le VEGF et éventuellement d'autres facteurs angiogéniques sécrétés par



**Figure 2 : Stades de l'ossification endochondrale. (a, b) les cellules au centre de la condensation se différencient en chondrocytes (cartilage hyalin) (c, d) apparition du bone collar dans la partie centrale, où il y a hypertrophie chondrocytaire suivie par une invasion de cellules vasculaires et ostéoblastiques (e) formation des centres d'ossification primaire (f) ; extension du processus vers l'extrémité des os formant éventuellement des plaques de croissance matures (i) formation des centres d'ossification secondaire dans le cartilage des épiphyses (Degnin et Horton.,2009)**

les chondrocytes hypertrophiques dans l'ébauche du cartilage vont induire une angiogenèse à partir du péri-chondre (Figure 2e, (Colnot et al., 2005). Tandis que les chondrocytes les plus différenciés meurent par apoptose, cette invasion vasculaire permet la pénétration d'ostéoclastes, qui vont dégrader la matrice entourant les chondrocytes hypertrophiques laissant des fragments qui servent d'échafaudage pour le dépôt de la matrice osseuse par les ostéoblastes. Les précurseurs des ostéoblastes pénètrent à partir du périoste en suivant les

vaisseaux sanguins (Kronenberg, 2003). La moelle osseuse s'installe dans les espaces entre les travées osseuses. Le résultat final de ces événements est la formation de centres d'ossification primaires (Figure 2f). Les centres d'ossification secondaires se développent au détriment du cartilage épiphysaire (Figure 2i), et sont de même convertis par la suite en tissu osseux à l'exception d'une couche articulaire située aux extrémités. Durant la croissance, les chondrocytes du cartilage sont soumis à l'influence d'une multitude de composants de la matrice extracellulaire, ainsi que des facteurs extracellulaires, notamment des facteurs solubles systémiques et locaux tels que l'IGF-1.

### A.1.1.2. Les effets de l'IGF-1 sur l'ossification

#### endochondrale :

L'IGF-1 est en grande partie responsable de l'effet de la GH («Growth Hormone») sur la croissance du squelette. Une réduction des niveaux de circulation d'IGF-1 chez la souris conduit à une réduction de la croissance longitudinale (Yakar et al., 2002). L'administration de l'IGF-1 compense les effets des mutations invalidantes du récepteur de GH chez la souris et chez l'homme (Sims et al., 2000 ; Guevara-Aguirre et al., 1997). Toutefois, la GH peut également stimuler la croissance longitudinale à travers une action locale sur le cartilage de

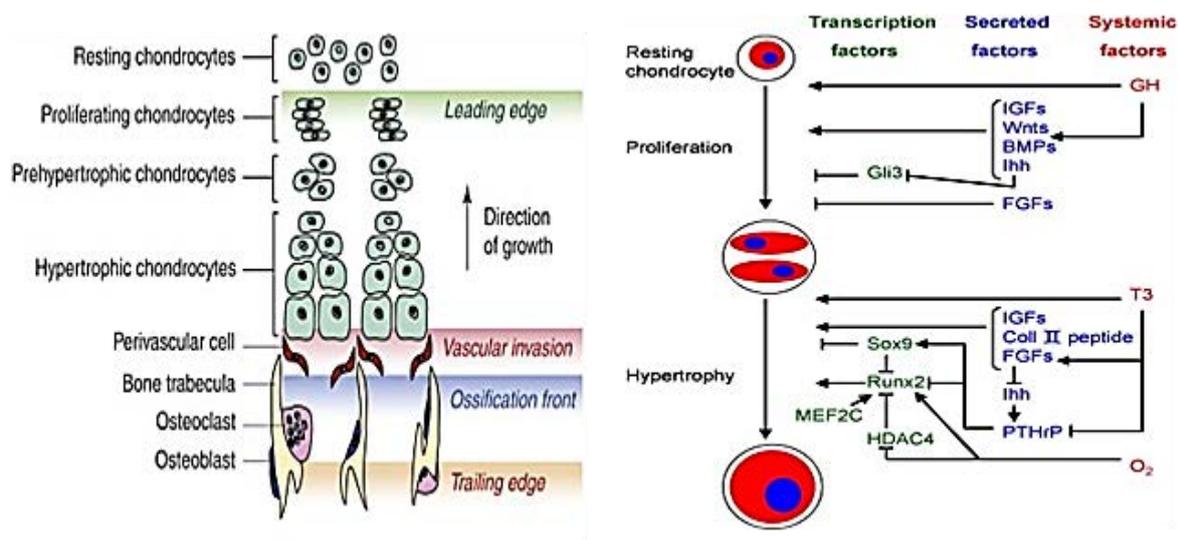


Figure 3 : A gauche: Structure de la plaque de croissance et stades successifs de différenciation des chondrocytes. La plaque de croissance est une structure dynamique avec une zone de prolifération chondrocytaire (vert) et une zone où le cartilage est formé par les chondrocytes prolifératifs et différenciés (marron). Elle est dégradée et envahie par un réseau vasculaire (rouge) et remplacé par un front d'ossification (bleu) (Horton and Degnin, 2009). A droite : Rôle des facteurs systémiques (rouge), localement sécrétés (bleu) et de transcription (vert) impliqués dans la régulation de la prolifération et de l'hypertrophie des chondrocytes au cours de l'ossification endochondrale (Mackie et al., 2008)

croissance qui semble être dépendante de la production locale d'IGF-1, mais peut également être partiellement indépendante (Nilsson et al., 2005). Le principal effet de la GH sur les chondrocytes dans le cartilage de croissance est de stimuler leur prolifération (Hunziker et al., 1994 ; Figure 3).

Les souris knock-out pour l'IGF-1 présentent une réduction de la croissance des os longs. Ce défaut de croissance est dû à la diminution du nombre des chondrocytes hypertrophiques, associé à une expression réduite des transporteurs de glucose, à une diminution de la synthèse du glycogène, et à une réduction des niveaux d'expression d'ARN ribosomal (Wang et al., 1999a). Quant aux souris dépourvues du récepteur de l'IGF-1 (IGFR1), responsable de l'ensemble des effets de l'IGF-1 et la plupart des effets IGF-2 sur la croissance, elles présentent un déficit de croissance plus sévère que les souris KO IGF-1 ou IGF-2, indiquant que les rôles des deux IGFs ne se chevauchent pas complètement (Baker et al., 1993). L'importance de l'IGF-1 dans la régulation des fonctions du cartilage de croissance est illustrée par le fait que la présence d'une variante allélique spécifique du gène de l'IGF-1 est commune à toutes les races de chiens de petites tailles, tandis qu'elle est presque absente chez les grandes races (Sutter et al., 2007).

#### A.1.2. Mécanismes généraux de l'ossification membranaire :

L'ossification membranaire concerne les os plats tels que la calvaria et la partie distale de la clavicule (Cohen, 2006). Elle débute par la condensation des tissus mésenchymateux, où les cellules mésenchymateuses se différencient directement en ostéoblastes, qui déposent une matrice osseuse. La différenciation ostéoblastique est sous le contrôle de la  $\beta$ -caténine, Runx2 et Osx (Hartmann, 2006). En effet la famille des protéines Wnt, notamment Wnt4 et Wnt9a,

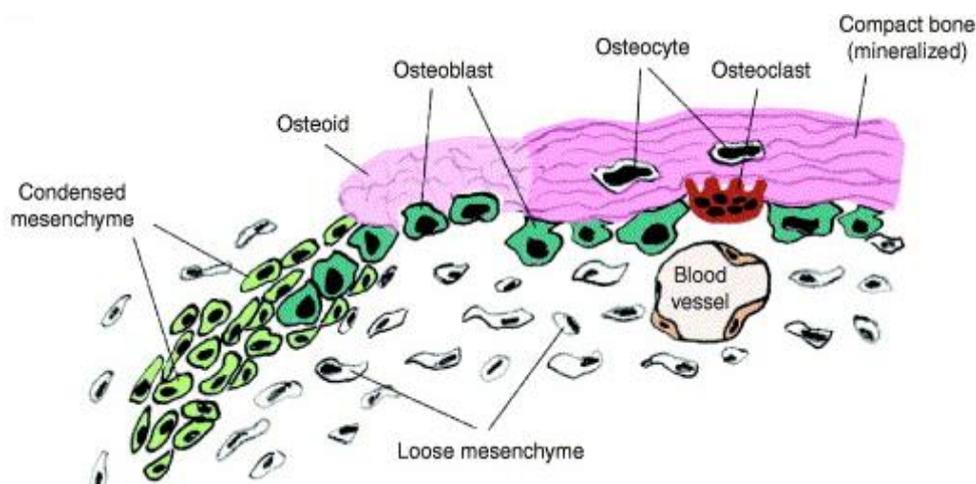


Figure 4 : Stades de l'ossification membranaire (Hartmann, 2006)

influence les cellules mésenchymateuses vers la formation de tissu osseux membranaire, avec une augmentation de l'expression de Runx2 et une diminution de l'expression de Sox9 (Day and Yang, 2008). Le facteur de transcription Osx est indispensable à la différenciation ostéoblastique, les souris déficientes en Osx présentent un arrêt total de la différenciation ostéoblastique, mais aucune anomalie de différenciation ou de maturation chondrocytaire (Zelzer and Olsen, 2003). Ensuite, l'ossification va progresser à partir de centres d'ossification primaires, formant un réseau trabéculaire. Cet os primaire sera ensuite totalement résorbé et remplacé par de l'os lamellaire compact. Le tissu conjonctif qui entoure l'os de membrane se transforme en périoste (Figure 4). L'ossification membranaire est associée avec l'expression de marqueurs ostéogéniques : L'OPN, la BSP, l'OC, le Cola 1a et les BMPs, et certaines cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$  et l'interleukine (IL)-1 $\alpha$ . Le VEGF est présent précocement dans l'os membranaire (Cohen, 2006).

## A.2. Le remodelage osseux

Les deux compartiments du tissu osseux ; l'os compact ou l'os trabéculaire sont en constant renouvellement. Ce processus appelé remodelage, permet au tissu osseux de s'adapter aux contraintes mécaniques, de réparer les dommages structuraux qu'il subit, et de répondre aux demandes internes de l'organisme (Calcium, Phosphate). Un cycle de remodelage dure environ quatre mois chez les adultes, la phase de formation étant plus longue que celle de la résorption. Ce processus comporte cinq phases, il débute par une phase d'initiation caractérisée par une survenue des micro-fractures (micro-cracks) qui induit une rupture du réseau ostéocytaire (Hazenberget al., 2006). Les ostéocytes apoptotiques envoient des signaux aux cellules bordantes, considérées comme candidates potentielles pour former la canopée, qui limitent le processus de remodelage aux zones à remplacer en évitant d'entamer l'os normal.

Suit la phase d'activation, caractérisée par une résorption qui précède la formation. La présence dans cette phase de progéniteurs ostéoblastiques qui expriment RANKL est requise pour la différenciation des précurseurs ostéoclastiques. Ces ostéoblastes peuvent provenir des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse situées à proximité du BRC (Bone Remodeling compartment). La résorption se fait en deux étapes successives, d'abord la dégradation de la fraction minérale par acidification, puis celle de la fraction organique sous l'action d'enzymes protéolytiques lysosomiales. La résorption de la matière organique apparaît sous forme de lacune de Howship. Dès lors l'élimination des résidus de matrice non résorbée est assurée par les cellules d'aspect macrophagique, qui préparent ainsi les lacunes de résorption à accueillir les ostéoblastes. Enfin les ostéoblastes synthétisent une nouvelle matrice non minéralisée (ostéoïde). La minéralisation s'effectue dans un second temps. Le processus de remodelage est soumis à l'influence de facteurs hormonaux notamment les œstrogènes, les androgènes, la vitamine D et la PTH qui stimulent la production de la matrice osseuse.

## A.3. Des composants cruciaux de la matrice osseuse, les

### SIBLING :

La matrice du tissu osseux ne contient presque pas de composant qui lui soit propre. Elle est la combinaison de trois caractéristiques qui lui donne sa spécificité : (A) les particularités de sa composition, (B) le caractère très ordonné de son organisation (du moins dans l'os lamellaire) et (C) sa minéralisation. Au-delà de son organisation structurale et de ses

propriétés mécaniques, la matrice osseuse doit être considérée comme un élément dynamique, qui évolue en permanence et qui est impliqué dans de multiples interactions régulatrices avec les composantes cellulaires du tissu osseux.

### **A.3.1. Composition générale des matrices extracellulaires**

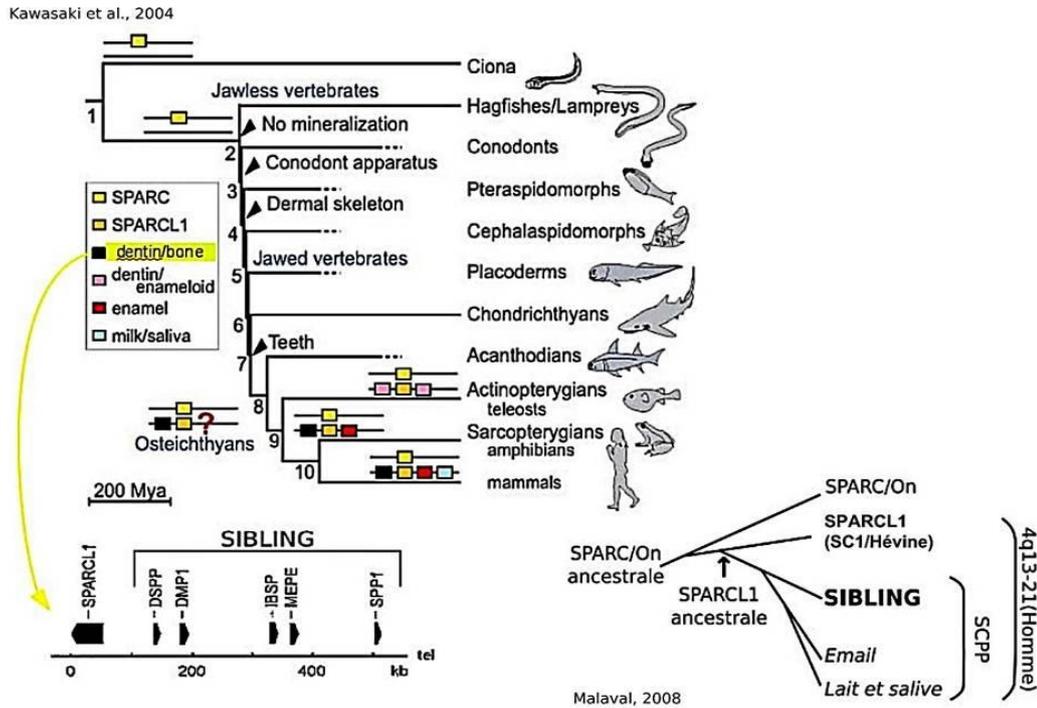
#### **osseuses :**

La matrice extracellulaire (MEC) des tissus minéralisés, notamment l'os et la dentine chez les vertébrés comprend des éléments organiques et des éléments minéraux composés essentiellement des sels de calcium et de phosphates présents sous forme d'hydroxyapatite. La fraction organique est composée principalement de collagène de type I, ce qui correspond à environ 80 - 90% (en poids), de la substance organique dans l'os déminéralisé et la dentine. En plus du collagène, la MEC est également constituée de différentes protéines non collagéniques (PNC), qui jouent un rôle dans l'initiation et la modulation de la minéralisation des fibres de collagènes via la formation et la croissance de cristaux de minéraux (Murshed et al., 2004). La famille des PNC, comprend des Small Leucine Rich Protéoglycanes (SRLP), tels que la chondroïtine-sulfate-riche décorine et des glycoprotéines qui sont souvent phosphorylées et sulfatées comme la BSP et l'OPN (Young et al., 1992 ; Embery et al., 2001). Ces deux protéines appartiennent à la famille des SIBLING.

### **A.3.2. Les Small Integrin Binding Ligand N-Linked Glycoproteins :**

#### **A.3.2.1. Structure et origine évolutive :**

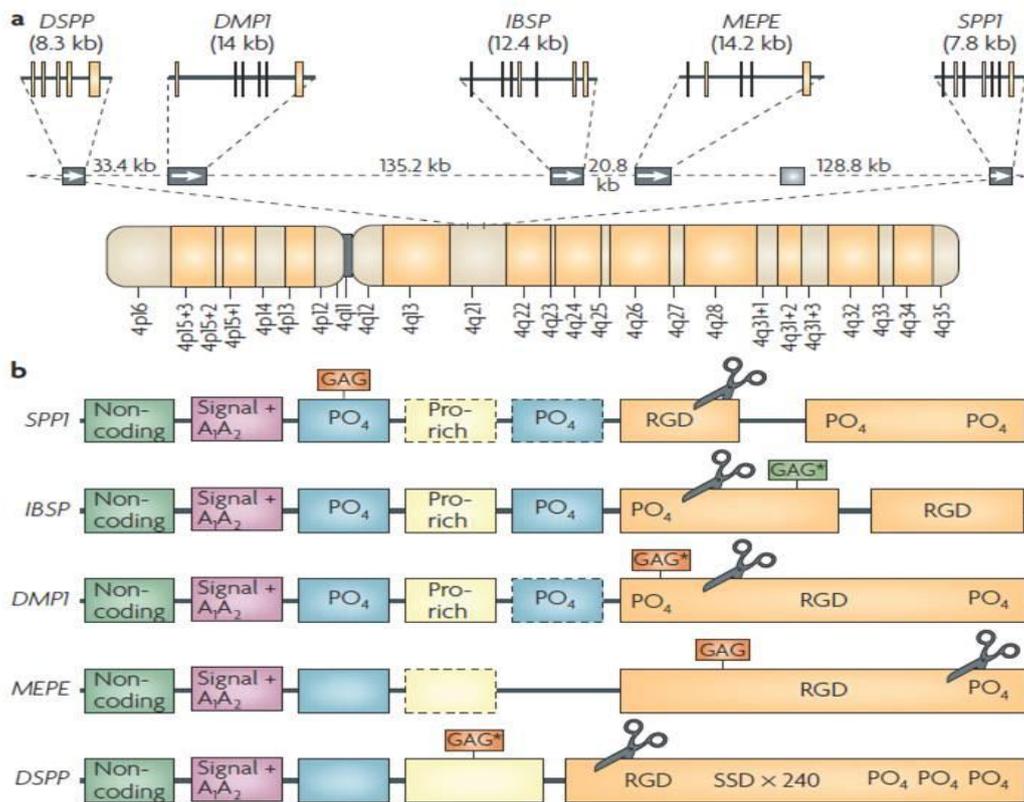
Les SIBLING sont des Phospho-glyco-protéines matricellulaires, faisant partie des protéines non collagéniques de l'os, qui regroupent l'OPN, la BSP, la DSPP, DMP-1, et MEPE. Elles dérivent probablement par de multiples duplications géniques d'un ancêtre unique : la protéine « SPARC-like 1 » (SPARCL1 : « Secreted Protein Acidic Cysteine-Rich Like1 »), ou plus exactement son domain N-terminal très acide, qui aurait donné naissance à l'ensemble de la famille des « Secreted Calcium-binding Phosphoproteins » (SCPP, Kawasaki and Weiss, 2006, Kawasaki et al., 2007), dont les SIBLING font partie, et qui inclut aussi la caséine du lait et des protéines de la salive (Figure 5).



**Figure 5 : Phylogénie et duplication génique de SPARC, SPARCL1 et des SCPP (Kawasaki et al., 2004). Evolution et localisation chromosomique des gènes des SIBLING et SCPP à partir de la SPARC/Ostéonectine (Kawasaki et al., 2004 ; Malaval., 2008, modifié).**

Certaines SCPPs sont riches en Proline et en glutamine déposées par les améloblastes, elles participent à la formation de la surface dentaire. Les SIBLING sont exceptionnellement acides (>25 % Asp, Glu, ou phospho-Ser) ; elles sont secrétées par les ostéoblastes, les ostéocytes et les odontoblastes, et elles participeraient à la minéralisation de l'os et la dentine (Kawasaki, 2011, Fisher et al., 2001).

Cette origine commune explique que les gènes des SIBLING soient juxtaposés dans les génomes de tous les vertébrés sur le chromosome 4 (4q13.21) chez l'homme, et le chromosome 5 chez la souris. Malgré le peu d'homologie dans leurs séquences intrinsèques les 5 SIBLING présentent des structures d'exons similaires, et partagent plusieurs domaines fonctionnels comme des sites de liaison au calcium et un motif RDG (Arg-Gly-Asp), qui sert de médiateur à l'attachement et à la signalisation cellulaire via sa fixation aux intégrines (Fisher et al., 2001). Un autre domaine fonctionnel, appelé ASARM pour (« acidic serine and aspartate-rich motif ») est également très conservé entre les espèces et représente un puissant inhibiteur de la minéralisation (Figure 6).



**Figure 6 : Mise en évidence des principaux domaines structuraux et des modifications post-traductionnelles des SIBLING. (A) Les gènes des SIBLING sont regroupés dans le Bone Gene Cluster d'une manière similaire dans tous les génomes des mammifères connus à ce jour (b) leurs transcrits sont constitués exclusivement d'acides aminés hydrophiles. Leurs exons ont souvent des motifs et des propriétés similaires et sont séparés par des introns de type 0. Le premier exon est non codant. Le second exon contient le codon d'initiation, le peptide signal hydrophobe, et les deux premiers acides aminés de la protéine mature (A1A2). Les Exons 3 et 5 contiennent souvent des séquences consensus pour la phosphorylation de la sérine (PO<sub>4</sub>). L'exon 4 peut être relativement riche en proline. Le tripeptide de liaison à l'intégrine, Arg-Gly-Asp (RGD), se trouve à l'intérieur du dernier ou des deux derniers exons (qui codent plus de 80 % de la protéine). Toutes les SIBLING contiennent des oligosaccharides N et/ou O liés, différemment situées (GAG Orange indique les chaînes de chondroïtine ou de dermatane sulfate et GAG vert indique les chaînes de kératane sulfate. Les ciseaux indiquent des sites de clivage par des protéases spécifiques (Comme la BMP1, la thrombine, les métalloprotéinases, Bellahcène., 2008)**

Les SIBLING apparaissent exprimées par de très nombreux organes en dehors du squelette, en particulier le rein (Ogbureke and Fisher, 2005) et les organes sécrétoires (glandes salivaires, Ogbureke and Fisher, 2004). Dans l'os, qui est l'organe où la plupart d'entre elles ont été découvertes, les SIBLING sont (à l'exception de la DSPP) abondamment sécrétées dans la matrice extracellulaire durant la formation de l'ostéoïde et sa minéralisation (Bellahcène et al., 2008, Fisher and Fedarko, 2003, Huq et al., 2005, Fisher et al., 2001).

En dépit des similitudes structurales existantes entre les SIBLING, nous nous concentrons dans ce qui suit sur les rôles de chacune dans le développement, la minéralisation de la matrice et son remodelage, rôles dont nous verrons qu'ils sont spécifiques.

### A.3.2.2. La Dentin Matrix Protein-1 (DMP1) :

La « Dentin matrix protein 1 » est un membre de la famille des SIBLING qui est exprimé dans la dent, l'os, mais aussi les tissus non minéralisés tel que les glandes salivaires et le rein (Ogbureke and Fisher, 2004, Ogbureke and Fisher, 2005) et dans le cerveau et les tumeurs (Terasawa et al., 2004). Sur le plan cellulaire, cette protéine est exprimée dans les odontoblastes, avec une expression transitoire dans les améloblastes (George et al., 1995). Elle est également faiblement exprimée par les ostéoblastes, mais très fortement par les ostéocytes (Hirst et al., 1997, Fen et al., 2002, Feng et al., 2003). On retrouve DMP1 aussi dans le cartilage, exprimée par les chondrocytes hypertrophiques.

Cette glycoprotéine est principalement impliquée dans la régulation de la minéralisation de la matrice extracellulaire (Ling et al., 2005, Schiavi, 2006, Figure 7). La surexpression de DMP1 *in vitro* induit une différenciation des cellules mésenchymateuses embryonnaires en

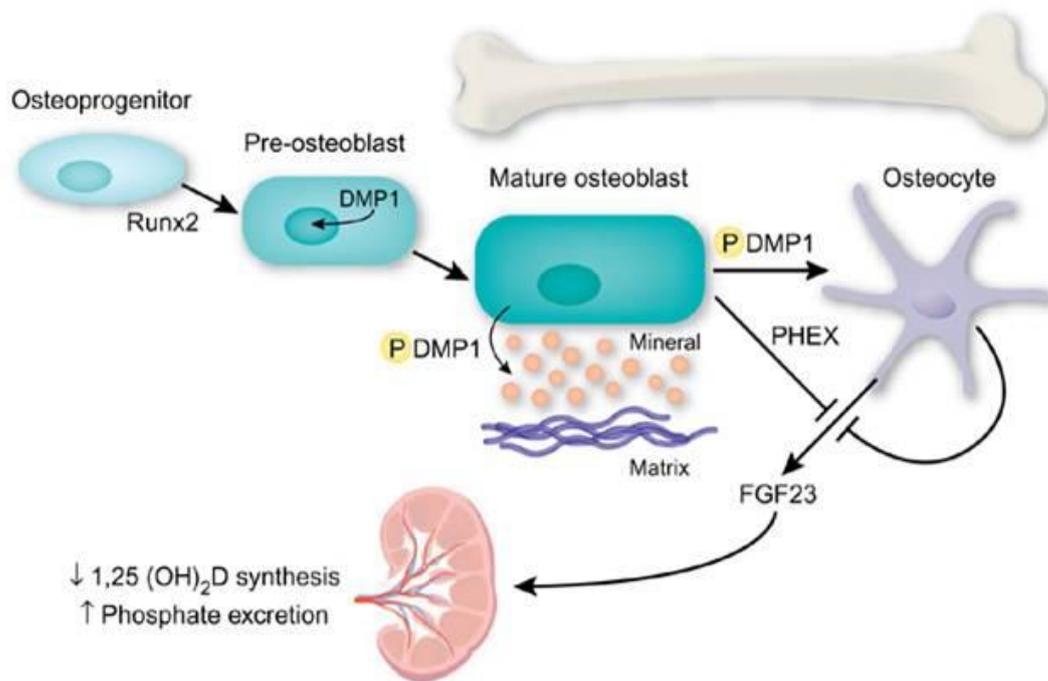


Figure 7: Rôle de DMP1 dans la minéralisation, la maturation des ostéocytes et l'homéostasie du phosphate (Schiavi., 2006)

odontoblastes et augmente la minéralisation (Narayanan et al., 2001). En se liant au  $\text{Ca}^{2+}$ , DMP1 initie le dépôt des minéraux (Narayanan et al., 2001). Bien que les souris déficientes en DMP1 semblent normales à la naissance, elles développent ensuite de sévères anomalies

du phénotype osseux, qui incluent une ostéomalacie avec un défaut de croissance et de remodelage, associés à une diminution de l'ossification endochondrale (Ye et al., 2005), ainsi qu'une altération de la structure ostéocytaire (Feng et al., 2006), avec une augmentation considérable du niveau de FGF23 (« Fibroblast Growth Factor 23 ») circulant (Farrow et al., 2009), et de son expression par les ostéocytes. En effet la fraction entière de DMP1 est clivée par la BMP1 (« Bone Morphogenic Protein1 ») ou une « subtilisin-like proprotein convertase » en un fragment N-terminal de 37 kDa et un fragment C-terminal de 57 kDa, qui est le fragment fonctionnel dans le contrôle de la minéralisation, la maturation ostéocytaire via la diminution de l'expression des gènes ostéoblastiques, et l'homéostasie du phosphate en régulant l'expression de FGF23 dans l'os (Lu et al., 2011).

### **A.3.2.3. La Dentin SialoPhosphoProtein (DSPP) :**

La DSPP, localisée principalement dans la matrice extracellulaire de la dentine, est divisée suite à un clivage par une peptidase en deux fragments possédant un rôle important dans la minéralisation : la dentine phosphoprotéine (DPP) et la dentine sialoprotéine (DSP). Un troisième fragment clivé par la métalloprotéinase matricielle 2 (MMP2) et la MMP 20 au niveau de l'extrémité C-terminale de la DSP, est appelée la dentine glycoprotéine (DGP, Yamakoshi et al., 2005).

Le fragment DPP contenant le peptide ASARM (Tsuchiya et al., 2011), est clivé à partir de la DSPP par la BMP1. Diverses études ont démontré son rôle important dans la maturation de la minéralisation de la dentine, vu sa forte affinité au  $\text{Ca}^{2+}$  (Suzuki et al., 2009). La DSP est impliquée dans la régulation de l'initiation de la minéralisation (Suzuki et al., 2009).

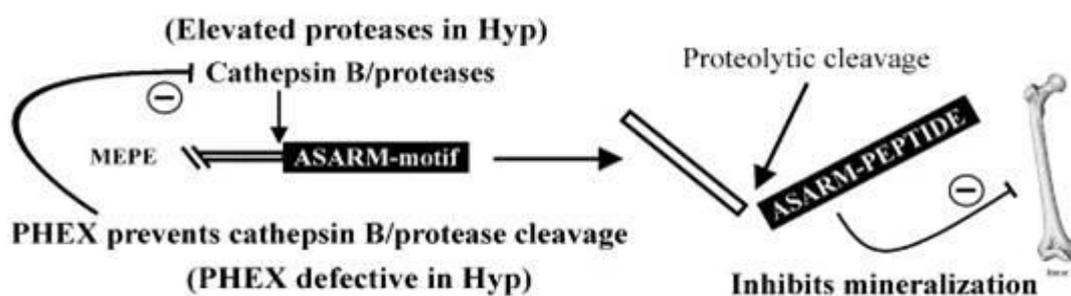
Les souris déficientes en DSPP montrent une minéralisation accélérée à cinq semaines avec une augmentation de la cristallinité et de la maturation du collagène au niveau trabéculaire, suivie d'une altération des propriétés structurales osseuses à neuf mois, avec des fémurs plus petits, hypominéralisés, associés à une réduction, cette fois-ci de la maturation et de la cristallinité du collagène au niveau cortical et trabéculaire (Verdelis et al., 2008). Cette hypominéralisation est associée à des défauts de minéralisation de la dentine (Sreenath et al., 2003). Toutes ces différences démontrent que la DSPP régule à la fois la minéralisation et le remodelage osseux. La relation entre la DSPP et les ostéoclastes n'a pas été étudiée, il y aurait une augmentation (2.6x) du nombre d'ostéoclastes en absence de DSPP (Gao, 2011).

### A.3.2.4. La Matrix Extracellular PhosphoglycoprotEin (MEPE) :

MEPE est une glycoprotéine de 56-58 Kda, composée de 525 acides aminés chez l'être humain, et exprimée dans l'os principalement par les ostéocytes (Nampei et al., 2004). L'expression de MEPE est augmentée dans les ostéoblastes durant la minéralisation (Petersen et al., 2000).

A l'instar des autres SIBLING, l'activité de MEPE est dépendante de son état de clivage et de sa phosphorylation. Des travaux récents ont identifié le peptide ASARM (2.2 kDa), situé immédiatement en aval du site de clivage par la cathepsine B (Rowe et al., 2000a). Ce motif est responsable du défaut de minéralisation, observé dans le rachitisme hypophosphatémique dominant lié à l'X, la forme la plus commune des rachitismes d'origine génétique (Martin et al., 2008).

PHEX (« Phosphate-regulating gene with homology to endopeptidases on X-chromosome »), une Zn-metallo-endopeptidase, joue un rôle central dans la protection des clivages protéolytiques de MEPE par la cathepsine B. En effet PHEX peut se lier à MEPE et empêcher ainsi la libération du peptide ASARM (Guo et al., 2002, Figure 8). Les souris HYP, qui n'expriment pas PHEX et ont des taux sériques élevés du peptides ASARM, présentent une expression accrue de la cathepsine D, un activateur en amont de cathepsine B (Rowe et al., 2006), ce qui suggère que PHEX participe à la réduction de l'activation de la cathepsine B.



**Figure 8: Schéma illustrant le mécanisme moléculaire et le rôle de PHEX, MEPE et le peptide ASARM dans la minéralisation. PHEX protège MEPE de son clivage spécifique par la cathepsine B, empêchant ainsi la libération du peptide ASARM, qui possède un rôle inhibiteur de la minéralisation. (Rowe et al., 2004)**

Durant le processus d'ossification endochondrale, MEPE possède un rôle fonctionnel dans la minéralisation de la plaque de croissance par les chondrocytes, qui est dépendante de son état

de phosphorylation et de son clivage. MEPE et son produit de clivage ASARM sont localisés au niveau de la zone hypertrophique de la plaque de croissance (Staines et al., 2012). L'ajout de [20  $\mu$ M] peptide ASARM phosphorylé, ainsi que la surexpression de MEPE dans une lignée de cellules chondrocytaires inhibent la minéralisation de la matrice (Staines et al., 2012). Dans un modèle pertinent d'ossification endochondrale, basé sur la culture de métatarses embryonnaires, l'ajout de pASARM inhibe à son tour la minéralisation de la matrice cartilagineuse, en entraînant une réduction de l'expression en ARNm du VEGF («Vascular Endothelial Growth Factor») et celle des marqueurs des cellules endothéliales, nécessaire lors de l'invasion vasculaire de l'ébauche cartilagineuse (Staines et al., 2012).

Durant la croissance, l'absence de MEPE conduit à une masse osseuse augmentée en raison de l'augmentation du nombre et de l'activité des ostéoblastes. Aucun effet sur le nombre des ostéoclastes n'est observé (Gowen et al., 2003). Cependant, la surexpression de MEPE entraîne une diminution significative du nombre et de l'activité des ostéoclastes (David et al., 2009). Par ailleurs la surexpression de MEPE (sous le contrôle du promoteur de *Col1 $\alpha$ 1*) entraîne un défaut de minéralisation et une augmentation de la quantité de peptides MEPE-ASARM dans l'os (David et al., 2009). Sur le plan osseux, les souris surexprimant MEPE (souris MEPE TGN) présentent des plaques de croissances plus larges et une diminution significative de la vitesse d'apposition du minéral dans l'os trabéculaire (David et al., 2009).

### **A.3.3. L'ostéopontine (OPN) :**

#### **A.3.3.1. Présentation générale :**

Cette protéine est probablement le membre de la famille des SIBLING le mieux étudié à ce jour et l'une des protéines non collagéniques les plus abondantes dans la matrice osseuse (Mark et al., 1987). Sa présence dans différents organes (l'os, la dentine, les glandes mammaires, le rein, le cerveau, les ganglions de l'oreille interne) et sa sécrétion par les cellules épithéliales dans de nombreux liquides biologiques (la bile, le sang, l'urine, le lait et le liquide séminal) suggèrent qu'elle est à la fois une molécule structurale, un facteur humoral et une cytokine (Nanci, 1999; Denhardt et al., 2001).

L'OPN, aussi connu sous le nom de SPP1 est formée de 300 acides aminés, dont un motif RGDS qui est localisé au niveau de la moitié de sa séquence (Sodek et al., 2000). La conservation des séquences entre espèces suggère que l'OPN est apparue très tôt durant l'évolution. Dans l'os, cette protéine est produite par les ostéoblastes, les ostéoclastes et les

ostéocytes (Dodds et al., 1995; Zohar et al., 1998; Sodek et al., 1995) ; on retrouve aussi l'OPN dans le cartilage hypertrophique de la plaque de croissance (Landis et al., 2003).

L'OPN subit des modifications post-traductionnelles (phosphorylation, glycosylation, sulfation) ; les niveaux de ces dernières dépendant de l'organe et du temps suivant la synthèse de l'OPN. La phosphorylation module les fonctions ostéoblastiques et ostéoclastiques, affectant l'efficacité d'adhésion de différents types cellulaires (Saavedra, 1994; Lasa et al., 1997; Ashkar et al., 2000). Ainsi plusieurs études ont démontré que la PAL (« Phosphatase Alcaline») déphosphoryle l'OPN, bloquant son activité inhibitrice sur la formation de l'hydroxyapatite (HA) et sur la croissance (Boskey, 1995; Hunter et al., 1994; Jono et al., 2000). La sulfation quant à elle peut affecter la formation des nodules de minéralisation (Nagata et al., 1989). Toutefois, ces résultats ont essentiellement été obtenus *in vitro* et la signification physiologique des changements de modification post-traductionnelles de l'OPN n'est pas encore élucidée.

L'OPN se lie d'une manière covalente à la fibronectine, via une transglutamination, qui augmente sa liaison au collagène de type1 (Beninati et al., 1994; Kaartinen et al., 1999). L'ostéocalcine (OCN) catalyse l'action de cette transglutaminase, en bloquant le pontage de l'OPN à la matrice (Kaartinen et al., 1999). Une autre propriété spécifique de l'OPN, est la présence de 10 à 12 résidus d'acide aspartique ; ce motif confère une haute charge négative localisée qui doit être importante pour la fixation de l'OPN au minéral. Malgré l'absence d'un phénotype évident chez les souris déficientes en OPN, étant indétectable par les méthodes radiologiques et histologiques, l'analyse FTIRM («Fourier Transform Infrared Microscopic Analysis») a révélé une quantité relative du minéral dans l'os cortical et une maturité minérale significativement plus élevée chez les souris déficientes en OPN (Boskey et al., 2002). D'autres études montrent que l'absence d'OPN entraîne une diminution de 30 % de la résistance aux fractures, suggérant un rôle important de l'OPN dans la prévention de la propagation des microfissures (Turner et al., 2010).

La première classe de récepteur de l'OPN est la famille des intégrines, dont plusieurs se lient au motif RGD. L'interaction de l'OPN avec le récepteur  $\alpha\beta3$  est essentielle pour la résorption et la migration des ostéoclastes (Miyachi et al., 1991, Ross et al., 1993), ainsi que l'adhérence et la migration des cellules de muscle lisse (Liaw et al., 1994). D'autres intégrines, comme  $\alpha\beta1$  et  $\alpha\beta5$  sont aussi des récepteurs de l'OPN (Hu et al., 1995a). La liaison de l'OPN à ces trois intégrines est renforcée par les cations  $Mg^{2+}$  ou  $Mn^{2+}$ , mais pas le  $Ca^{2+}$  qui bloque l'interaction entre OPN et  $\alpha\beta3$  (Hu et al., 1995a ; Hu et al., 1995b).

Le CD 44, récepteur de l'acide hyaluronique, a également été identifié comme un récepteur pour l'OPN (Weber et al., 1996). Cette interaction est impliquée dans la migration des macrophages et des cellules tumorales. Plusieurs études mentionnent l'existence d'une boucle de rétroaction, où l'OPN augmente l'expression de CD44, principalement *in vitro*, comme l'ont démontré les études sur les lignées cellulaires de cancer du sein (21NT (Khan et al., 2005), de cellules de mélanomes (Gao et al., 2003) ou de carcinome du foie (HepG2, Samanna et al., 2006).

### A.3.3.2. Rôle de l'OPN dans l'os :

Localisée dans les interfaces matrice-cellules et matrice-matrice (McKee et Nanci., 1996), l'OPN sert à l'attachement des cellules à l'hydroxyapatite de la partie minérale de l'os, adhérant au minéral par sa région poly-aspartate et aux intégrines et CD44 du côté cellulaire. Les souris déficientes en cette SIBLING ne présentent aucune altération morphologique ou ultrastructurale détectable au niveau osseux (Rittling et al., 1998). Par contre, le rôle de l'OPN dans la fonction et l'activité des ostéoclastes est bien établi. En effet, les souris OPN-/- présentent une accélération de la production des ostéoclastes, ce qui pourrait être un mécanisme compensatoire de la diminution de la motilité et de l'activité de résorption ostéoclastique en absence d'OPN (Rittling et al., 1998; Chellaiah et al., 2003). Les ostéoclastes se fixent à l'OPN et l'utilisent pour assurer leurs déplacements via le récepteur  $\alpha\beta3$  (Figure 9 ; Reinholt et al., 1990; Miyauchi et al., 1991; Faccio et al., 1998).

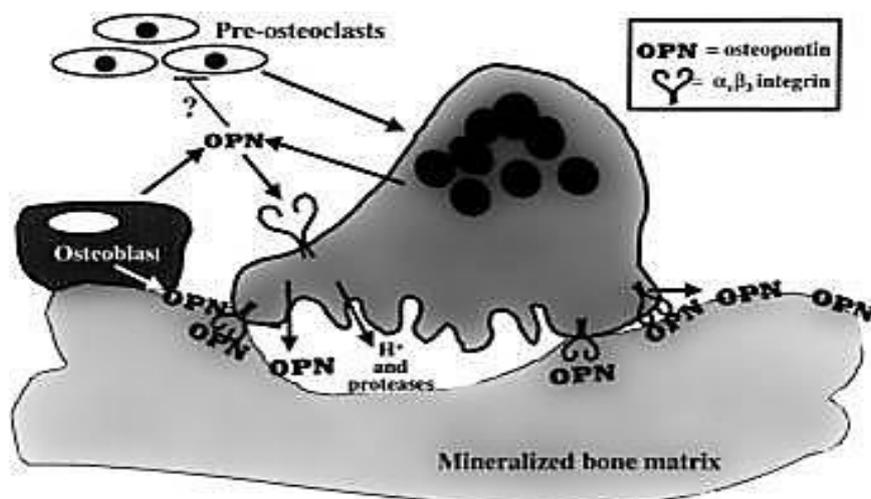


Figure 9: Schéma illustrant le rôle de l'ostéopontine dans le remodelage et la biominéralisation des tissus calcifiés. (Giachelli et al., 2000)

D'autres études ont tenté d'élucider le rôle précis de l'OPN dans la résorption osseuse et ont impliqué le CD44, un récepteur cellulaire de surface pour l'OPN (Chellaiah et al., 2003) (Suzuki et al., 2002). L'interaction de l'OPN au récepteur  $\alpha\beta 3$  présent à la surface des ostéoclastes stimule l'activité de la 3-kinase phosphatidyl inositol (PI3K) hydroxyle (Hruska et al., 1995). Cette interaction est inhibée par le  $\text{Ca}^{2+}$  (Hu et al., 1995b), suggérant un mécanisme de régulation, car la résorption ostéoclastique augmente considérablement la concentration locale des ions de calcium. *In vitro*, les ostéoclastes isolés à partir des souris déficientes en OPN, présentent une hypomotilité résultant en partie de la diminution de l'expression du CD44 (Chellaiah and Hruska, 2003). L'ajout d'OPN exogène stimule l'expression du CD44 et restaure partiellement la résorption osseuse (Chellaiah et al., 2003). Plusieurs effets de l'OPN sur la fonction ostéoclastique requièrent la phosphorylation de la protéine. La phosphorylation de l'OPN par la caséine kinase II augmente l'adhésion des ostéoclastes, mais pas celle des ostéoblastes (Katayama et al., 1998). En contrepartie, la déphosphorylation de l'OPN par la Tartrate Résistante Acide Phosphate (TRAP) induit un détachement des ostéoclastes *in vitro* (Ek-Rylander et al., 1994).

Contrairement aux effets de l'OPN sur les fonctions des ostéoclastes, les effets de la protéine sur la différenciation et la fonction des ostéoblastes ne sont pas aussi clairs. Il a été suggéré que la majorité de l'OPN dans l'os est synthétisé par ostéoblastes au cours du remodelage osseux (McKee and Nanci, 1996b). Ceci est appuyé par une expression biphasique de l'OPN au cours de la différenciation des ostéoblastes *in vitro*. En effet l'OPN est exprimée fortement à des stades précoces de prolifération des progéniteurs/préostéoblastes, puis à nouveau de manière intense par les ostéoblastes différenciés (Owen et al., 1990). Chez le rat au moins, le premier pic correspond à une protéine d'un poids moléculaire de 55 kDa, contenant peu de sites de sulfatation et de phosphorylation, tandis que les ostéoblastes différenciés/minéralisants secrètent une OPN d'un poids moléculaire de 44 kDa et hautement phosphorylée et sulfatée (Sodek et al., 1995 ; Boskey, 1995).

Les études utilisant les souris OPN<sup>-/-</sup>, suggèrent un rôle de cette protéine dans la régulation de la fonction ostéoblastique. En effet la diminution de la formation osseuse observée après la suspension de la queue des souris sauvages n'est pas observée chez les souris déficientes en OPN (Ishijima et al., 2002). Des études *in vitro* sur des cultures d'ostéoblastes, ont montré que l'OPN recombinante augmente leur prolifération et leur différenciation (Jang and Kim, 2005), et la surexpression d'OPN dans la lignée pré-ostéoblastique MC3T3-E1 diminue à la fois la prolifération et le dépôt de minéraux (Huang et al., 2004).

Comme indiqué plus haut, l'OPN est également un régulateur de la formation et de la croissance des cristaux d'hydroxyapatite. En accord avec l'hyperminéralisation des souris OPN<sup>-/-</sup>, l'OPN apparaît dans les expériences *in vitro* comme un inhibiteur de la formation de l'hydroxyapatite et sa déphosphorylation enzymatique réduit cette activité inhibitrice (Boskey et al., 1993; Hunter et al., 1996). Une récente étude a démontré que la forme phosphorylée du peptide ASARM de l'OPN inhibe la minéralisation de la matrice extracellulaire dans des cultures de cellules MC3T3-E1 *in vitro*. Cette inhibition peut être levée par une digestion protéolytique du peptide ASARM par PHEX (Addison et al., 2010).

#### **A.3.4. La Sialoprotéine Osseuse (BSP) :**

##### **A.3.4.1. Présentation générale :**

Cette glycoprotéine non collagénique a été initialement isolée, sous forme de fragments de l'os cortical bovin et décrite par la suite sous sa forme entière. C'est une protéine de 70-80 kDa, composée de 303 acides aminés, très abondante dans l'os, la dentine et le cartilage minéralisé. Elle est exprimée en abondance dans les ostéoblastes, les ostéoclastes, les ostéocytes et les chondrocytes hypertrophiques (Bianco et al., 1991; Chen et al., 1991). La BSP a également été détectée dans les poumons, la thyroïde, le placenta (Bianco et al., 1991; Ogata, 2008) et le rein et les glandes salivaires (Ogbureke and Fisher, 2004). Par ailleurs elle est impliquée dans la physiopathologie des processus tumoraux et des métastases (Bellahcène et al., 2008).

La séquence de la BSP contient principalement des résidus glycine (GLY), glutamate (GLU) qui constituent 33 % des acides aminés (Ganss et al., 1999). A l'instar des autres SIBLING, la BSP présente une séquence RGD, localisée dans la partie carboxy-terminale de la molécule (Oldberg et al., 1988). Sa région polyglutamique est impliquée dans l'interaction avec les cristaux d'hydroxyapatite, alors que le motif RGD joue un rôle prépondérant dans l'attachement cellulaire.

Cette protéine hautement acide (PKa~3.9) présente différentes modifications post-traductionnelles, dont des phosphorylations sur des tyrosines, serines et thréonines (Oldberg et al., 1988), la plupart étant situées dans la moitié amino-terminale. Après sa sécrétion, la BSP subit des phosphorylations supplémentaires par des ectokinases (Caséine Kinase II), situées à la surface des ostéoblastes (Zhu et al., 1997). D'autres modifications par sulfation sur les résidus Tyr (Hunter et al., 1988), et par glycosylation sur les motifs Asparagine-X-Serine/Thréonine affectent la BSP (Oldberg et al., 1988).

L'expression de la BSP est régulée par de multiples facteurs. Elle est stimulée par la dexaméthasone dans les préostéoblastes en phase de réplication et au contraire inhibée par la vitamine D3 (Oldberg et al., 1989). Par ailleurs la PTH augmente l'expression de la BSP chez le rat (Ogata et al., 2000) et chez l'humain (Araki et al., 2009) ; ce volet sera traité ultérieurement.

Les œstrogènes (E2) à leur tour stimulent l'expression de la BSP dans les cellules ostéogéniques des rats (Shimizu and Ogata, 2002). Kim et Sodek ont proposé que la liaison de la BSP à la surface des ostéoblastes et ostéoclastes puisse être régulée par les œstrogènes (Kim and Sodek, 1999). La BSP constitue un marqueur dont la réponse à la carence en E2 est parmi les plus précoces. En effet, son expression est inhibée dès le premier jour après l'ovariectomie chez la rate (Bonnelye et al., 2002), ce qui suggère que E2 joue un rôle dans la régulation de l'expression de la BSP au cours du remodelage. D'autres études *in vitro* ont démontré que des dérivés d'isoflavones, caractérisés par leurs propriétés pseudo-œstrogéniques, augmentent la transcription de la BSP des cellules ROS17/2.8 (Shimizu and Ogata, 2002), alors que le TNF- $\alpha$  («Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ») l'inhibe (Samoto et al., 2002). Cette même équipe a montré que l'expression de la BSP est stimulée par les lipopolysaccharides (LPS ; (Kato et al., 2006; Li et al., 2012), par l'application d'un champ magnétique statique (Shimizu et al., 2004) et par l'irradiation laser (Sasaki et al., 2011).

Des facteurs de croissance et des cytokines régulent également l'expression de la BSP. L'effet du FGF2 («Fibroblast Growth Factor») dépend fortement du type cellulaire ; il diminue l'expression de la BSP par les MC3T3-E1, alors qu'il l'augmente dans les ROS17/2.8 (Shimizu-Sasaki et al., 2003; Shimizu-Sasaki et al., 2001), ainsi que dans les MCF7, des cellules humaines de cancer du sein (Li et al., 2010). D'autres molécules telles que l'IGF-1 («Insulin Growth Factor») (Nakayama et al., 2006), les PGE2 (Prostaglandines 2 ; Samoto et al., 2003), le PDGF («Platelet-Derived-Growth-Factor» ; (Mezawa et al., 2009), l'interleukine 11 (IL-11; Wang et al., 2011) stimulent l'expression du gène de la BSP. Une récente étude a montré que les protamines, de petites protéines nucléaires impliquées dans la spermatogenèse induisaient la transcription du gène de la BSP (Zhou et al., 2013).

#### **A.3.4.2. Rôle de la BSP :**

Grâce à ses propriétés structurales, la BSP est capable de se lier à différentes composantes de la matrice extracellulaire ainsi qu'aux cellules, par les intégrines  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$  ou  $\alpha\text{v}\beta\text{5}$  (Ganss et al., 1999). Dans la matrice, elle se lie au collagène (Fujisawa and Kuboki, 1992), à

l'hydroxyapatite (Goldberg et al., 2001) et aux métalloprotéinases matricielles (Jain et al., 2008). Ces interactions sont en accord avec un rôle primordial de la BSP dans la minéralisation.

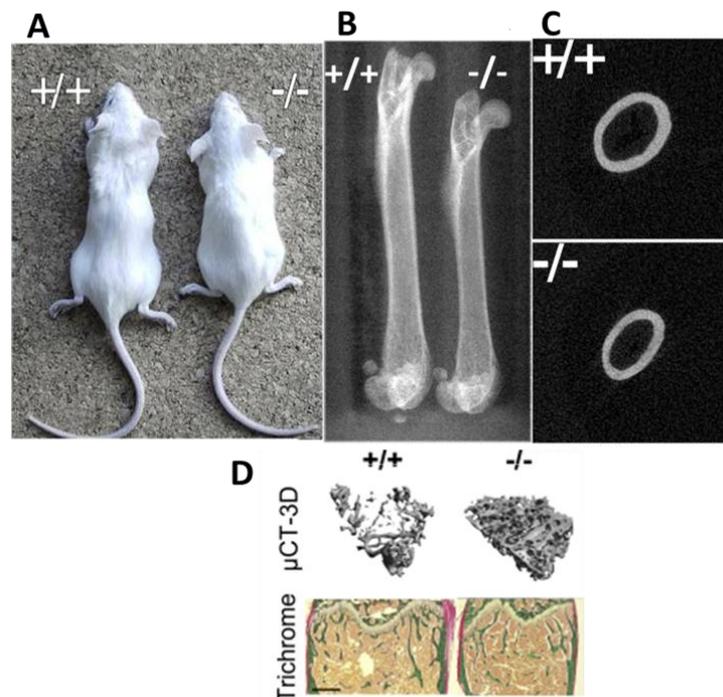
Le processus de la minéralisation des tissus conjonctifs implique, des mécanismes complexes, qui comprennent deux étapes essentielles : la nucléation du cristal, puis la croissance, l'expansion et la maturation du cristal, sous une forme qui dans l'os est voisine de l'hydroxyapatite.

La BSP apparaît impliquée dès l'étape d'initiation de la minéralisation, de par sa localisation dans les sites de formation des cristaux de minéraux (Gorski et al., 2004), et sa grande capacité à nucléer les cristaux d'hydroxyapatite (Hunter et al., 1994). *In vivo*, l'hypominéralisation des souris BSP<sup>-/-</sup>, surtout sensible chez les souriceaux et qui disparaît avec l'âge, confirme son implication dans les processus de minéralisation primaire (Malaval et al., 2008).

Gorski et collaborateurs ont décrit sur des bases immunologiques une protéine, la BAG-75, qui jouerait un rôle crucial dans cette première étape et qui est co-localisée avec la BSP (Gorski et al., 2004). La BAG-75 définirait les limites de la zone de minéralisation et empêcherait l'accès des inhibiteurs de la minéralisation tels que l'OPN ou la Gla-protéine matricielle (MGP) (Gorski et al., 2004). Aucun gène pour la BAG-75 n'a pu être identifié après séquençage du génome murin qui pourrait en fait être un complexe incluant des SIBLING, dont la DMP1.

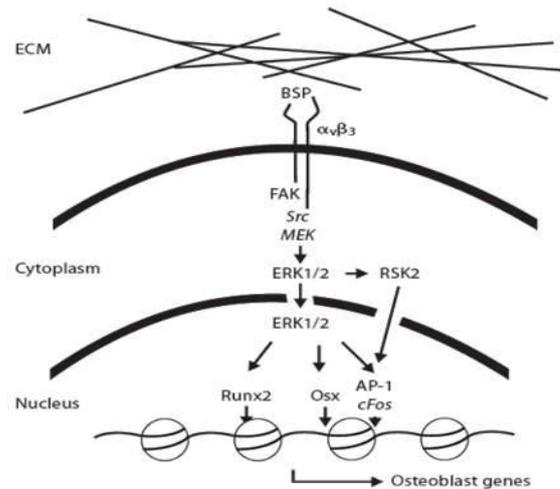
Les différents isoformes obtenus suite aux différentes modifications post-traductionnelles de la BSP pourraient jouer des rôles distincts dans la minéralisation, car elles sont distribuées de manière différente durant ce processus (Zhu et al., 2001). Ainsi les molécules de BSP hautement sulfatées sont retrouvées dans les sites de nucléation des cristaux d'hydroxyapatite, alors que les molécules plus faiblement sulfatées et plus fortement phosphorylées sont retrouvées plus tard, lors de la croissance du minéral. Cependant, les variantes de BSP hautement phosphorylées sont retrouvées dans la matrice ostéoïde. Ceci confirme des résultats d'études anciennes qui montraient que les modifications post-traductionnelles de type sulfation joueraient un rôle dans la capacité de la BSP et l'OPN à nucléer et réguler la croissance des cristaux d'hydroxyapatite pendant la formation d'os lamellaire (Hunter et al., 1994).

Durant le développement embryonnaire, l'induction de l'expression BSP coïncide avec la formation initiale de l'os membraneux et endochondral et son niveau maximal d'expression est atteint au cours de l'embryogenèse dans les sites de formation osseuse primaire (Chen et al., 1992 ; Shen et al., 1995). Au cours de la croissance osseuse et tout au long du processus de développement, les souris déficientes en BSP sont plus petites que leurs homologues de type sauvage (Malaval et al., 2008, Figure 11). Ce retard de croissance est associé à une corticale plus mince chez les jeunes souris mutantes, dont l'épaisseur se normalise progressivement avec l'âge, tandis que le volume trabéculaire est plus élevé en absence de BSP (Malaval et al., 2008, Figure 11). Dans le cas d'une surexpression de BSP, les souris présentent au contraire une réduction du volume trabéculaire dans le fémur et les vertèbres (Valverde et al., 2008). Il apparaît que l'absence de BSP affecte à la fois le cartilage de croissance et les ostéoblastes en réduisant leur nombre et leur activité, et donc la formation osseuse.



**Figure 10 : Phénotype osseux des souris *BSP*<sup>-/-</sup>. (A) Morphologie des souris *BSP*<sup>+/+</sup> et *BSP*<sup>-/-</sup>, (B) images en  $\mu$ -CT de fémurs entiers (C) imagerie en  $\mu$ -CT de l'os cortical (D) Evaluation du BV/TV de l'os trabéculaire (Malaval et al., 2008)**

Au niveau cellulaire, des travaux *in vitro* déjà anciens avaient montré que la BSP était mitogénique pour les pré-ostéoblastes dans la matrice collagénique (Xu et al., 2007), et que son expression coïncidait avec le schéma d'expression de l'intégrine  $\alpha\beta_3$  dans des cultures cellulaires de MC3T3-E1 (Schneider et al., 1999). La surexpression de la BSP dans les préostéoblastes induit leur différenciation en ostéoblastes, tout en augmentant l'expression des marqueurs ostéoblastiques précoces (Runx2, Osterix :Osx) et tardifs (OCN) et le taux de minéralisation matricielle (Gordon et al., 2007). Ces effets apparaissent médiés par la



**Figure 11 : Schéma de la voie de signalisation impliquant la BSP dans l'augmentation de la différenciation ostéoblastique (Gordon et al., 2009)**

voie de signalisation de l'intégrine  $\alpha\beta_3$  (Gordon et al., 2009; Figure 11). Ces études *in vitro* sont en accord avec les phénotypes osseux des souris surexprimant la BSP (Valverde et al., 2008) et des BSP<sup>-/-</sup> (Malaval et al., 2008).

La BSP stimule la résorption ostéoclastique (Chenu et al., 1994) de par sa liaison avec l'intégrine  $\alpha\beta_3$  qui induit une réponse calcique dans les ostéoclastes (Paniccia et al., 1993). L'ajout de BSP exogène à des monocytes extraits de rates de souris BSP<sup>-/-</sup> restaure la formation d'ostéoclastes multinucléés et leur activité (Boudiffa et al., 2010). Les souris transgéniques surexprimant la BSP de façon globale ou restreinte aux ostéoclastes présentent de fait un nombre d'ostéoclastes et une capacité de résorption plus élevés (Valverde et al., 2008), expliquant le plus faible volume osseux. Au contraire, ils sont moins nombreux dans les os des souris BSP<sup>-/-</sup>, et la trop faible résorption entraîne l'accumulation d'os trabéculaire en dépit de la formation osseuse diminuée (Malaval et al., 2008). D'autres travaux ont par ailleurs montré une synergie d'action entre la BSP et le RANKL («Receptor Activating NF Kappa B Ligand»), entraînant l'activation du facteur régulateur de l'ostéoclastogénèse (NFATC-2 :Nuclear Factor of activated T-cells cytoplasmic 2 ; Valverde et al., 2005). Par contre, la forme déphosphorylée de la BSP inhibe la résorption osseuse, entraînant la diminution de la production de RANKL par les ostéoblastes (Curtin et al., 2009). Par ailleurs la déphosphorylation de la BSP et de l'OPN module l'adhésion des ostéoclastes *in vitro* (Ek-Rylander et al., 1994).

---

---

**Les protéines composantes de la famille des SIBLING partagent de nombreuses caractéristiques communes, mais affichent des distributions différentes et des fonctions distinctes, fortement tributaires de leurs modifications post-traductionnelles. Toutes interviennent cependant dans la biominéralisation.**

---

---

## **A.4. Vascularisation du tissu osseux**

L'os est un organe très vascularisé. Il existe un lien étroit entre vascularisation et remodelage osseux, cependant l'interaction entre ces deux phénomènes, reste encore mal connue. Une vascularisation adéquate de l'os dès les premiers stades du développement embryonnaire est une exigence absolue pour le développement osseux, la croissance, l'homéostasie et la réparation osseuse.

### **A.4.1. Mécanisme de la vascularisation durant l'ossification**

#### **endochondrale :**

Durant l'ossification endochondrale, la mise en place de la vascularisation est un processus extrêmement crucial pour la conversion de l'ébauche cartilagineuse en tissu osseux. En effet, au niveau cellulaire les chondrocytes, les ostéoclastes et les ostéoblastes ont une étroite interaction fonctionnelle avec le système vasculaire et moléculaire avec l'endothélium. L'importance de la vascularisation durant la croissance osseuse a été prouvée dès les années 1960 avec des expériences qui consistaient à bloquer physiquement l'approvisionnement de l'os en sang (Trueta et Amato, 1960; Trueta et Morgan, 1960).

La formation de vaisseaux sanguins matures durant le développement fœtal se produit en différentes étapes. Dans un premier temps les progéniteurs mésodermiques et les angioblastes donnent naissance à des cellules endothéliales qui se regroupent et s'assemblent pour former un labyrinthe vasculaire primitif. Ce processus est appelé "vasculogénèse". Ce lit vasculaire nouvellement constitué, se dilate et se remodèle par "angiogénèse" (bourgeonnement de vaisseaux sanguins préexistants), pour former des conduits extrêmement ramifiés permettant d'assurer aux tissus embryonnaires les apports en oxygène et en nutriments (Carmeliet and Jain, 2011; Potente et al., 2011).

Différentes cellules endothéliales spécialisées ("tip", "stalk", "phalanx") sont impliquées dans le processus de bourgeonnement (sprouting) et de croissance de nouveaux vaisseaux. La mise en place d'un réseau vasculaire fonctionnel nécessite la maturation des vaisseaux nouvellement formés et leur différenciation en artères, veines et capillaires : le processus "d'artériogénèse" repose sur le recrutement de cellules péri-endothéliales qui s'organisent autour de la paroi vasculaire, impliquant généralement des péricytes pour les petits vaisseaux et des cellules musculaires lisses pour les gros vaisseaux (Figure 12).

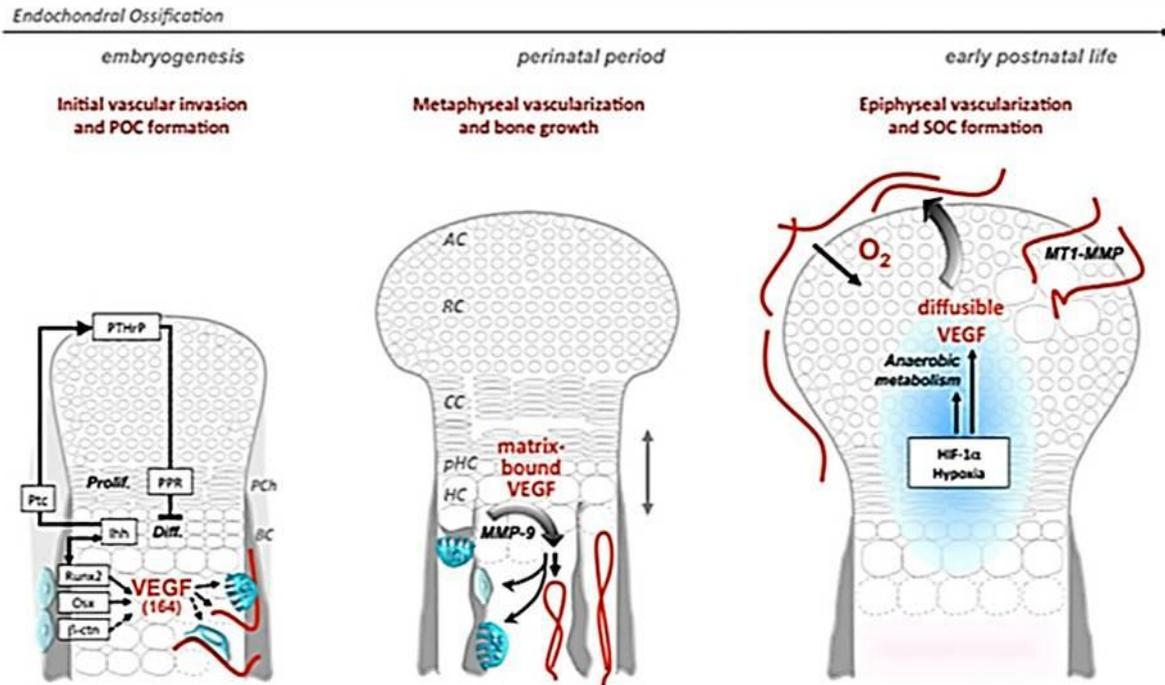


Figure 12: Processus de vascularisation durant l'ossification endochondrale. A GAUCHE: Au cours de l'embryogenèse, l'initiation de la néovascularisation du cartilage est coordonnée par: (1) la prolifération et la différenciation des chondrocytes dans une ébauche cartilagineuse avasculaire. (2) l'ostéoblastogenèse et la formation du « bone colar » (BC), (4) la formation du péri-chondre (Pch) (5) et l'expression de niveaux élevés de VEGF par les chondrocytes hypertrophiques. L'invasion vasculaire est accompagnée par l'apoptose des chondrocytes, la résorption du cartilage par les ostéoclastes et la Co-invasion par les ostéoprogéniteurs se déplaçant au niveau des centres d'ossification primaire (POC).

AU CENTRE : la croissance osseuse en longueur est initiée par le remplacement progressif des chondrocytes hypertrophiques (HC) par de l'os trabéculaire. Ce processus repose sur la vascularisation métaphysaire, qui est médiée par la liaison de l'héparine au VEGF. Ce dernier est libéré sous l'action des MMP9 sur la matrice durant le remodelage du cartilage. Le VEGF stimule le recrutement des précurseurs ostéoclastiques qui atteignent le réseau vasculaire en formation et sécrètent aussi des MMPs, dégradant ainsi la matrice, ce qui permet l'expansion du réseau vasculaire (angiogénèse) et la migration des cellules endothéliales. Le VEGF coordonne ainsi la vascularisation, le remodelage du cartilage et l'ossification en stimulant les ostéoblastes. (AC) aricular chondrocytes (RC) round chondrocytes (CC) columnar chondrocytes (pHC) pré-hypertrophiques chondrocytes.

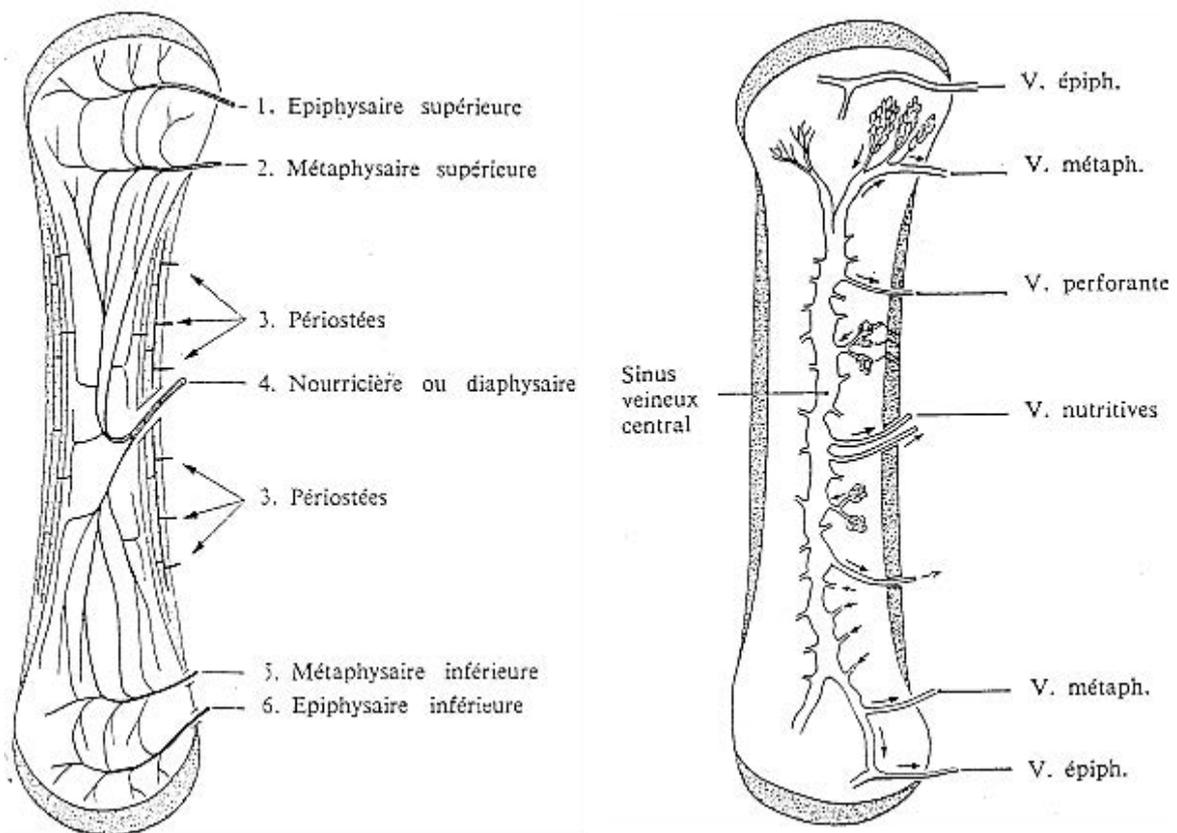
A DROITE : Au cours de la croissance, lorsque le cartilage avasculaire dépasse une taille critique, l'environnement hypoxique entraîne la stabilisation de HIF-1, ce qui va induire l'expression du VEGF dans les chondrocytes. Certains isoformes du VEGF diffusent à la surface du cartilage et stimulent la croissance du réseau vasculaire épiphysaire. Durant le début du développement post natal, les vaisseaux sanguins épiphysaires envahissent le cartilage avasculaire et initient la formation des centres secondaires d'ossification (SOC). (Maes, 2013)

La stabilisation du réseau vasculaire est complétée par le dépôt de matrice extracellulaire, l'induction de la quiescence des cellules endothéliales et l'augmentation de la concentration de la VE-cadhérine qui induit la réduction des jonctions cellulaires (Carmeliet and Jain, 2011; Potente et al., 2011).

#### A.4.2. Vascularisation des os long :

##### A.4.2.1. Anatomie de la circulation intraosseuse:

L'anatomie de la vascularisation intraosseuse est en fonction du type d'os (long ou plat). Chez



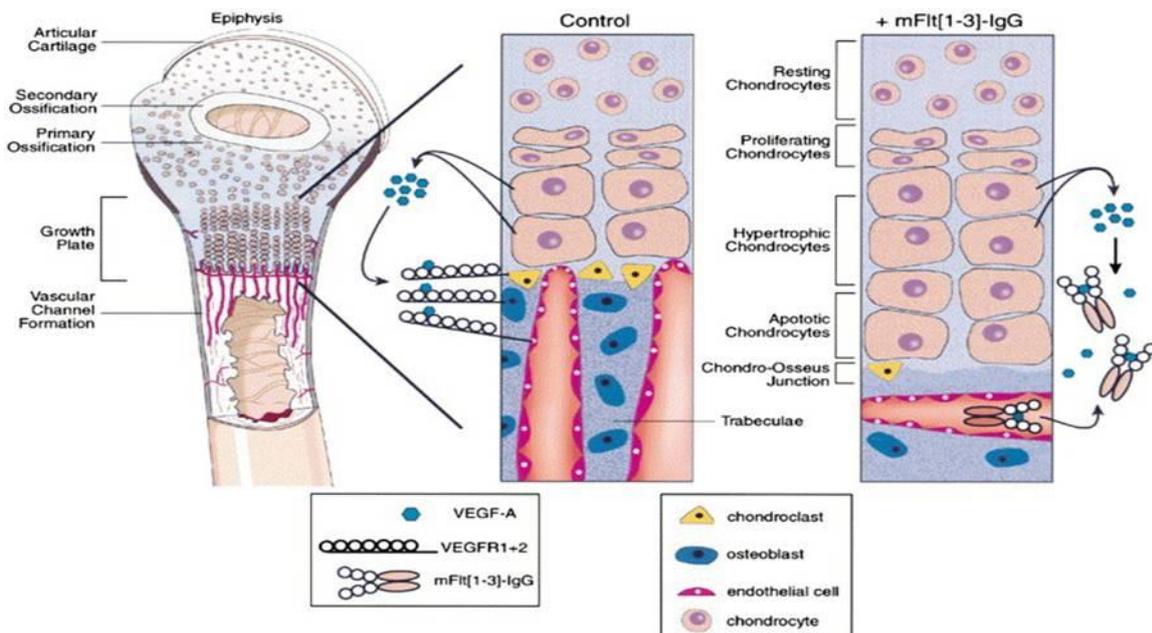
**Figure 13: Schéma de la vascularisation d'un os long. A gauche : la vascularisation artérielle. A droite : la vascularisation veineuse. (Laroche et al., 2002)**

l'homme adulte, la vascularisation des os longs, se compose d'artères de calibre moyen qui pénètrent les corticales osseuses au niveau de trous nourriciers et se ramifient en artérioles puis en capillaires (Laroche, 2002; Figure 13).

Six groupes d'artères amènent le sang oxygéné dans l'os : 1 ou 2 artères diaphysaires, 1 ou 2 artères métaphysaires et épiphysaires supérieures et inférieures et les vaisseaux périostés, qui

constituent un réseau d'anneaux vasculaires autour de la diaphyse et de la métaphyse (Laroche, 2002). Le retour veineux est assuré par un sinus veineux central, occupant le centre de la diaphyse, et formé d'une seule tunique endothéliale (Pooley et al., 1990; Figure 12). Ce sinus se draine dans des veines parallèles aux artères : les veines épiphysaires, métaphysaires et centromédullaires. (Pooley et al., 1990; Oni and Gregg, 1990; Figure 12). De nombreux capillaires sinusoides se ramifient dans la moelle osseuse pour permettre les échanges entre les cellules et le sang. (Pugsley and Tabrizchi, 2000). Au niveau cortical, les vaisseaux intracorticaux cheminent essentiellement dans les canaux de Havers et secondairement dans les canaux de Volkman. La plupart des canaux contiennent un seul capillaire. Ce réseau vasculaire subit un remodelage continu, de même que l'os cortical. Un réseau artériel identique à celui des os longs caractérise la vascularisation des os plats, à l'exception du retour veineux qui est assuré par de multiples sinusoides anastomosés, qui se drainent directement dans les veines corticales.

#### A.4.2.2. Vascularisation et croissance osseuse :



**Figure 14: Représentation schématique des effets de l'administration d'un récepteur soluble du VEGF-récepteur (mFlt [1-3]-IgG) sur la différenciation et la maturation chondrocytaire dans la plaque de croissance (Gerber et Ferrara al., 2010)**

Les chondrocytes qui composent les plaques de croissance des extrémités distales des os longs sont responsables de leur croissance longitudinale. On distingue histologiquement quatre couches différentes de chondrocytes (Figure 14). La zone des chondrocytes au repos constitue

la partie la plus distale ; elle est suivie par une zone de chondrocytes aplatis et proliférants. Ces derniers se transforment en cellules rondes matures, les chondrocytes hypertrophiques, qui expriment des niveaux élevés de PAL et des niveaux bas de collagène de types II et IX en comparaison avec les chondrocytes prolifératifs, ainsi qu'un marqueur spécifique de ce stade, le collagène de type X. Les chondrocytes hypertrophiques situés au niveau de la jonction chondro-osseuse sont prédisposés à subir une mort cellulaire par apoptose (Gerber and Ferrara, 2000). Divers facteurs angiogéniques et anti-angiogéniques ont été identifiés pour être sécrétés par les chondrocytes présents dans la plaque de croissance. Une expression élevée de VEGF (inducteur de l'angiogenèse) a été détectée dans les chondrocytes hypertrophiques (Horner et al., 1999) tandis que ceux des zones de repos ou de prolifération ne l'expriment pas (Gerber et al., 1999). L'administration du mFlt (1-3)-IgG, un récepteur soluble du VEGF qui piège ce facteur et l'empêche de se lier aux récepteurs cellulaires, inhibe la formation de nouveaux vaisseaux sanguins au niveau de la plaque de croissance, entraînant une diminution de la formation de l'os trabéculaire et une expansion de la zone chondrocytaire hypertrophique (Gerber and Ferrara, 2000; Figure13). Un résultat similaire a été observé dans un modèle de souris CRE-lox n'exprimant pas le VEGF au niveau de la plaque de croissance (Haigh et al., 2000). Ces études confirment le rôle du VEGF en tant que régulateur clé de la morphogenèse, de l'invasion capillaire et du remodelage de la plaque de croissance pendant le développement post natal.

Deux autres facteurs sont aussi exprimés par les chondrocytes hypertrophiques de la plaque : les facteurs de croissance fibroblastique bFGF et aFGF. La sécrétion du bFGF par la plaque de croissance tibiale du lapin accélère l'invasion vasculaire, l'ossification du cartilage de conjugaison, ainsi que la différenciation des chondrocytes (Baron et al., 1994). Par ailleurs les chondrocytes de la plaque de croissance des os longs sécrètent un certain nombre d'inhibiteurs de l'angiogenèse, comme le TGF- $\beta$ 1 («transforming growth factor beta1» ; Tada et al., 1994), hCHIAMP (« Chondrocyte Inhibitor of Angiogenesis and metalloproteinase activity », Moses et al., 1990; Moses, 1993), TIMP-1 (Moses et al., 1992), TIMP-2 (Ohba et al., 1995), CHM-I («Chondromoduline-I»; Hiraki et al., 1997; Gerber and Ferrara, 2000; Tableau 1).

Les vaisseaux sanguins de la métaphyse envahissent le cartilage à la base de la zone hypertrophique. L'invasion des cellules endothéliales induit la formation de canaux vasculaires au sein des chondrocytes apoptotiques. Ces vaisseaux sanguins néoformés fournissent l'accès aux ostéoblastes, qui remplacent les chondrocytes apoptotiques et déposent

une matrice osseuse et aux ostéoclastes qui sont impliqués dans l'élimination de la matrice cartilagineuse et qui vont remodeler l'os néoformé. Au cours de la croissance, la taille de la zone des chondrocytes hypertrophiques est maintenue constante par un processus dynamique de renouvellement de la plaque. A la fin de la puberté, stade final de la croissance physiologique osseuse, les différentes zones de la plaque de croissance cessent leur activité.

**Tableau 1 : Liste des facteurs angiogéniques et anti-angiogéniques exprimés par les chondrocytes dans la plaque de croissance (Gerber et Ferrara.,2000)**

<i>Growth factor</i>	<i>Angiogenic effect</i>	<i>Site of expression</i>	<i>Target cell type/receptor expression</i>	<i>Reference</i>
CTGF	Pro	Hypertrophic chondrocytes		Shimo et al. 1998
IGF-1	Pro	Endothelial cells		
EGF	Pro	Proliferative chondrocytes	Proliferative chondrocytes	Joyce et al. 1991
PDGF-A	Pro	Proliferating chondrocytes		Tajima et al. 1994
Transferrin	Pro	Mature, non-hypertrophic chondrocytes	Hypertrophic chondrocytes, sites of vascular invasion	Horner et al. 1996
Cyr61	Pro	Hypertrophic chondrocytes	Endothelial cells	Carlevaro et al. 1997
VEGF	Pro	Differentiating chondrocytes	NA	O'Brien and Lau 1992
		Hypertrophic chondrocytes	Endothelial cells	Gerber et al. 1999
		Embryonic lower hypertrophic chondrocytes	Chondroclasts	Carlevaro et al. 2000
Unidentified	Pro	Hypertrophic chondrocytes	Osteoblast	Horner et al. 1999
MMP-9/gelatinaseB	Pro	Chondroclast	Endothelial cells	Alini et al. 1996
Acidic and basic FGF	Pro	Hypertrophic chondrocytes	Endothelial cells	Vu et al. 1998
			Hypertrophic chondrocytes	Baron et al. 1994
TGF-β1	Pro/anti	Chondrocytes	Endothelial cells	Pepper et al. 1991
TSP-1	Anti	Early chondrocytes	Microvascular endothelial cells	Tucker et al. 1997
TSP-3	Anti	Proliferative and hypertrophic chondrocytes		Tucker et al. 1997
TIMP-1, 2	Anti	Chondrocytes	Endothelial cells	Moses et al. 1992
ChM-I	Anti	Chondrocytes	Endothelial cells	Ohba et al. 1995
CHIAMP	Anti	Chondrocytes	Endothelial cells	Hiraki et al. 1997
				Moses et al. 1990

### **A.4.3. L'angiogenèse - définition et mécanisme - :**

L'angiogenèse se définit comme un processus complexe, multi-étapes qui mène à la formation de nouveaux capillaires sanguins par l'excroissance ou le bourgeonnement de vaisseaux préexistants, capillaires ou veinules (Folkman and Shing, 1992). Au cours du développement, elle permet l'extension et le remodelage du réseau vasculaire primitif afin d'établir un système circulatoire mature et fonctionnel et d'assurer un apport nutritionnel et une expansion tissulaire. Chez l'adulte, où le réseau vasculaire est déjà en place, l'angiogenèse est un mécanisme plus rare qui survient de façon sporadique tout au long de la vie notamment lors de l'inflammation, de la cicatrisation, de la réparation osseuse.

#### **A.4.3.1. Les étapes de l'angiogenèse :**

La formation de nouveaux vaisseaux sanguins est un processus complexe multifactoriel qui se déroule en plusieurs étapes (Figure 15) :

##### **A.4.3.1.1. Activation endothéliale, vasodilatation et perméabilité endothéliale:**

Une étape essentielle pour l'initiation de l'angiogenèse est l'activation de la cellule endothéliale. Lors de cette première étape, plusieurs facteurs angiogéniques provenant de diverses sources (cellules endothéliales, fibroblastes, cellules musculaires lisses, plaquettes, cellules inflammatoires) sont sécrétés dans l'environnement, tels que le VEGF, qui induit une augmentation de l'activité NO synthase (NO: monoxyde d'azote) dans les cellules endothéliales (Griffioen and Molema, 2000). Le VEGF augmente aussi la perméabilité vasculaire, ce qui permet l'extravasation des protéines plasmatiques. Celles-ci forment ainsi un réseau provisoire riche en fibrine pour aider à la migration des cellules endothéliales (Griffioen and Molema, 2000; Carmeliet, 2000) suite au détachement des péricytes (Lakka et al., 2003). Le FGF entreposé dans la lame basale vasculaire est augmenté durant l'angiogenèse (Ucuzian et al., 2010). Les angiopoïétines (Ang-1 et 2) régulent le remodelage vasculaire et l'angiogenèse en se fixant sur leur récepteurs Tie (« Tyrosine Kinase with Immunoglobulin and EGF Homology Domains » ; Ucuzian et al., 2010). L'Ang-1 et l'Ang-2 se lient au même récepteur, mais ont des réponses biologiques différentes.

##### **A.4.3.1.2. Dégradation de la matrice extracellulaire :**

Suite à la sécrétion et à l'activation d'enzymes protéolytiques, comme l'activateur du plasminogène (uPa) et des métalloprotéases (MMPs ; Freedman and Isner, 2001) par les cellules endothéliales et les cellules lymphoïdes, il y a dégradation de la matrice

extracellulaire, ce qui perturbe les jonctions serrées, adhérentes et gap qui existent entre les cellules endothéliales et les cellules périvasculaires, permettant à ces dernières de se détacher (Lakka et al., 2003).

#### **A.4.3.1.3. Prolifération et Migration des cellules endothéliales :**

Suite à la digestion de la matrice extracellulaire, l'Ang-2 va participer au détachement des cellules musculaires lisses de la paroi de la structure tubulaire endothéliale et faciliter la migration des cellules endothéliales. Plusieurs molécules sont impliquées dans ce processus, dont le FGF, qui augmente la motilité et la prolifération des cellules endothéliales ainsi que l'activité des protéases (Griffioen and Molema, 2000), et favorise la production du VEGF (Ucuzian et al., 2010). Ce dernier augmente aussi la prolifération des cellules endothéliales en partie via l'activation MAPK (« Mitogen-Activated Protein Kinases ») en se fixant sur son récepteur VEGFR2 (Griffioen and Molema, 2000) ; et agit sur la migration cellulaire en augmentant l'expression des intégrines, de la collagénase interstitielle et du uPA (Ucuzian et al., 2010). Le TGF- $\beta$  augmente à son tour la prolifération et la migration des cellules endothéliales (Ucuzian et al., 2010). D'autres facteurs tels que l'angiogénine, l'EGF (« Epidermal Growth Factor »), et l'IGF-1 sont aussi impliqués (Serini et al., 2006). La migration des cellules endothéliales est permise grâce à l'expression de nombreuses intégrines ; l'intégrine  $\alpha\beta3$  est augmentée sur les cellules endothéliales activées et permet leur adhésion à la vitronectine, au fibrinogène, à la laminine, au collagène, au facteur von Willebrand et à l'OPN (Griffioen and Molema, 2000). Ainsi, les cellules endothéliales migrent à travers la MEC vers la source angiogénique en formant un capillaire encore dépourvu de cellules péri-vasculaires.

#### **A.4.3.1.4. Formation de la lumière vasculaire et des tubules et maturation des néovaisseaux :**

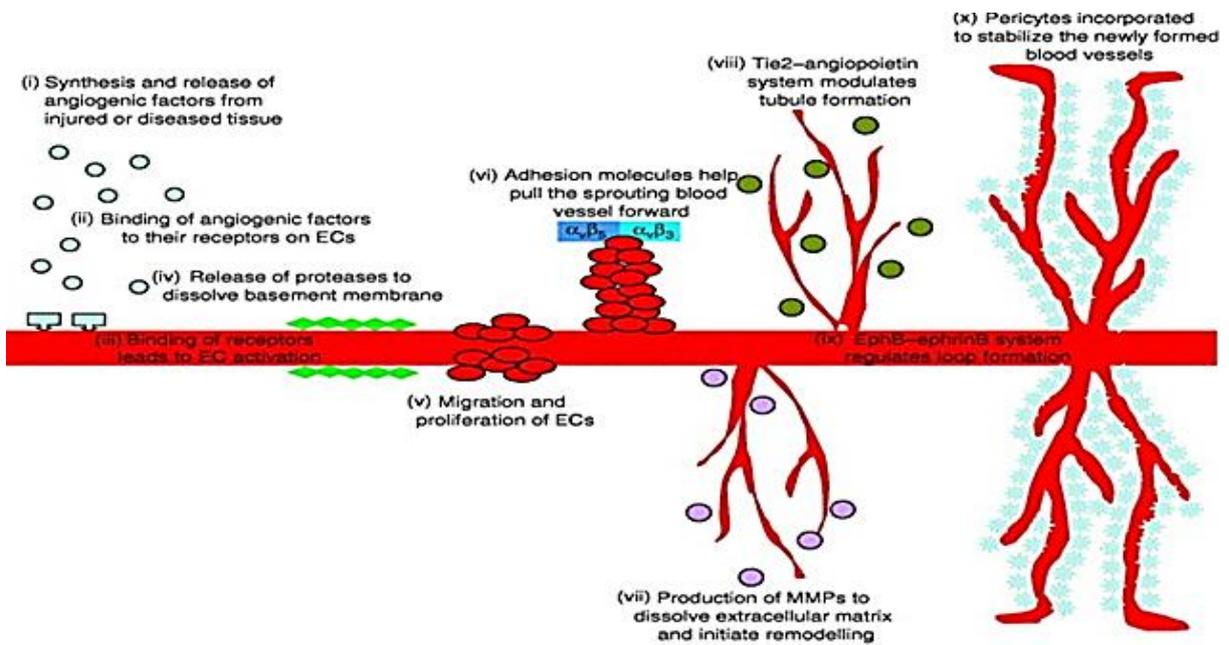
Au sein des cellules endothéliales migrantes, on observe une augmentation des transcrits de la fibronectine, du récepteur EDG-1 (« Endothelial Differentiation Gene-1 »), de Jagged (ligand du récepteur Notch), et d'EDF-1 (« Endothelial Differentiation related Factor-1 »), une protéine liant la calmoduline qui agit aussi comme un co-activateur de la transcription. Une fois ce programme génétique de maturation, activé les cellules endothéliales s'alignent, s'organisent, forment des tiges et des structures de vaisseaux en réseau (Mariotti and Maier, 2006). La polarisation des cellules endothéliales est essentielle pour la formation de la lumière vasculaire, leur surface apicale sera le site du développement de la lumière, leur surface basale permettra l'interaction des vaisseaux sanguins avec la matrice extracellulaire et les

cellules murales (Zeeb et al., 2010). Une des principales molécules impliquée dans la polarisation cellulaire est la VE-cadhérine, qui est localisée au début de la formation de la lumière vasculaire, sur toute la surface de contact entre deux cellules. Par la suite, cette molécule d'adhésion se retrouve à des positions latérales voisines des cellules endothéliales, sur le côté apical ou celui de la lumière des membranes plasmiques (Zeeb et al., 2010).

Une autre molécule d'adhésion importante durant les premiers stades de formation vasculaire est PECAM (« Patelet Endothelial Cell Adhesion Molecule »), qui contribue au maintien de l'intégrité de la barrière endothéliale et régule la perméabilité vasculaire (Mariotti and Maier, 2006).

Le VEGF-A induirait un changement dans la morphologie des cellules endothéliales polarisées pour entraîner la formation de la lumière extracellulaire, il se lie à son récepteur VEGFR2 qui active ROCK 1 et 2 (« Rho-associated Kinase »). ROCK est important pour le réarrangement du cytosquelette (Zeeb et al., 2010).

Suite à la formation de la lumière vasculaire, les nouveaux vaisseaux entament une phase de maturation qui nécessite le recrutement des péricytes, cellules murales des capillaires, par différenciation de précurseurs au sein des cellules mésenchymateuses. Le PDGF- $\beta$ , un facteur chimio-attractant impliqué dans le recrutement des péricytes, est synthétisé par les cellules endothéliales (Griffioen and Molema, 2000). D'autres facteurs sont impliqués dans ce processus, comme le TGF- $\beta$ 1, le VEGF et le NO.



**Figure 15: Les dix principales étapes cellulaires et moléculaires de l'angiogenèse (Wong et al., 2006)**

Par la suite, les péricytes recrutés vont entourer le vaisseau en formation et limiter la prolifération des cellules endothéliales qui entreront dans une phase de quiescence cellulaire, sous l'action du TGF- $\beta$ 1 (Lebrin et al., 2005). Les péricytes en contact avec les cellules endothéliales produisent aussi des facteurs de survie comme le VEGF et Ang1. Ang1, en se fixant sur son récepteur Tie2 active la voie de signalisation AKT qui inhibe l'apoptose (Mariotti and Maier, 2006). Le complexe formé par VEGF-VEGFR-VE-cadhérine sur la cellule endothéliale active la voie de signalisation PI3K-AKT (Mariotti and Maier, 2006). Cette voie augmente Bcl2 (« B-cell lymphoma 2 »), une protéine anti-apoptotique. Le VEGF (isoformes 165 et 121) et l'Ang1 sont aussi impliqués dans l'augmentation du diamètre des vaisseaux.

La pression sanguine et les forces de cisaillement sont impliquées dans la phase de maturation des vaisseaux, en induisant l'expression de plusieurs gènes par les cellules endothéliales et mésenchymateuses comme c-Fos, Egr-1 (« Early growth response protein-1 »), ACE (« Angiotensin-Converting Enzyme »), eNOS, PDGF-A et B, TGF- $\beta$  et les intégrines, et en inhibant le TNF- $\alpha$ , un facteur pro-apoptotique, et en diminuant le renouvellement des cellules endothéliales (Mariotti and Maier, 2006). Tous les facteurs énumérés sont nécessaires à la stabilisation et la maturation des vaisseaux sanguins.

### A.4.3.2. Rôle des SIBLING dans la vascularisation :

Alors que l'OPN est la protéine SIBLING la mieux étudiée, les études sur les autres protéines connaissent un regain d'intérêt, surtout après la mise en évidence de leur localisation ectopique en dehors des tissus minéralisés et leur rôle essentiel dans la vascularisation des processus tumoraux malins. L'objet de cette partie est de décrire les propriétés et les implications des SIBLING lors de la formation physiologique des vaisseaux sanguins.

#### A.4.3.2.1. DMP1 :

Très peu de travaux ont étudié l'effet de DMP1 sur l'angiogénèse. Une récente étude vient cependant de démontrer qu'elle aurait une activité anti-angiogénique, ce qui lui confère une propriété insoupçonnée qui pourrait être utilisée pour le développement de nouveaux traitements contre le cancer, mais aussi contre les maladies dans lesquelles l'angiogénèse joue un rôle majeur, comme le psoriasis, la polyarthrite rhumatoïde ou la rétinopathie diabétique.

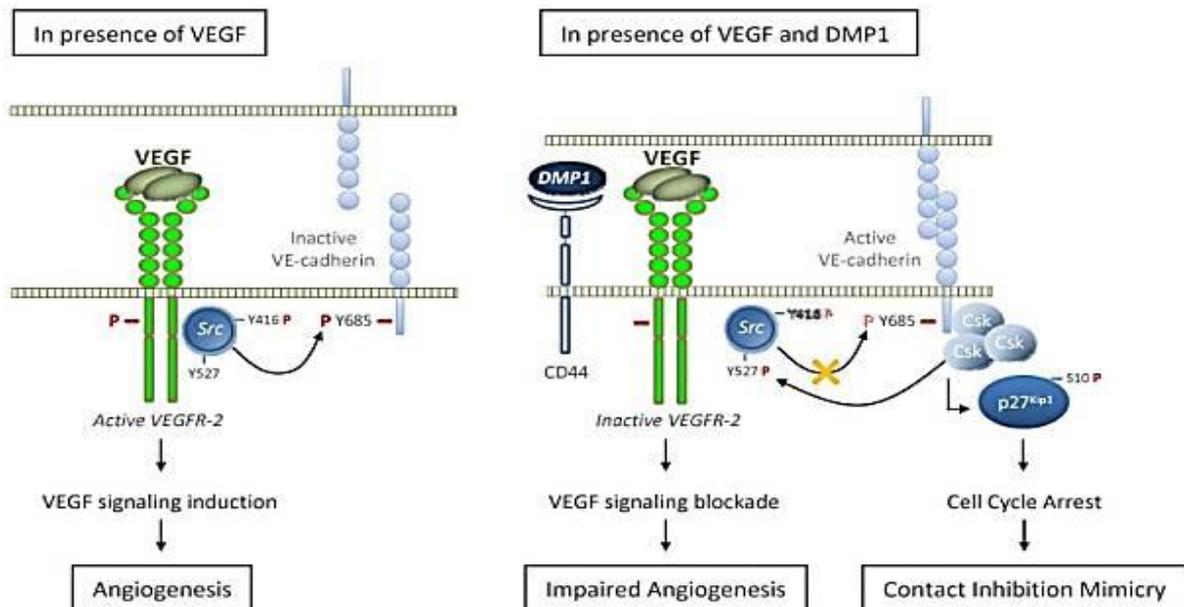
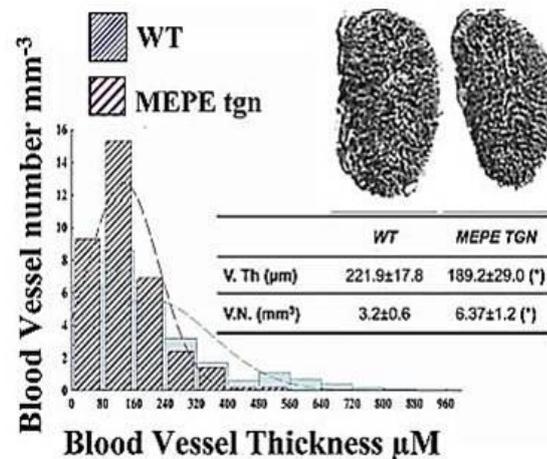


Figure 16: Rôle de la DMP1 dans le blocage de la signalisation du VEGF. En présence du VEGF, le récepteur VEGFR-2 est activé (phosphorylé : P rouge). Ensuite, Src est phosphorylé à son tour sur la Tyr416, et déphosphorylé sur la Tyr527, ce qui induit son activation. Src active va inactiver la VE-Cadhérine via la phosphorylation de son domaine tyrosine intracytoplasmique, en particulier la Tyr 685. En présence du VEGF et de la DMP1 liée à CD44, l'expression de la VE-Cadhérine est augmentée, ce qui induit d'une part l'expression de p27<sup>Kip1</sup> et ainsi l'arrêt du cycle cellulaire et de la croissance, imitant le phénomène d'inhibition de contact. D'autre part la VE-cadhérine va séquestrer le récepteur VEGFR-2 et empêche ainsi son activation, en inhibant sa phosphorylation. Un prétraitement avec la DMP1 altère partiellement la phosphorylation de la VE-cadhérine sur sa Tyr685 (Trait rouge), permettant le recrutement des Csk. Le VEGFR-2 inactivé par la DMP1 n'est plus capable de phosphoryler Src au niveau de sa Tyr 416, cependant Src est phosphorylé au niveau de sa Tyr527 par Csk, dont l'expression est induite en présence de DMP1 (Pirotte et al., 2011).

L'effet antiangiogénique de la DMP1 passe par l'augmentation de l'expression de la VE-Cadhérine. La VE-Cadhérine induit d'une part l'expression de  $p27^{kip1}$ , qui entraîne l'arrêt de la croissance et du cycle cellulaire et va séquestrer d'autre part le récepteur VEGFR2 et ainsi empêcher son activation (Pirotte et al., 2011; Figure 16).

#### A.4.3.2.2. MEPE :

MEPE est exprimée dans les conditions physiologiques dans le tissu osseux et les reins, entre autres sites (Ogbureke and Fisher, 2005; Addison et al., 2008). Une étude (David et al., 2009) a établi que la surexpression de MEPE (souris MEPE TGN) induit une angiogenèse accrue dans l'os et dans le rein, en stimulant l'expression du VEGF (Figure 17). Une augmentation de l'excrétion urinaire de l'aldostérone a été observée également chez ces souris. Celle-ci augmente la néovascularisation en activant la voie angiotensine-II, qui induit l'augmentation de l'expression du VEGF (Schiffrin, 2006). D'autres études seront nécessaires pour confirmer l'effet angiogénique de MEPE.



**Figure 17: Analyse des images 3D obtenues par microtomographie du réseau vasculaire rénal. Augmentation du nombre de petits vaisseaux sanguins dans le rein lors de la surexpression de MEPE (David et al., 2009)**

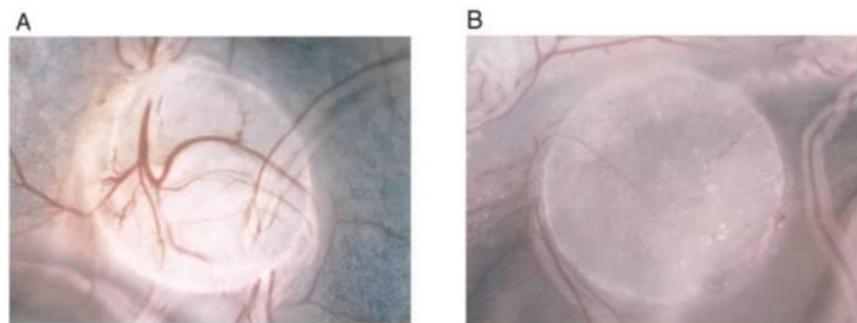
#### A.4.3.2.3. DSPP :

L'accumulation des données commencent à impliquer la DSPP dans des étapes spécifiques de progression tumorale (croissance, adhésion et métastases). Ogbureke et al ont montré dans une étude l'augmentation de l'expression de la BSP, DSPP et OPN dans les carcinomes épidermoïdes humains de la cavité buccale (Ogbureke et al., 2007) et dans certaines dysplasies épithéliales humaines de la cavité buccale (Ogbureke et al., 2010). L'extinction de l'expression de DSPP *in vitro* dans une lignée cellulaire du cancer de la bouche, OSC2, est associée à une altération significative des caractéristiques tumorigènes de cette lignée et entraîne la diminution de l'expression des protéines clés impliquées dans la prolifération et la progression des cellules tumorales (KI67, MMP-2, MMP-3, MMP9, P53) mais aussi de l'angiogenèse (VEGF ; (Joshi et al., 2010). *In vivo*, l'extinction de l'expression de la DSPP montre une tendance à la réduction des tumeurs, qui reste à confirmer, car l'étude n'a porté

que sur deux souris (Joshi et al., 2010). Dans une autre étude, la coculture de cellules souches de la pulpe dentaire (DPSC) et de cellules endothéliales (HUVEC) a induit une différenciation ostéo/odontogénique avec une forte expression de DSPP. L'ajout des cellules DPSC a entraîné une stabilisation du réseau vasculaire formé par les cellules endothéliales sur un matrigel (Dissanayaka et al., 2012). Ensemble, ces études suggèrent un potentiel angiogénique pour la DSPP et son implication dans la physiopathologie des cancers de la cavité buccale.

#### A.4.3.2.4. OPN :

La paroi des vaisseaux sanguins est composée de cellules musculaires lisses qui expriment l'OPN. Il a été démontré que l'OPN augmenterait leur prolifération, leur adhésion, ainsi que leur chimiotactisme (Gadeau et al., 1993; Liaw et al., 1994). Ces effets semblent être médiés par l'intégrine  $\alpha\beta3$  (Yue et al., 1994; Liaw et al., 1995). L'OPN joue également un rôle dans l'angiogenèse et les réparations des lésions vasculaires en inhibant l'apoptose des cellules endothéliales (Scatena et al., 1998; Khan et al., 2002), en leur conférant une cytoprotection via l'activation de la voie PI3K/AKT, ce qui induit l'augmentation de Bcl-xL ("B-cell lymphoma-extra large") et l'activation de la voie NF- $\kappa$ B (« Nuclear Factor-kappa B » ; Dai et al., 2009). L'OPN augmente aussi l'expression du VEGF et l'activation du récepteur KDR par la phosphorylation de AKT et ERK (« Extracellular signal-Regulated Kinase » ; Dai et al., 2009). En coopération avec le VEGF, l'OPN stimule l'adhérence et la migration des cellules endothéliales ; cette stimulation est augmentée avec l'activation du site de clivage de l'OPN par la thrombine (Senger et al., 1996). De même le peptide SVVYGLR, dérivé de l'OPN, augmente non seulement la migration et l'activité des cellules endothéliales, mais il stimule la formation de tube en trois dimensions sur un gel de collagène (Hamada et al., 2003).



**Figure 18: Effet de l'absence de l'ostéopontine sur la vascularisation (A : disque et hôte WT, B : disque et hôte : KO) (Asou et al., 2001)**

Une étude *in vivo*, qui consistait à implanter des disques osseux en intra-musculaire dans des souris OPN<sup>-/-</sup>, a montré une vascularisation réduite des disques osseux, entraînant une diminution de l'accumulation des ostéoclastes et ainsi de leur résorption (Asou et al., 2001, Figure 18). Dans un autre modèle, l'augmentation de l'expression de l'OPN par le FGF2 stimule l'angiogenèse de la membrane chorio-allantoïde, en induisant le recrutement des monocytes proangiogéniques (Leali et al., 2003). Les effets angiogéniques de l'OPN, ont été également établis dans la croissance des tumeurs. En effet, l'implantation chez des souris de cellules murines de neublastome transfectées avec un vecteur d'expression de l'OPN, montre une augmentation de la néovascularisation de la tumeur par rapport aux cellules non transfectées (Takahashi et al., 2002; Hirama et al., 2003).

#### **A.4.3.2.5. BSP :**

Plusieurs études ont démontré le rôle primordial des intégrines  $\alpha\beta3$  et  $\alpha\beta5$ , récepteurs présents sur la surface des cellules endothéliales dans l'angiogenèse (Brooks, 1996). L'expression du récepteur  $\alpha\beta3$ , absent dans les vaisseaux sanguins quiescents, est augmentée durant l'angiogenèse (Brooks et al., 1994). Le VEGF augmente l'adhésion et la migration cellulaires et active le récepteur  $\alpha\beta3$  ainsi que d'autres intégrines impliquées dans l'angiogenèse (Byzova et al., 2000). Il est connu que la BSP est un ligand pour le récepteur  $\alpha\beta3$ . Une étude a montré que le PDGF-BB, un facteur qui induit la prolifération des cellules endothéliales et la formation des tubes durant l'angiogenèse *in vitro* via son récepteur  $\beta$  (Battegay et al., 1994), augmente la transcription de la BSP humaine (Mezawa et al., 2009), montrant ainsi un lien possible entre la BSP et l'angiogenèse. Dans l'une des rares études sur le sujet, l'équipe de A. Bellahcène a démontré que la migration et l'adhésion des cellules HUVEC *in vitro* est dépendante de l'interaction du récepteur  $\alpha\beta3$  des cellules endothéliales avec le motif RGD de la BSP (Bellahcène et al., 2000). La BSP stimule ainsi la réponse angiogénique d'une manière comparable à celle obtenue avec bFGF, un inducteur puissant de l'angiogenèse, dans le modèle de membrane chorio-allantoïde (Bellahcène et al., 2000).

---

---

**Les protéines composantes de la famille des SIBLING jouent un rôle crucial dans le développement de l'os, ainsi que dans son remodelage par leurs actions sur les cellules osseuses. Par ailleurs, ces protéines sont très impliquées dans les processus d'angiogenèse durant le développement ou lors du remodelage vasculaire.**

---

---

## **B. L'hormone parathyroïdienne (PTH) : action sur la physiologie osseuse**

### **B.1. Régulation de l'homéostasie osseuse :**

Le squelette mature est un organe métaboliquement actif qui subit un remodelage continu par un procédé remplaçant l'os ancien par de l'os nouveau. Ce remodelage osseux est nécessaire pour maintenir l'intégrité de la structure du squelette et pour accomplir ses fonctions métaboliques de réserve de calcium et de phosphore. Cette double fonction est souvent perturbée dans des conditions de variation des contraintes mécaniques ou dans le cas d'un stress nutritionnel et métabolique. Les ostéoblastes qui assurent la formation osseuse proviennent des cellules souches mésenchymateuses qui ensuite se différencient en ostéoblastes matures. Les ostéoclastes qui sont responsables de la résorption osseuse proviennent de cellules souches hématopoïétiques.

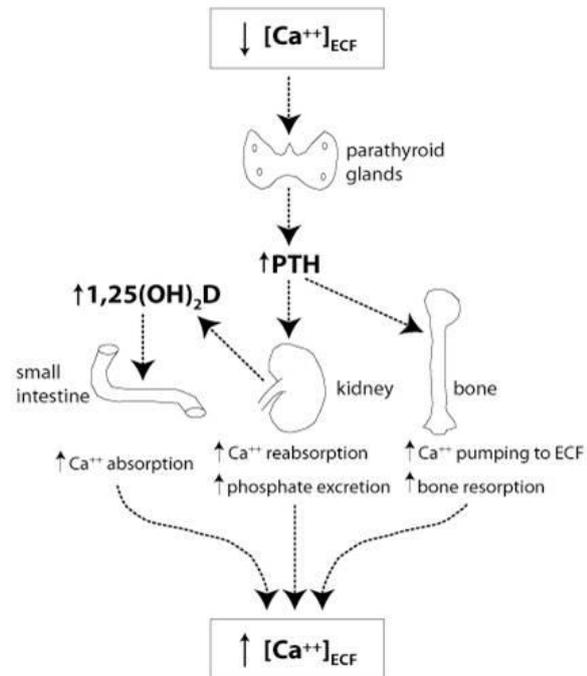
La formation osseuse et la résorption sont généralement équilibrées, entraînant le maintien d'un niveau constant de la masse osseuse. Ce cycle de remodelage est finement régulé par une variété de facteurs systémiques et locaux tels que : la vitamine D active ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ou calcitriol), les œstrogènes, des facteurs de croissance et des cytokines, mais aussi bien sûr l'hormone parathyroïdienne ou PTH.

Nous allons nous concentrer dans ce qui suit sur l'effet de la PTH sur l'homéostasie phosphocalcique et le maintien de la masse osseuse, et son action sur les différentes SIBLING.

#### **B.1.1. La PTH et la régulation de l'homéostasie calcique :**

La PTH est un polypeptide de 84 acides aminés et d'une masse moléculaire de 95 kDa qui est synthétisée par les cellules principales des glandes parathyroïdes. Le gène de la PTH est situé sur le chromosome 11 et code pour une protéine de 115 aa, la prépro-PTH, qui après hydrolyses successives donne naissance à la pro-PTH (90 aa) puis à la PTH active formée de 84 acides aminés.

Par le passé, la définition du rôle physiologique de la PTH a été le maintien constant de la calcémie (taux de calcium ionisé sanguin), sans pour autant contrôler la phosphatémie. Le mode d'action de la PTH et sa sécrétion dépendent de l'activation d'un récepteur de calcium (CaSR : « Calcium Sensing Receptor ») exprimé à la surface des cellules parathyroïdiennes (Tfelt-Hansen and Brown, 2005). Lors d'une hypocalcémie, la PTH agit en quelques minutes en stimulant dans le rein la réabsorption du calcium au niveau du tubule rénal, et l'excrétion du phosphore. La PTH augmente de plus la libération de calcium et de phosphate à partir de l'os en une à deux heures (Gennero et al., 2004). Dans le cas d'une hypocalcémie prolongée, la PTH active la  $1\alpha$ -hydroxylase augmentant ainsi la production du calcitriol. Ce dernier va induire l'augmentation de l'absorption du calcium au niveau de l'intestin grêle. Toutes ces réponses sont médiées par le récepteur 1 de la PTH, le PTHR1 (« parathyroid hormone 1 receptor »), qui est couplé à une protéine G. PTHR1 lie également le PTHrP (« Parathyroid-hormone-related peptide ») avec une affinité similaire à celle de la PTH.



**Figure 19: Schéma illustrant l'homéostasie calcique. (ECF : fluide extracellulaire)**  
<http://courses.washington.edu/conj/bess/calcium/calcium.html>

Sur le plan osseux, l'effet initial (survenant en quelques minutes) de la PTH sur l'os est de stimuler via les ostéoblastes le relargage rapide d'un pool de  $Ca^{2+}$  localisé dans la matrice près de la surface osseuse et disponible pour assurer des échanges rapides avec le fluide extracellulaire (ECF ; Figure 19).

A plus long terme, la stimulation des ostéoblastes qui expriment le récepteur PTHR1 par la PTH, va activer l'activité des ostéoclastes présents et la différenciation des précurseurs ostéoclastiques. Le couplage entre les ostéoblastes et les ostéoclastes dépend, de la modification de synthèse et de production de protéines produites par les ostéoblastes et induites par la PTH, principalement le facteur RANKL.

### **B.1.2. La PTH et la régulation de l'homéostasie du phosphate :**

Le phosphate est apporté à l'organisme par le contenu alimentaire et il est uniquement absorbé au niveau de l'intestin. Son transport s'effectue par un double mécanisme : un transport paracellulaire non régulé dépendant du gradient de concentration entre le liquide interstitiel et la lumière intestinale, et un transport transcellulaire régulé par un système de co-transport Sodium-Phosphate (Npt2b), exprimé dans la membrane apicale des entérocytes. Une fois dans la circulation, le phosphate parvient à différents tissus dont l'os, en partie grâce à l'activité du co-transporteur Sodium-Phosphate III (Forster et al., 2006a; Werner and Kinne, 2001). Le phosphate est filtré par le glomérule rénal et réabsorbé dans le tubule proximal par le co-transporteur sodium-phosphate de type Iia (Forster et al., 2006b).

De nombreux facteurs modulent la complexe régulation du phosphate, en particulier l'action de la PTH et de la vitamine D. A côté de son rôle de « calostat » (stabilisateur du taux calcium circulant), la PTH est en effet impliquée, dans la régulation du phosphate (Figure 20), élément nécessaire à la minéralisation matricielle. Dans le tubule rénal proximal, la PTH se fixe sur le PTHR1 exprimé par la membrane basolatérale et apicale, et y active respectivement les deux voies de signalisation G $\alpha$ /PKA et Gq/PLC/PKC. L'activation de ces deux voies conduit à l'internalisation des cotransporteurs du sodium-phosphate NaPi-IIa et NaPi-IIc, augmentant l'excrétion du phosphate rénal et générant une hypophosphatémie (Forster et al., 2006b). A côté de l'augmentation sérique du taux de calcium, la PTH induit donc une diminution de la concentration sérique en phosphore.

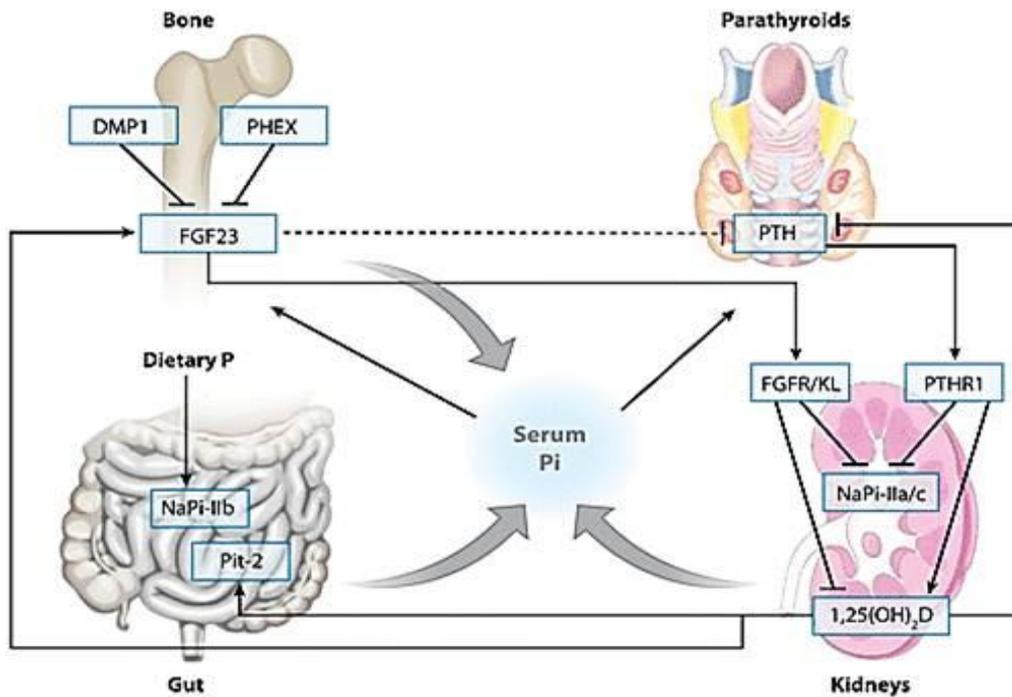


Figure 20: Régulation de l'homéostasie du phosphate. Le phosphate est apporté par l'alimentation, absorbé au niveau des intestins, stocké dans le squelette et excrété par les reins. La vitamine D active  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  stimule l'absorption du phosphate à partir de l'alimentation. Le FGF23 augmente la clairance rénale du phosphate et inhibe la synthèse de la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  (vitamine D) et peut diminuer la synthèse de la PTH. La PTH augmente la clairance rénale du phosphate et stimule la synthèse de la vitamine D (Juppner et al., 2010)

Pour résumer la régulation complexe du phosphate, la synthèse et la sécrétion de la PTH, sont augmentées par des faibles taux de Ca sérique et une augmentation sérique des niveaux de Phosphate. La PTH inhibe donc la réabsorption rénale du phosphate et stimule la synthèse de la vitamine D et du FGF23, qui à leur tour inhibent la synthèse de la PTH. Le FGF23 inhibe par l'intermédiaire d'un ou de plusieurs récepteurs de FGF, avec Klotho en tant que co-récepteur, la réabsorption rénale du phosphate, et diminue les niveaux circulants de la vitamine D. L'expression du FGF23 est inhibée par PHEX et DMP1 qui sont induits par la PTH (Martin et al., 2012; Figure 21). La diminution du niveau de vitamine D par le FGF23 peut entraîner une hypocalcémie. Enfin l'hyperphosphatémie résultante stimule la PTH et le FGF23 qui augmentent l'excrétion urinaire du phosphate.

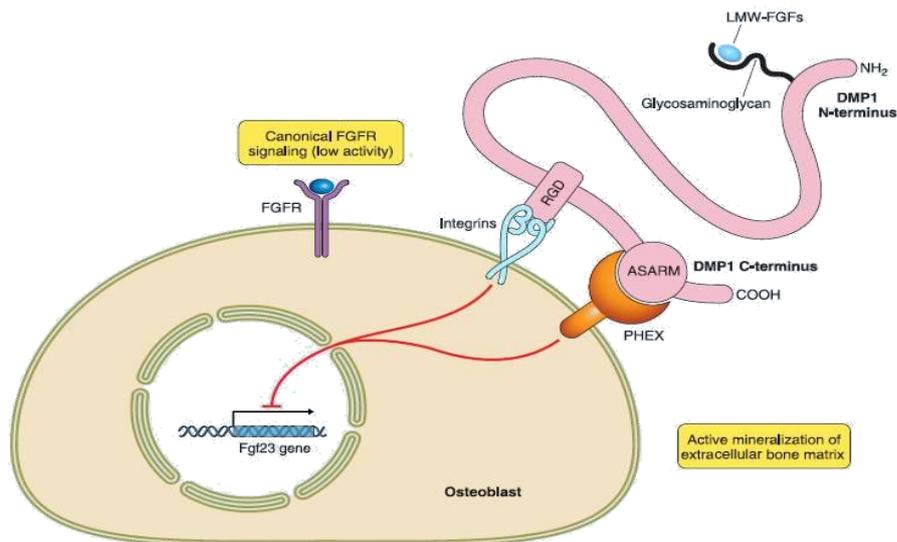


Figure 21: Schéma illustrant l'hypothèse d'interaction DMP1 et PHEX dans la régulation de FGF23 et la minéralisation osseuse. Dans les conditions physiologiques, DMP1 se lie à PHEX par son domaine C-terminal et aux intégrines par son domaine RGD, conduisant à l'inhibition de la transcription du FGF23 et l'augmentation de sa dégradation (Martin et al., 2012)

## B.2. Régulation du métabolisme osseux par la PTH :

Les régulations de l'homéostasie phospho-calcique par la PTH et son action sur le tissu osseux suggèrent que cette hormone possède des effets sur les cellules osseuses. L'effet anabolique (augmentation nette de la quantité d'os) de la PTH suite à une administration intermittente est clairement établi. Ceci contraste bien sûr avec les cas sévères d'hyperparathyroïdie, car l'exposition continue à la PTH induit une perte osseuse. Alors même qu'aujourd'hui la PTH en traitement intermittent (iPTH) est approuvée comme traitement de l'ostéoporose, il reste à déterminer les mécanismes exacts par lesquels elle exerce ses effets anaboliques et à expliquer son effet catabolique dont le mécanisme est inconnu jusqu'à présent.

D'après les travaux récents de Jilka (Jilka, 2007), la iPTH inhibe l'apoptose des ostéoblastes de l'os trabéculaire, entraînant une augmentation de leur nombre et ainsi de la formation osseuse (Figure 22).

Dans des études *in vitro* de cultures de cellules ostéoblastiques, la iPTH active rapidement les voies de signalisation anti-apoptotique, qui impliquent l'activation de l'AMPc (« Adénosine Monophosphate Cyclique ») médiée par la phosphorylation de la PKA, entraînant l'inactivation de la protéine proapoptotique BAD (« BCL2-antagonist of cell death »), ainsi que l'augmentation de l'expression du gène de survie BCL-2 (Bellido et al., 2003; Figure 22).

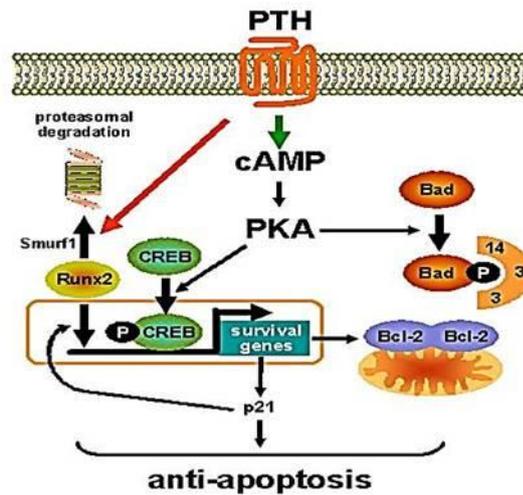
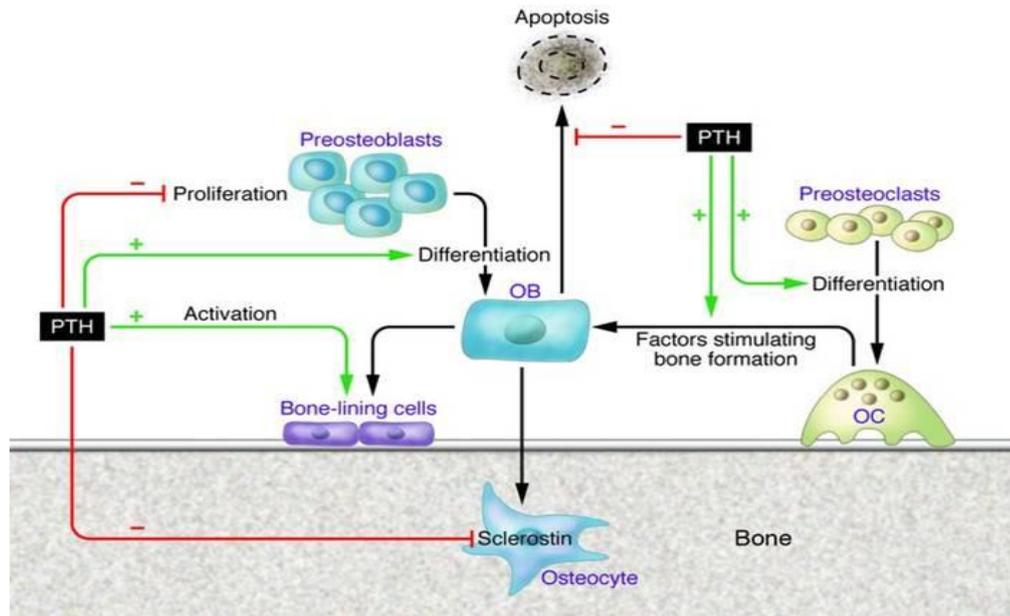


Figure 22: Mécanismes de la stimulation de la survie ostéoblastique par la PTH (Jilka, 2007)

La PTH augmente d'une manière transitoire le niveau d'expression de Runx2 dans les ostéoblastes et semble diminuer leur prolifération tout en augmentant leur différenciation (Qin et al., 2005). Ces effets pourraient être dus à la diminution de l'expression de la cycline D1, nécessaire pour la progression du cycle cellulaire, associée à l'augmentation des inhibiteurs de CDK (cyclin-dependent kinase ; (Qin et al., 2005; Datta et al., 2005).

Le contrôle de la formation osseuse nécessite la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine (combinaison de *Wingless*, un gène de la drosophile et *Int*, son homologue humain ; Krishnan et al., 2006). Wnt se lie au récepteur transmembranaire *Frizzled* associé à un co-récepteur LRP5/6 (« LDL-receptor-related protein 5/6 »), ce qui induit le recrutement d'un complexe de protéines formé par l'axine, Dishevelled et Frat-1 permettant ainsi l'inhibition de la GSK3, ce qui bloque la phosphorylation de la  $\beta$ -caténine qui l'adresse au protéasome. La  $\beta$ -caténine va alors être transloquée dans le noyau et son interaction avec les facteurs de transcription TCF/LEF activera les promoteurs des gènes cibles. Les effets anaboliques de la PTH pourraient être induits en partie par cette voie de signalisation.



**Figure 23: Schéma représentatif des cibles cellulaires potentielles de la PTH pour observer un effet anabolique. La PTH agit sur différents types cellulaires, en effet elle diminue l'apoptose et la prolifération des ostéoblastes (OB) mais augmente leur différenciation. Elle peut induire l'activation des cellules bordantes et leur différenciation en ostéoblastes fonctionnels et diminuer l'expression de la sclérostine, inhibiteur de la minéralisation, par les ostéocytes, activant ainsi la voie de signalisation Wnt. Enfin la PTH stimule la différenciation des ostéoclastes (OC), et active la production de facteurs ostéoclastiques qui stimulent à leur tour la formation osseuse (Oursler et al., 2008)**

Trois études indépendantes effectuées sur des souris déficientes en LRP5, ont démontré que l'augmentation de la masse corticale fémorale par la PTH ne nécessite pas la voie Wnt (Sawakami et al., 2006; Iwaniec et al., 2007). Toutefois, cette voie pourrait être impliquée dans la réponse anabolique à la PTH dans l'os trabéculaire (Iwaniec et al., 2007). Par ailleurs, un traitement intermittent à la PTH des souris déficientes en Sfrp-1 (« Secreted frizzled-related protein 1 »), un autre antagoniste de la voie Wnt, n'induit pas un effet anabolique de la PTH (Bodine et al., 2007), démontrant ainsi une interaction de ces deux facteurs dans la modulation de la formation osseuse. D'autres effets de la PTH sur les ostéoblastes sont dus à la production accrue d'IGF-1 et de FGF-2 (Bikle et al., 2002; Hurley et al., 1999).

Si la PTH induit la différenciation des ostéoblastes, elle ne semble pas agir ni sur la différenciation, ni sur la prolifération des cellules ostéoprogénitrices (Jilka et al., 1999), en effet ces cellules n'exprimeront le récepteur à la PTH qu'après leur différenciation en ostéoblastes (Gronthos et al., 1999). Cette hormone peut activer les cellules bordantes

(Dobnig and Turner, 1995, Murrills, 2006 ; Figure 24), ce qui pourrait expliquer l'accélération de la formation osseuse induite par la PTH. Les cellules bordantes sont alignées à la surface de l'os et maintenues en état inactif sous l'effet de la sclérostine (Sost; van Bezooijen et al., 2005) qui est sécrétée par les ostéocytes.

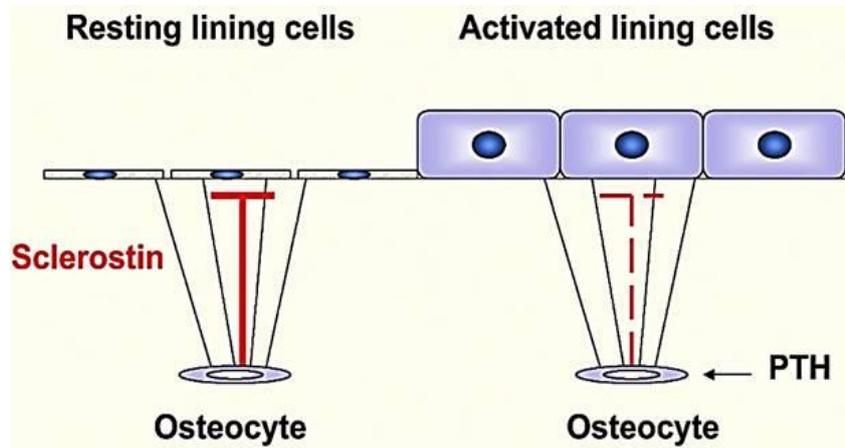
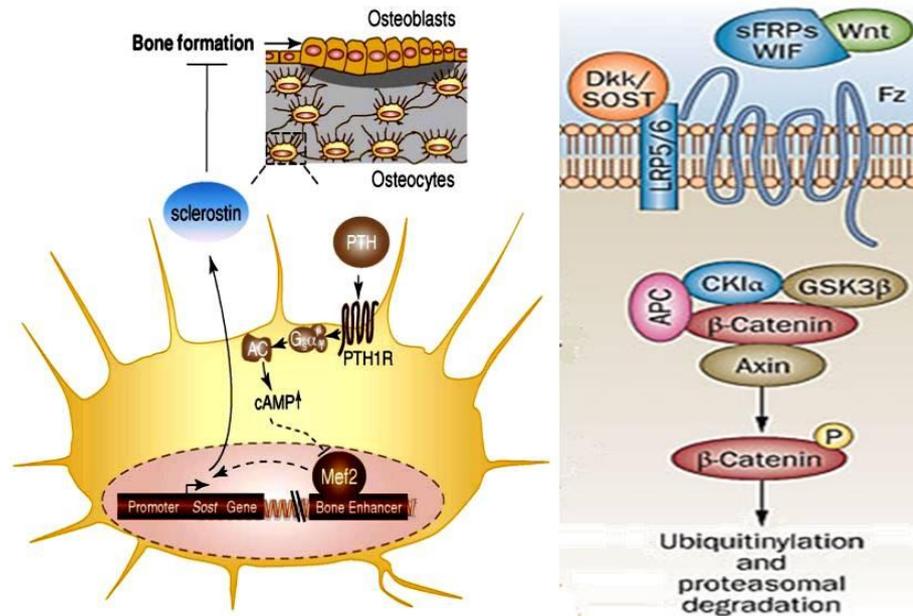


Figure 24: Schéma explicatif de l'activation des cellules bordantes sous l'action de la PTH (Murrills. 2006)

La PTH inhibe l'expression de Sost par ces cellules (Bellido et al., 2005; Keller and Kneissel, 2005; Silvestrini et al., 2007), laquelle inhibe à son tour la voie Wnt (Lories et al., 2013 ; Figure 24) et ainsi la formation osseuse. L'inhibition de l'expression de Sost est médiée par l'activation de la voie de signalisation de l'AMPc, qui induit une inhibition du facteur de transcription MEF2 (« Myocyte Enhancer Factor 2 » ; Kramer et al., 2010; Figure 25). L'inhibition par la PTH de la production de Sost lèverait l'inhibition de l'activité des cellules bordantes (Poole and Reeve, 2005; Figure 24).



**Figure 25: A gauche: Régulations de l'expression de la sclérostine ostéocytaire par la PTH. (Kramer et al., 2010). A droite: Sost inhibe la voie canonique de Wnt (Lories et al., 2013)**

Les effets de la PTH, sont multiples et nécessitent un contact direct entre plusieurs types de cellules osseuses spécialisées, dont les cellules de la lignée ostéoblastique, les cellules stromales de la moelle, les précurseurs hématopoïétiques des ostéoclastes et les ostéoclastes. Le traitement intermittent à la PTH entraîne une augmentation transitoire de l'activité de résorption des ostéoclastes, due à une augmentation de production de RANKL (Ma et al., 2001) et à une diminution de l'OPG (« Osteoprotegerin »). Ces régulations ont été démontrées dans le fémur et le tibia chez le rat (Ma et al., 2001), dans des cultures de cellules stromales (Fu et al., 2002) et de moelle osseuse (Lee and Lorenzo, 1999).

Les adipocytes sont des constituants du microenvironnement de la moelle osseuse. *In vitro*, le traitement des cellules souches mésenchymateuses humaines avec de la PTH pendant une heure par jour en présence d'un cocktail d'inducteur d'adipogénèse empêche la formation d'adipocytes (Rickard et al., 2006). La PTHrP, une hormone proche qui active aussi le PTH-R1, induit l'inhibition de PPAR $\gamma$  (« Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  ») en provoquant sa phosphorylation (Chan et al., 2001) via la voie AMPc/PKA (Rickard et al., 2006). *In vivo* chez des singes, l'effet anabolique de la PTH, a été associé à une réduction du nombre d'adipocytes dans la moelle osseuse (Sato et al., 2004).

### B.3. Action de la PTH sur les différentes SIBLING :

#### B.3.1. Sur MEPE et DMP1 :

Comme nous l'avons déjà dit, la DMP1 est exprimée par les ostéocytes, et localisée dans les structures canaliculaires de ces cellules. Comme on l'a vu, cette protéine est fortement impliquée dans la régulation de la minéralisation, ainsi que dans le métabolisme du phosphate systémique. L'effet de la PTH sur la DMP1 est très peu documenté. *In vitro*, le traitement des cellules humaines des papilles dentaires (HDCP) avec la PTH induit une augmentation de l'expression de DMP1, ce qui suggère qu'elle pourrait agir comme un médiateur de la différenciation des odontoblastes (Pang et al., 2003).

Dans la régulation de l'homéostasie du phosphate, la PTH stimule la DMP1 (McWay et al., 2012; Figure 26). Bellido et al ont montré que la PTH induisait des effets différents sur l'expression de DMP1 selon le mode d'administration. En effet l'iPTH augmente l'expression de DMP1, alors que la cPTH la diminue durant les premières heures de traitement (Bellido et al., 2005).

Aucune étude n'a traité de l'effet de la PTH sur l'expression de MEPE. Les taux circulants de MEPE sont corrélés à ceux du phosphate et de la PTH chez les humains normaux (Jain et al., 2004), tandis que MEPE est surexprimée dans les hypophosphatémies liées aux chromosomes X, caractérisées par des niveaux légèrement augmentés de PTH. Une étude du laboratoire (Wade-Gueye et al., 2010) a rapporté une augmentation de l'expression de MEPE et de DMP1 sous iPTH (1-34) chez des souris sauvages et BSP<sup>-/-</sup>, mais qui n'était statistiquement significative que pour DMP1 et chez les mutants.

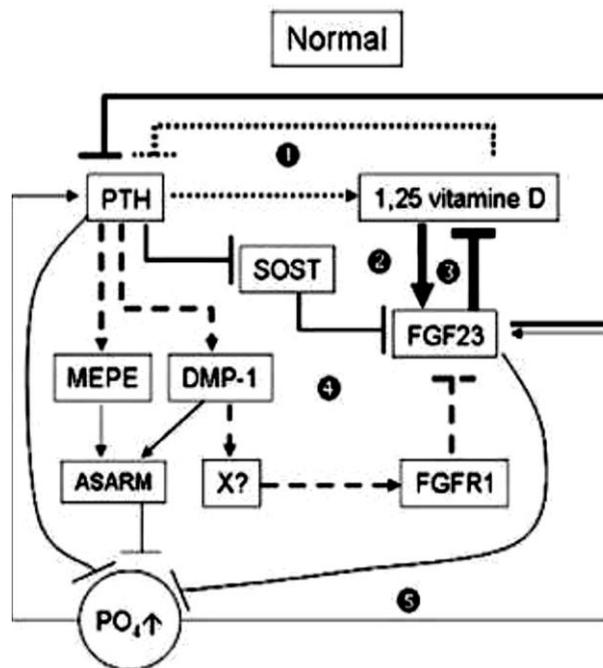


Figure 26: Régulation physiologique du phosphate et de la minéralisation osseuse (McWay et al., 2012)

### B.3.2. Sur la DSPP :

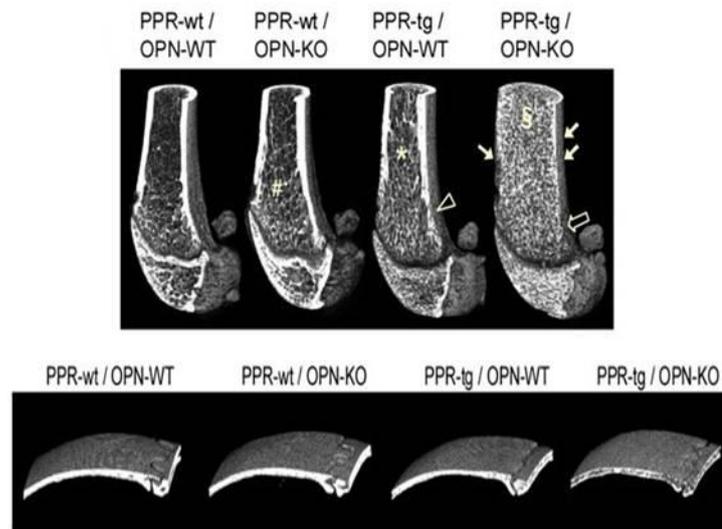
Bien qu'il soit bien établi que la PTH est impliquée dans le dépôt de matrice extracellulaire et dans le processus de biominéralisation, l'implication de cette hormone dans le contrôle de l'activité des cellules associées à la dent et le processus de formation de la dentine ne semble pas encore avoir été étudiée, en partie en raison de l'absence de modèles cellulaires appropriés *in vitro*. Il existe un travail récent qui traite du lien entre la PTH et les odontoblastes *in vitro*, mais aucune expression génique de DSPP n'a pu être détectée dans la lignée d'odontoblastes utilisée (MDPC-23 ; Guimarães et al., 2013).

### B.3.3. Sur l'OPN :

Les expériences d'ovariectomie ont montré que les souris déficientes en OPN sont résistantes à la perte osseuse induite par l'OVX ou la mise en décharge (Yoshitake et al., 1999; Ishijima et al., 2002). L'implantation d'os ectopique a indiqué que ces souris présentent une réduction de l'activité de résorption osseuse (Asou et al., 2001). La PTH est connue pour activer la formation et la résorption osseuse (Witty et al., 1996), et elle induit l'expression de l'OPN (Denhardt et Noda, 1998; Bilezikian et al., 2008). L'élégante étude d'Ihara et al. (Ihara et al., 2001) a montré que l'augmentation de résorption induite par la iPTH ne se produit pas en l'absence d'OPN, suggérant une anomalie dans la voie de signalisation RANKL, induite par la PTH, et responsable de l'augmentation du nombre et de l'activité des ostéoclastes. En ce qui concerne l'action anabolique de l'hormone, la iPTH, augmente la masse osseuse corticale et trabéculaire de souris OPN<sup>-/-</sup>, sans pour autant altérer les paramètres ostéoclastiques, contrairement aux souris sauvages (Kitahara et al., 2003). *In vitro*, l'absence d'OPN potentialise l'augmentation par l'iPTH de la formation de nodules de minéralisation dans des cultures de moelles osseuses (Kitahara et al., 2003). Cependant, dans d'autres études la PTH a eu un effet inhibiteur de l'expression de l'OPN dans une lignée clonale de cellules ostéoblastiques (RCA11), ainsi qu'une autre lignée de cellules d'ostéosarcomes chez le rat (ROS 17/2.8 ; Kasugai et al., 1991; Noda and Rodan, 1989), suggérant l'implication de l'AMPC. Les réponses à la iPTH des modèles ostéoblastiques *in vitro* sont dépendants du type cellulaire, des doses et surtout des fenêtres de traitement choisies.

Par ailleurs, l'OPN jouerait également un rôle dans la signalisation par la PTH. En effet, il a été rapporté que les souris PPR-TG, dans lesquelles le récepteur PTHR1 est constitutivement actif spécifiquement dans les ostéoblastes, présentent une masse osseuse élevée et une coloration intense pour l'OPN au niveau trabéculaire (Stier et al., 2005). Ces souris transgéniques ont été croisées avec des souris déficientes en OPN. Les souris PPR-TG/OPN-

KO, qui n'expriment pas l'OPN, présentent une augmentation spectaculaire de la quantité d'os trabéculaire par rapport aux PPR-TG (Ono et al., 2008; Figure 26). Cette augmentation n'est pas exclusive du squelette appendiculaire, la calotte cranio-faciale ainsi que les vertèbres présentent les mêmes caractéristiques phénotypiques que le fémur (Figure 27). Les auteurs de cette étude ont conclu que l'OPN a une action suppressive de la signalisation de la PTH sur les ostéoblastes (Ono et al., 2008).



**Figure 27: Images en trois dimensions obtenues en micro-CT, de la partie distale du fémur et du calvarium (ono et al., 2008)**

L'OPN est aussi exprimée dans le rein, où son expression est augmentée par la présence de niveau élevé de phosphate dans le milieu (Beck et al., 2000). Le rôle de l'OPN a été étudié dans un modèle de perte osseuse induite par un taux élevé de phosphate, associé à une hyperparathyroïdie secondaire. L'absence d'OPN a bloqué la perte osseuse observée chez les souris sauvages du fait de taux élevés de PTH, tandis que l'homéostasie du calcium et du phosphate était maintenue (Koyama et al., 2006).

Enfin dans une étude clinique faite sur une cohorte de femmes présentant une ménopause sévère, soumises à un traitement intermittent par le teriparatide (hPTH1-34), la diminution du taux d'OPN plasmatique était concomitante de l'amélioration de la densité minérale osseuse après le traitement. La réduction de la production d'OPN reflèterait la diminution de la perte osseuse, et augmenterait en contrepartie l'effet anabolique de la PTH sur la formation osseuse (Chiang et al., 2011). Ces résultats encourageants suggèrent que le niveau plasmatique d'OPN pourrait être utilisé comme biomarqueur de la réponse précoce au traitement à la PTH.

### B.3.4. Sur la BSP :

A l'instar des autres SIBLING, l'expression de la BSP est aussi régulée par la PTH. Elle est augmentée dans la lignée cellulaire ROS17/2.8 (Ogata et al., 2000), ainsi que dans la lignée d'ostéosarcomes humains (Saos2 ; Araki et al., 2009), sous l'effet de la hPTH 1-34 qui agit via la voie de signalisation de la protéine Kinase A/AMPC qui stimule la transcription de la BSP en bloquant l'action inhibitrice du complexe Pit-1 (« pituitary-specific transcription factor-1 » ; Figure 28).

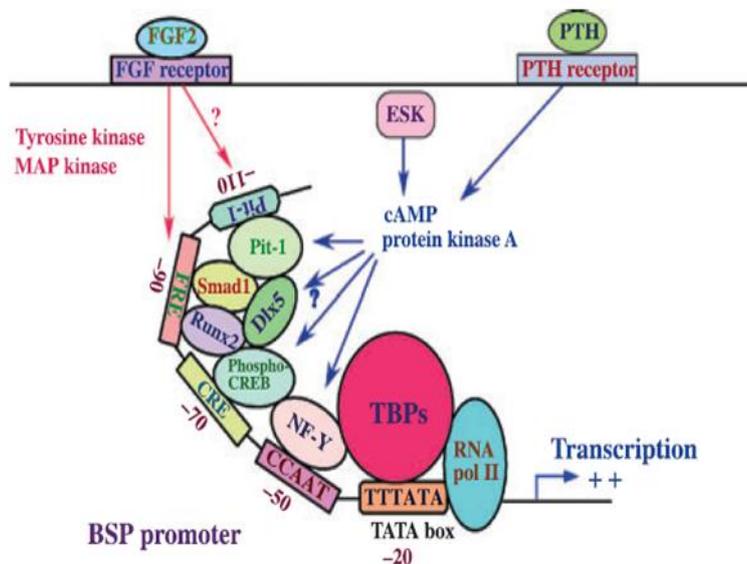


Figure 28: Voies de signalisation de l'expression de la BSP dans les ostéoblastes (Ogata et al., 2000)

La régulation de la BSP est cependant différente selon les types de cellules squelettiques. Dans les cémentoblastes, le PTHrP inhibe l'expression de la BSP (Ouyang et al., 2000) à nouveau par la voie PKA/AMPC et non la voie PKC qu'il active aussi (Partridge et al., 1994).

*In vivo*, les souris BSP<sup>-/-</sup> matures (4 mois) présentent une discrète hypocalcémie associée à une légère hyperparathyroïdie (Wade-Gueye et al., 2010). A l'inverse, la surexpression de la BSP induit une augmentation du taux sérique de calcium et une diminution de celui de la PTH (Valverde et al., 2008). Ces phénotypes reflètent probablement les effets respectifs et opposés des deux mutations sur la résorption ostéoclastique, le taux de PTH répondant aux variations de la calcémie (voir discussion dans Wade-Gueye et al., 2010). Chez les souris BSP<sup>-/-</sup>, un traitement intermittent avec de la PTH 1-34 induit une augmentation de la formation et de la résorption osseuse au niveau de l'os trabéculaire du fémur, associée à une augmentation de la

formation de l'os périostéal, alors que l'effet de l'hormone sur les souris sauvages est endostéal (Wade-Gueye et al., 2010). Ces modifications du remodelage osseux sont accompagnées d'une augmentation de l'expression de l'OPN qui est significative uniquement chez les souris BSP<sup>-/-</sup> (Wade-Gueye et al., 2010).

---

---

**La PTH induit donc l'expression des SIBLING, protéines clés de la minéralisation et du remodelage osseux.**

---

---

# Objectifs de l'étude

Comme nous l'avons détaillé plus haut, les membres de la famille des SIBLING sont très fortement impliqués dans la formation osseuse et la minéralisation. Ces protéines matricellulaires présentent également des ressemblances structurales qui suggéreraient de grandes similitudes fonctionnelles. Or, les études portant sur des souris déficientes en un des membres de la famille des SIBLING montrent au contraire des phénotypes osseux largement différents (Tableau 2), révélant ainsi une grande spécificité d'action de chacun de ces facteurs.

**Tableau 2 : Phénotype osseux dans les modèles murins d'extinction ou de surexpression des SIBLING.**

Protéine	Expression Cellulaire	Phénotype osseux (souris)		Références
		Déficiencie	Surexpression	
<b>MEPE</b>	Ostéoblastes/ Ostéocytes	Augmentation de la masse osseuse, MAR, nombre et épaisseur des travées	Diminution de la MAR, remodelage osseux, masse osseuse, augmentation de la largeur de la plaque de croissance	David et al.,2009 Martin et al., 2008 Nampei et al., 2004 Gowen et al., 2003
<b>DMP1</b>	Ostéoblastes/ Ostéoclastes /Ostéocytes/ Chondrocytes hypertrophiques/ Dentine	Diminution de la BMC, défaut de formation du cartilage, nanisme et chondroplasie, hypophosphatémie, augmentation du taux du FGF23	Accélération de la minéralisation, du remodelage osseux, plaque de croissance étroite	Martin et al.,2008 Feng et al.,2006 Ye et al.,2005 Feng et al., 2003 Fen et al.,2002
<b>OPN</b>	Ostéoblastes/ Ostéoclastes /Ostéocytes/ Chondrocytes hypertrophiques	Hyperminéralisation et hyperproduction des ostéoclastes dont l'activité est déficiente	Phénotype non étudié	Landis et al.,2003 Boskey et al.,2002 Sodek et al.,1995 Dodds et al.,1995
<b>BSP</b>	Ostéoblastes/ Ostéoclastes /Ostéocytes/ Chondrocytes / Dentine	Os longs plus courts, hypominéralisés avec une augmentation du volume trabéculaire et un remodelage osseux faible	Nanisme, diminution de la BMD, et du volume trabéculaire osseux	Malaval et al.,2008 Valverde et al.,2008 Gordon et al.,2007 Chen et al., 1992
<b>DSPP</b>	Dentine/tissu osseux/Cément	Défaut de minéralisation de la dentine, accélération de la minéralisation osseuse à 5 mois, hypominéralisation à 9 mois	<b>DSP:</b> minéralisation dentaire accélérée <b>DPP:</b> effets délétères sur l'émail	Verdelis et al.,2008 Yamakoshi et al.,2005 Sreenath et al., 2003

Le phénotype des souris déficientes en BSP, caractérisé dans notre laboratoire, montre qu'elles sont fertiles et viables. Elles présentent une plus petite taille et sont plus légères à la naissance et durant toute leur vie. Comme indiqué plus haut (Tableau 2) leur phénotype osseux à l'âge adulte est caractérisé par une faible activité de remodelage associée néanmoins

à une augmentation du volume trabéculaire osseux. La question se posait de la mise en place de ce phénotype au cours du développement du squelette des souris BSP-/-.

Nous nous sommes donc fixés comme objectif dans la première partie de cette étude d'analyser le développement post natal du squelette des souris déficientes en BSP. Cette étude s'est trouvée compliquée par un comportement anormal des femelles BSP-/- qui ne forment pas de nid pour leurs progénitures après la mise bas. Ce travail (*partie 1, article soumis*) a permis d'aboutir à trois conclusions importantes :

1/ Le comportement anormal des mères BSP-/- n'affecte pas le phénotype osseux des souris déficientes en BSP, qui est d'origine génétique.

2/ Le phénotype osseux des souris déficientes en BSP se développe progressivement après la naissance.

3/ Les souris BSP-/- présentent un taux plus élevé d'OPN circulante, et la surexpression de cette protéine « cousine » de la BSP pourrait expliquer l'hypominéralisation qui caractérise les os des souris mutantes.

Des travaux antérieurs effectués dans le laboratoire avaient montré qu'*in vitro*, l'apport exogène d'OPN dans des cultures de monocytes BSP-/- permet de récupérer une ostéoclastogénèse normale, et de normaliser la surface (mais pas le nombre) des lacunes de résorption formées sur substrat un minéralisé par les ostéoclastes BSP-/- (Boudiffa et al., 2010), ce qui témoigne d'une redondance partielle entre les effets de ces deux protéines. Lors de la caractérisation du phénotype des souris BSP-/-, nous avons aussi montré que le faible taux de remodelage osseux des mutants pouvait être fortement stimulé par un défi mécanique (suspension par la queue) ou hormonal (Wade-Gueye et al., 2010), suggérant qu'un facteur « compensateur » était alors produit. Or, le traitement systémique intermittent par la PTH induit une augmentation significative de l'expression génique tissulaire de l'OPN uniquement chez les souris BSP-/- (Wade-Gueye et al., 2010). Toutes ces données ont orienté la suite de ce travail vers l'étude des relations fonctionnelles entre BSP et OPN.

Une première question était de savoir ***si l'OPN pourrait remplacer fonctionnellement la BSP suite à un défi hormonal.***

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons développé un modèle de traitement intermittent par la PTH des os du crâne (calvaria) ou de leurs cellules en cultures, chez des souris BSP+/+ et BSP-/-, et réalisé une série d'expériences *in vivo* et *in vitro* avec des siARN bloquant

l'expression de l'OPN. Nous avons ainsi établi que la réponse à ce défi hormonal était bloquée si la BSP et l'OPN étaient simultanément absentes, suggérant que l'OPN se substitue fonctionnellement à la BSP pour au moins une partie de ses fonctions, mais aussi que l'expression (d'au moins un de) ces facteurs, est cruciale pour l'action de cette hormone, au moins dans ce modèle (*Partie 2, article en préparation*).

La seconde question, complémentaire, était soulevée en particulier par les valeurs élevées d'OPN sanguin observées dans les souris BSP<sup>-/-</sup> en croissance. Elle concernait ***le rôle joué par l'expression accrue d'OPN dans le phénotype des souris BSP<sup>-/-</sup>***. A cause de l'importance du réseau vasculaire dans le tissu osseux et parce que l'OPN et aussi la BSP, sont angiogéniques, nous avons abordé cette question en analysant le phénotype vasculaire des souris BSP<sup>-/-</sup>, et en particulier les processus de recolonisation hématopoïétique et vasculaire dans un modèle d'ablation médullaire en l'absence de BSP (*Partie 3*). Ces travaux sont encore en cours, mais il est apparu dorénavant et déjà que l'absence de BSP se traduit en particulier par une réponse angiogénique à l'ablation médullaire plus rapide. Celle-ci s'accompagne d'une surexpression d'OPN également observée dans la moelle des os longs intacts de souris BSP<sup>-/-</sup>, et qui pourrait donc être la cause de ce phénotype.

# Travaux Réalisés

**(1) Développement squelettique post-natal et  
croissance des souris déficientes en sialoprotéine  
osseuse (BSP) (Manuscrit soumis à PlosOne)**

## Introduction:

Le développement des souris BSP-/- a fait l'objet d'une étude dans le laboratoire, initialement menée par Maya Boudiffa, afin de clarifier les étapes de la mise en place du phénotype des mutants. Au cours des années récentes, l'observation attentive du comportement reproducteur des souris BSP-/- de l'élevage m'a fait observer qu'elles ne construisaient pas de « nid » pour leurs petits et semblaient passer beaucoup moins de temps à leur contact. Ceci nous a conduits à reconsidérer l'étude, afin de clarifier d'abord si le comportement aberrant des mères, influençait voire expliquait le phénotype osseux des souris BSP-/-. Ce souci levé, j'ai complété ce travail en analysant en particulier les taux circulants de marqueurs pertinents pour la croissance et la minéralisation : l'IGF1 et l'OPN.

*L'ensemble de l'étude a fait l'objet d'un article soumis à Plos ONE, dont Maya Boudiffa et moi-même sommes auteurs à égalité de contribution. Ce manuscrit figure en annexe de la thèse, le présent chapitre présentant un simple résumé des données générales, pour insister sur l'effet du comportement des mères et les dosages de marqueurs circulants, travaux que j'ai plus personnellement conduit.*

## Matériels et méthodes:

### Production et élevage des souris:

Les procédures de soin, d'expérimentation et de mise à mort des animaux sont conformes aux normes l'Union Européenne sur les soins et l'utilisation des animaux de laboratoire (ministère de l'agriculture autorisation n° 90SV08). Les souris BSP-/- ont été générés comme décrit précédemment (Malaval et al., 2008). Au cours de l'acclimatation et des expérimentations, les animaux ont été logés et élevés dans le PLEXAN, (Plateforme d'Expérimentation et d'Analyse, Faculté Médecine de Saint-Etienne, France), dans des conditions standards contrôlées de température ( $23 \pm 2^\circ \text{C}$ ), et de lumière (12h cycle d'obscurité 12/ lumière), nourries et abreuvées sans restrictions. Toutes les recommandations de comités d'éthique et de protection des animaux ont été respectées.

### Reproduction des animaux et génotypage :

Pour vérifier si les anomalies de comportement des mères BSP-/- ont un impact sur le phénotype osseux en absence de BSP, de multiples expériences de croisement ont été effectuées. Dans un premier temps des souris mâles BSP+/+ ont été croisés avec des femelles BSP-/- et inversement, pour générer une descendance hétérozygote. Ensuite, des mâles BSP +/- ont été croisés avec des femelles BSP-/-, générant une descendance mixte composée de

souris BSP<sup>-/-</sup> et BSP<sup>+/-</sup>. Enfin des souris hétérozygotes ont été croisées pour obtenir un mélange mendélien de souris BSP<sup>+/+</sup>, <sup>-/-</sup> et <sup>+/-</sup>. Le génotypage des descendants a été effectué par PCR (Qiagen) sur l'ADN génomique de queue, isolé par Direct PCR Lysis Reagent (Viagen, Biotech Inc, Los Angeles) associé à la protéinase K (Euromedex, France), en utilisant les amorces suivantes: BSP-sens: AGGACTAGGGGTCAAACAC, BSP-antisens : AGTAGCGTGGCCGGTACTTA, et Neomycine (RPL 290): TCGCCTTCTTGACGAGTTCTGAG. Les produits d'amplification ont été migrés sur un gel d'agarose à 2 % (Sigma). Les bandes de 481PB correspondaient aux souris BSP<sup>+/+</sup>, 550 PB aux souris BSP<sup>-/-</sup> ; les souris BSP<sup>+/-</sup> présentaient les deux bandes.

### **Morphométrie des souris en croissance :**

Dans toutes les configurations, nous avons comparé la longueur du poids et les courbes de croissance entre 8 et 30 jours, ainsi que la longueur du fémur et du tibia à J40 de souris de différents génotypes dont les mères étaient BSP<sup>+/+</sup> ou <sup>-/-</sup>. Pour ce faire, les souris ont été tatouées 7 jours après leur naissance, puis pesées tous les deux jours avec une balance de précision (0.1g). Leur longueur a été mesurée, du nez à la base de la queue avec un pied à coulisse (Digital Electronic Caliper). Des souris âgées de 40 jours ont été mises à mort et les fémurs et tibias prélevés et mesurés avec le pied à coulisse. Dans tous les cas, nous avons pris soin de comparer pour tous les paramètres, des souris issues de portées de taille similaire.

### **Dosage des concentrations d'OPN et d'IGF-1 dans le sérum :**

Les concentrations d'OPN et d'IGF-1 ont été dosées dans des sérums de souriceaux de 6 jours, dont le sang de 5 à 6 nouveaux-nés a été recueilli et récolté dans le même tube, le nombre de N dans la partie résultat se réfère donc au nombre de pool de sang testés. La concentration de l'OPN a été également dosée dans les sérums de souris de 12 mois. Le kit ELISA DuoSet OPN (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA) et kit ELISA IGF-1 (Ray Bio®, Norcross, USA) ont été utilisés. Toutes les instructions et les recommandations des fabricants ont été respectées. Chaque échantillon a été dosé en double.

### **Analyse statistique :**

Tous les résultats insérés dans la partie travaux réalisés sont présentés en moyenne  $\pm$  SD. Les significativités statistiques ont été déterminées par les tests non paramétriques de Mann-Whitney ou de Kruskal et Wallis avec post-test (Figure 30 E et F), réalisées avec le logiciel INSTAT (version 3.00 pour Windows 95, GraphPad Software, San Diego, CA)

## Résultats :

Les nouveau-nés BSP<sup>-/-</sup> sont dès la naissance plus petits que les sauvages (Figure 29 A), on retrouve cette différence de poids et de la taille entre les deux génotypes à l'âge adulte. Leur squelette présente à un retard de minéralisation et/ou un défaut d'ossification bien visible au niveau des phalanges et des sutures crâniennes qui sont plus larges (Figure 29 C et D).

Le processus d'ossification endochondrale et l'apparition des centres d'ossification primaire ne semblent pas être affecté en absence de BSP, en effet l'analyse microtomographique des fémurs des nouveau-nés BSP<sup>+/+</sup> et BSP<sup>-/-</sup>, a montré une diminution du BV/TV associé à une corticale plus fine et une diminution de la densité minérale en absence de BSP. En revanche, l'analyse histomorphométrique de l'os trabéculaire fémoral n'a montré aucune différence dans le BV/TV, ni dans les paramètres de résorption (Oc. S/BS, Oc.N/B.Ar) entre les deux génotypes. L'épaisseur de la plaque de croissance, quant à elle est nettement inférieur chez les nouveaux-nés BSP<sup>-/-</sup> avec une zone hypertrophique plus mince.

Les mères BSP<sup>-/-</sup> durant la période de gestation et de mise bas présentaient un comportement aberrant, en effet ces dernières ne construisaient pas de nid pour leurs petits (Figure 30 A). Cette observation cruciale, nous a naturellement amené à nous interroger sur l'impact de cette anomalie comportementale sur le phénotype osseux des nouveaux-nés et des souris BSP<sup>-/-</sup>. Pour ce faire nous avons dans un premier temps croisé des mâles BSP<sup>-/-</sup> avec des femelles BSP<sup>+/+</sup> et inversement, afin vérifier s'il y avait un effet mère sur la descendance hétérozygote obtenue. Comme le démontre la figure 30 B, le génotype de la mère n'a aucune incidence ni sur la courbe du poids, ni sur la taille des souris, de la naissance jusqu'au moment du sevrage. En outre, aucune différence significative n'a été observée pour la longueur des fémurs et des tibias prélevés à J40 sur des souris BSP<sup>+/-</sup>, indépendamment du fait qu'elles étaient élevées par une mère <sup>+/+</sup> ou une mère <sup>-/-</sup> (Figure 30 C). Ensuite, des femelles BSP<sup>-/-</sup> ont été croisées avec des mâles BSP<sup>+/-</sup>, afin de vérifier s'il y avait un effet de la mère BSP<sup>-/-</sup> sur une descendance mixte composée de souris BSP<sup>+/-</sup> et BSP<sup>-/-</sup>. Les os longs (Fémur : Figure 30D, Tibia : données non présentées), étaient plus courts chez les souris BSP<sup>-/-</sup> que ceux des BSP<sup>+/-</sup>. Enfin des souris hétérozygotes ont été croisées, pour obtenir un mélange mendélien d'une descendance mixte composée de souris BSP<sup>+/+</sup>, <sup>-/-</sup> et <sup>+/-</sup>, avec un poids corporel plus faible et des fémurs plus courts, uniquement observés chez la descendance BSP<sup>-/-</sup> (Figure 30 E).

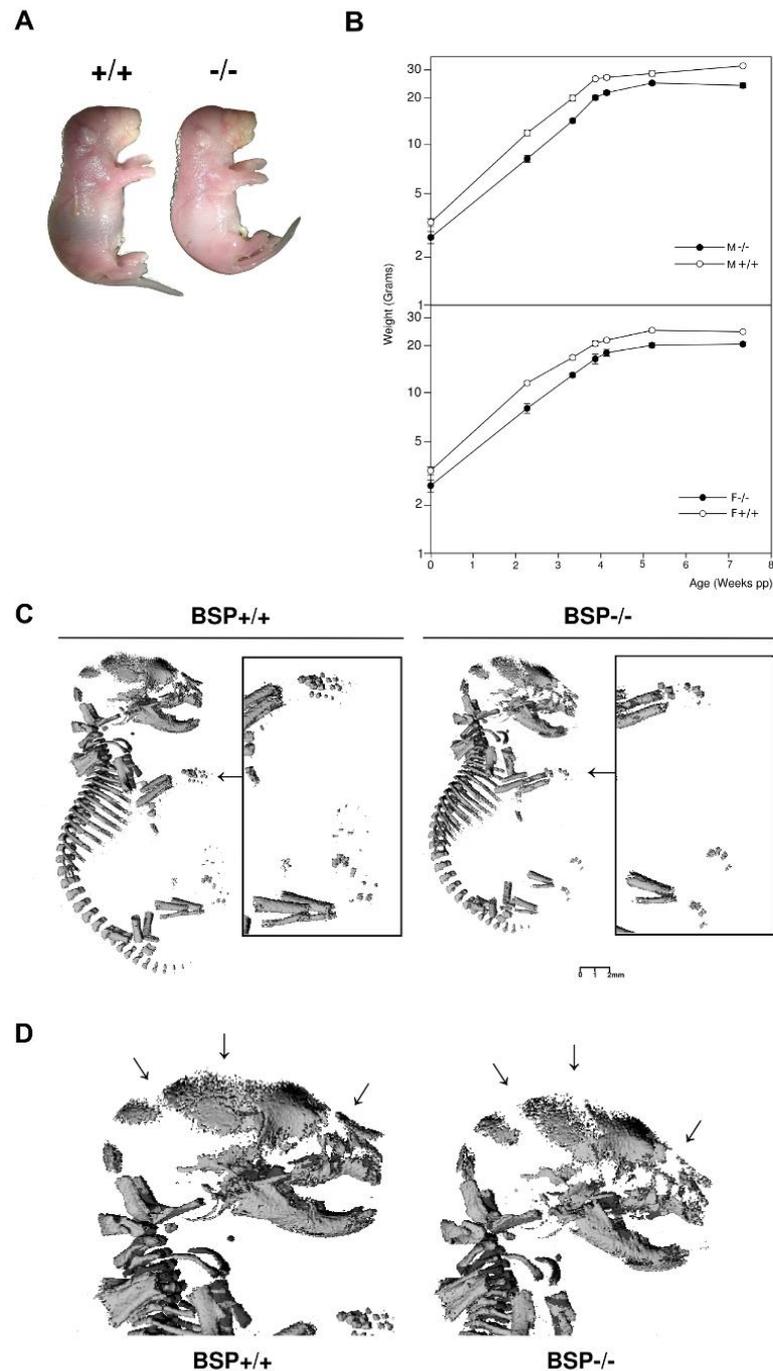
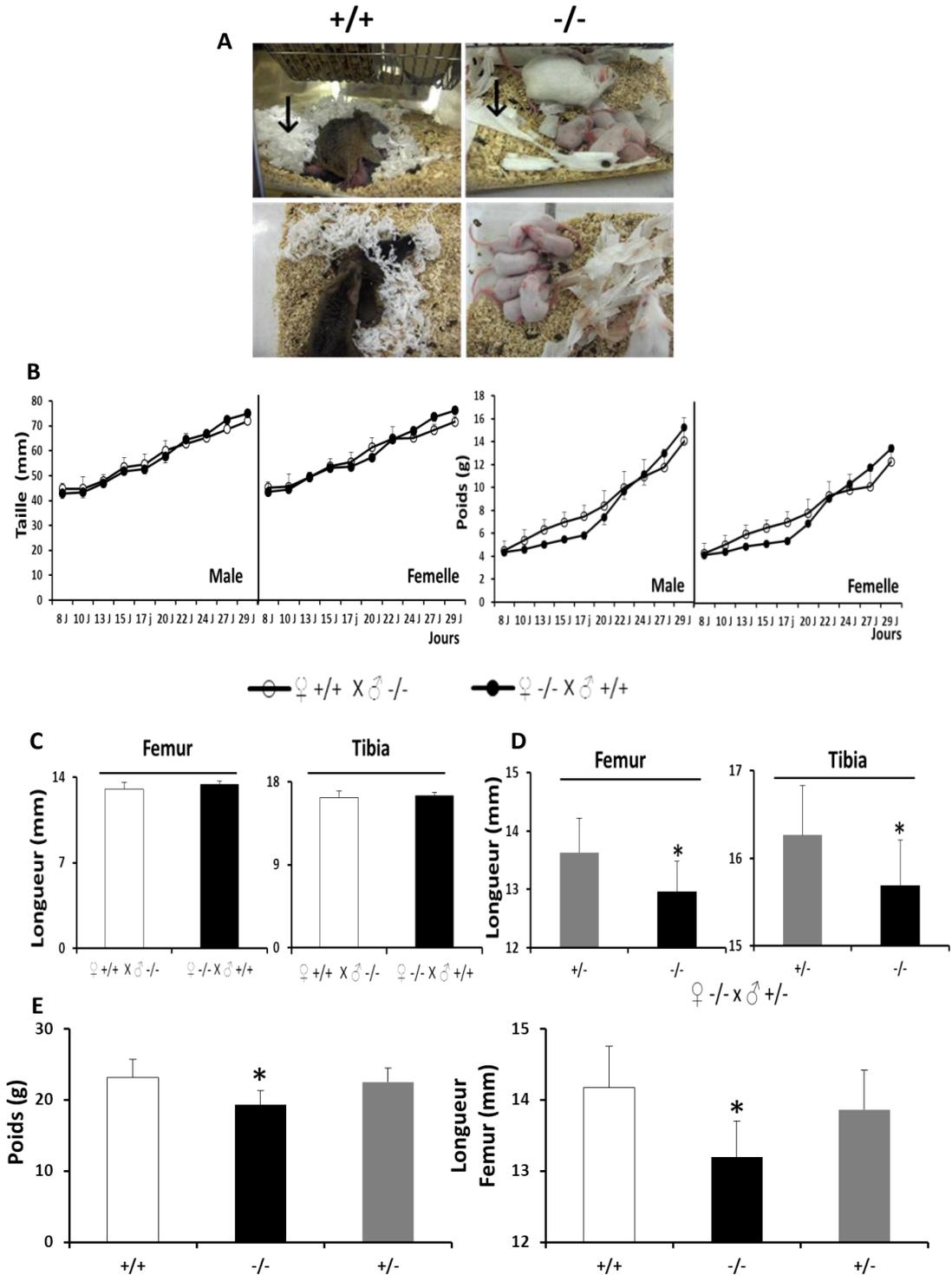


Figure 29 : Développement des souris BSP<sup>-/-</sup>. (A) Les nouveaux-nés BSP<sup>-/-</sup> sont plus petits et plus légers que les BSP<sup>+/+</sup>, et (B) la différence de poids se maintient durant toute la vie adulte. (C) Les squelettes des mutants présentent un retard de minéralisation, bien visible au niveau des phalanges, de la calvaria (D), dont les sutures sont plus larges, et du museau (D, flèches). D'après Bouleffour, Boudiffa et al., Soumis (Manuscrit en annexe).



**Figure 30 : L'impact de l'absence de BSP sur le comportement maternel :** (A) Photos de mères BSP+/+ et BSP-/- avec leurs bébés, noter le nid bien formé dans la cage de la souris BSP+/+, par opposition à la mère BSP-/- dont le nid est désorganisé et le papier et non déchiqueté (flèches). (B) Courbe de la longueur du corps (à gauche) et du poids (à droite) au cours des 30 premiers jours de croissance des mâles et femelles hétérozygotes +/- suite à croisement entre souris BSP+/+ et BSP-/- . (C) Taille du fémur et du tibia à J 40 des mâles hétérozygotes +/- issues de croisement entre des mâles BSP+/+ et femelles BSP-/- et inversement mères BSP+/+ (n=6), mères BSP-/- (n=6). (D) Taille du fémur et du tibia à J 40 des mâles hétérozygotes +/- (n=13) et BSP-/- (n=6) issus des croisements de femelles BSP-/- et de mâles BSP+/- . (E) Evaluation du poids du corps et de la taille du fémur à J40 des souris BSP+/+ (n=7), BSP-/- (n=11) et des BSP+/- (n=22) les valeurs sont exprimées (moyenne  $\pm$  écartype) \*: P <0,05 vs + / + et / ou + / -, Mann-Whitney U test/ Kruskal wallis avec post test.

L'absence de la BSP induit une altération de la plaque de croissance, en effet les nouveau-nés BSP<sup>-/-</sup> de 6 jours présentent une diminution de l'épaisseur de la plaque avec une zone hypertrophique plus fine. Le dosage de la concentration d'IGF-1 circulante était diminué chez ces souriceaux BSP<sup>-/-</sup> (Figure 31 A). Le dosage de la concentration de l'OPN circulante une protéine coexprimée au niveau des fronts de minéralisation avec la BSP, montre une augmentation de la concentration de l'OPN dans les sérums des nouveaux-nés de 6 jours, cette augmentation persiste jusqu'à 12 mois.

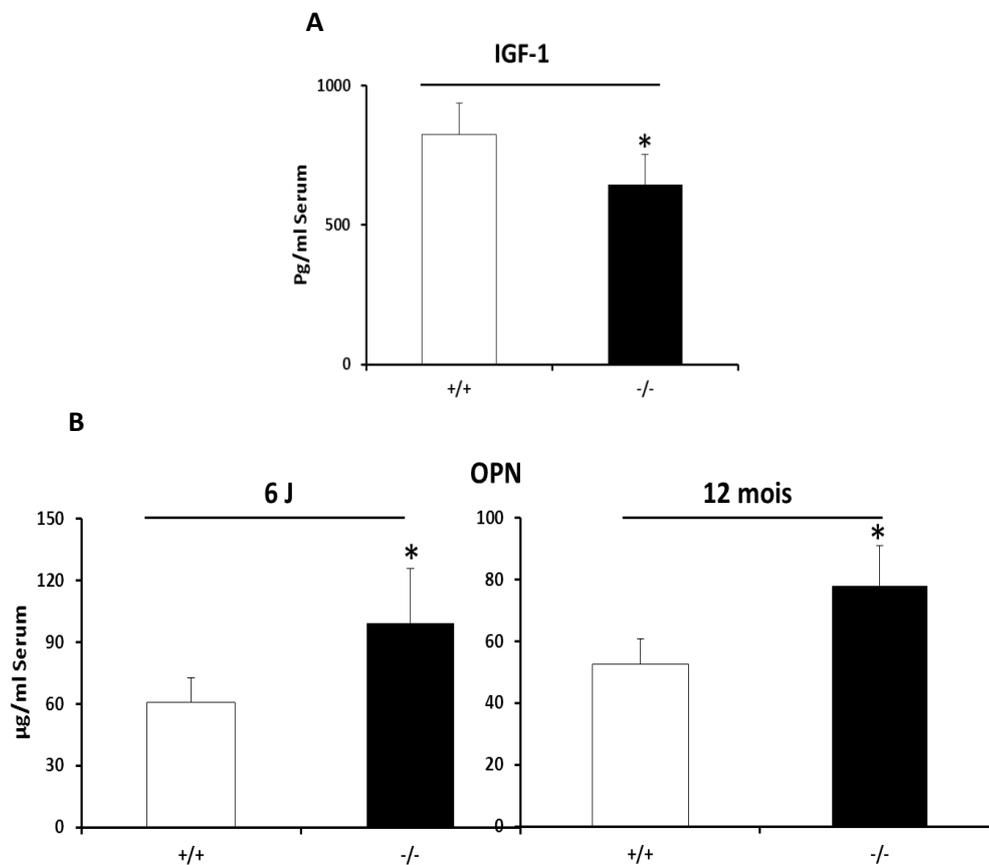


Figure 31: Dosage ELISA (A) de la concentration de l'IGF-1 circulant dans le sérum de nouveaux-nés de 6 J. (B) de l'OPN dans le sérum de nouveaux-nés de 6 J et des souris de 12 mois. Les valeurs sont exprimées (moyenne  $\pm$  écartype). \*:  $P < 0,05$  vs BSP + / +, Mann-Whitney U test.

## Discussion:

Dans ce travail, nous montrons que le phénotype osseux des souris BSP<sup>-/-</sup>, caractérisé en particulier par une petite taille du corps et des os longs, est lié uniquement à l'absence de cette protéine et non pas au fait que les mères qui présentent des problèmes comportementaux après la mise bas.

La quantification des paramètres de masse et de microarchitecture en microtomographie tridimensionnelle montre que les souris déficientes en BSP présentent une corticale hypominéralisée plus fine, associée à un volume osseux trabéculaire plus élevé (Malaval et al., 2008). Par ailleurs, la déficience en BSP, une protéine de la matrice extracellulaire semble avoir une incidence sur le comportement maternel. En effet, les mères BSP<sup>-/-</sup> ne construisent pas de nid pour leurs petits à l'instar des mères BSP<sup>+/+</sup> qui déchiquettent méthodiquement le papier pour former un nid homogène parfaitement adapté. Aussi, les mères BSP<sup>-/-</sup> semblent passer moins de temps avec leurs petits (Paramètre non quantifié). Un seul travail a étudié l'impact de l'absence d'une SIBLING sur le comportement. Les souris déficientes en DMP1 présentent un comportement hyperactif (Lv et al., 2010), qui est attribué à l'hypominéralisation du vestibule osseux, système sensoriel de la perception des mouvements et de l'orientation. Des études approfondies, y compris éthologiques, seront nécessaires pour évaluer l'impact de la mutation de la BSP sur le comportement des souris et évaluer s'il reflète un effet direct via le système nerveux ou bien encore une altération sensorielle comme pour la DMP1.

Plusieurs séries de croisements entre différents génotypes BSP<sup>+/+</sup>, <sup>-/-</sup> et <sup>+/-</sup> ont montré sans aucun doute, que le phénotype osseux des souris BSP<sup>-/-</sup> décrit plus haut, est dû uniquement à l'absence de la protéine et ne résulte pas du comportement anormal des mères BSP<sup>-/-</sup>. En effet en présence d'une mère mutante, la descendance <sup>+/-</sup> présentait des fémurs et des tibias plus grands que la descendance <sup>-/-</sup> (Figure 30 D).

La BSP est exprimée par les chondrocytes hypertrophiques, l'absence de cette protéine induit une altération de la plaque de croissance à la naissance. L'IGF-1 est connu pour stimuler la prolifération des chondrocytes de la plaque (Wang et al., 1999b). Les nouveaux-nés BSP<sup>-/-</sup> présentent une réduction de près de 20 % du taux d'IGF-1 circulant (Figure 31A). Le foie est la principale source de l'IGF-1 circulant. L'interprétation des variations du taux d'IGF-1 circulant est très difficile, car il est d'origine hépatique (Ohlsson et al., 2009). La réduction du taux d'IGF-1 circulant peut être expliquée par une diminution du taux de la GH qui ne stimulerait plus assez l'IGF-1, ou par une réduction de l'IGF-1 hépatique. Cependant, le KO

de l'IGF-1 au niveau hépatique entraîne certes une diminution de 25 % du taux d'IGF-1 circulant (comme celle observée en l'absence de BSP), mais sans pour autant affecter la longueur ou la croissance osseuse (Yakar et al., 2002). Les souris représentant une extinction génique de l'IGF-1 dans les ostéoblastes ou les chondrocytes ont un taux circulant d'IGF-1 normal, mais les mutations entraînent des diminutions respectives de 14 % et 7 % de la taille (Govoni et al., 2007a, 2007b). Chose intéressante, le phénotype osseux des souris qui ont un KO total pour l'IGF-1 est très similaire à celui des souris BSP<sup>-/-</sup>, avec une diminution de l'épaisseur corticale (Mohan et al., 2003), du BFR (Bone Formation Rate) et de la MAR (Mineral Apposition Rate) associé à une augmentation volume osseux trabéculaire (Bikle et al., 2001). Il faudrait donc, pour avancer sur cet aspect du phénotype de nos souris, analyser l'expression de l'IGF-1 par les ostéoblastes et les chondrocytes en absence de BSP.

En dehors des changements observés dans la plaque de croissance, étonnamment le processus d'ossification endochondrale ne semble pas être affecté chez les nouveaux-nés BSP<sup>-/-</sup> (Figure 2 du manuscrit en annexe). De même aucune différence significative n'a pu être détectée concernant les paramètres de résorption et le volume osseux trabéculaire entre les deux génotypes aux stades précoces du développement, suggérant des mécanismes compensatoires pour remplacer l'absence de BSP, peut être par l'OPN et/ou la DMP1 qui sont exprimés par les chondrocytes hypertrophiques et les ostéoblastes et qui jouent un rôle important dans l'ossification endochondrale. L'OPN est un puissant inhibiteur de la minéralisation. Les nouveaux-nés BSP<sup>-/-</sup> présentent des niveaux élevés d'OPN circulante, ce qui est en concordance avec le retard de la minéralisation décrit précédemment et la plus faible densité minérale (Figure 5A du manuscrit en annexe). Les niveaux de minéralisation des souris BSP<sup>-/-</sup> rejoignent progressivement ceux des souris sauvages au cours du vieillissement (Malaval et al., 2008), alors que les taux circulants d'OPN sont toujours plus élevé à 12 mois chez les souris BSP<sup>-/-</sup>, suggérant que le mécanisme inhibiteur de l'OPN n'est pas dominant dans ce modèle, ou du moins pas dans toutes les étapes de la croissance et du maintien du squelette. L'étude du développement squelettique post-natal des souris BSP<sup>-/-</sup> nous a donc conduits à nous intéresser au rôle joué par l'OPN dans le phénotype induit par l'absence de BSP et tout d'abord à la possibilité que certaines au moins des fonctions de l'une de ces protéines cousines, soit prise en charge par l'autre.

**(2) L'expression de la Sialoprotéine osseuse et de l'Ostéopontine est nécessaire à l'action anabolique de la PTH sur l'os pariétal (Manuscrit en préparation)**

## Introduction :

En relation avec le travail précédant, nous avons essayé clarifier le degré de redondance et spécificité entre la BSP et l'OPN. Ces deux protéines sont coexprimées au niveau des fronts de minéralisation et sont synthétisées par les ostéoblastes et les ostéoclastes. Comme nous l'avons montré précédemment, les nouveaux-nés BSP<sup>-/-</sup> présentent un taux élevé d'OPN circulante, qui persiste jusqu'au vieillissement. L'administration intermittente de PTH induit une augmentation des paramètres de formation et de résorption en fonction du site osseux, chez les souris déficientes en BSP, ceci est accompagnée d'une augmentation de l'expression génique tissulaire de l'OPN uniquement chez les souris mutantes (Wade-Gueye et al., 2010). *In vitro*, l'OPN est augmentée dans des cultures cellulaires de moelle osseuse BSP<sup>-/-</sup> (Malaval et al., 2008). De même, un apport exogène d'OPN permet de récupérer une ostéoclastogénèse normale et de normaliser la surface (mais pas le nombre) des lacunes de résorption formées sur substrat minéralisé par les ostéoclastes BSP<sup>-/-</sup> (Boudiffa et al., 2010).

L'ensemble de ces données suggèrent un certain degré de redondance et/ou complémentarité entre ces deux protéines. Cette complémentarité pourrait expliquer, la réactivation de la résorption chez les souris BSP<sup>-/-</sup>, soumises à des défis gravitaires (suspension par la queue) ou hormonaux (PTH, ovariectomie ; Malaval et al., 2008).

Pour tester cette hypothèse, nous avons développé un modèle d'injection de PTH1-84 en sous cutanée, au niveau de la moitié droite de l'os pariétal, associé ou non à des siARN contre l'OPN. Des travaux *in vitro* ont été également réalisés, où des cellules issues de la digestion de calvaria de nouveaux-nés ont été traitées avec de la PTH1-34 supplémentée ou non avec des siARN visant à bloquer l'expression de l'OPN.

*Ce travail est présenté ici sous forme d'un manuscrit d'article à soumettre.*

# **Extinction of both bone sialoprotein (BSP) and osteopontin (OPN) expression impairs the anabolic action of PTH in mouse calvaria bone**

BOULEFTOUR Wafa<sup>1</sup>, BOUET Guénaelle<sup>1</sup>, GRANITO Renata Neves<sup>1</sup>, THOMAS Mireille<sup>1</sup>, LINOSSIER Marie Thérèse<sup>1</sup>, VANDEN BOSSCHE Arnaud<sup>1</sup>, AUBIN Jane E<sup>2</sup>, LAFAGE-PROUST Marie-Hélène<sup>1</sup>, VICO Laurence<sup>1</sup>, MALAVAL Luc<sup>1</sup>

(1) INSERM U1059/LBTO, Université de Lyon, F42023 Saint-Etienne;

(2) Department of Molecular Genetics, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada.

Corresponding author:

Dr. Luc MALAVAL

INSERM U1059

Université Jean Monnet Faculté de Médecine

15. Rue A. Paré 42023 St Etienne Cedex 02 France

Phone : 33-4-77-42-14-44 T

Telefax : 33-4-77-57-55-72

E-mail : luc.malaval@univ-st-etienne.fr

Key words: BSP, OPN, SIBLING proteins, PTH, remodeling, calvaria

**Abstract**

Bone remodeling is tightly regulated by central, systemic, and local factors, including extra-cellular matrix proteins. Among these, osteopontin (OPN) and bone sialoprotein (BSP), both members of the “small integrin-binding ligand, N-linked glycoprotein” (SIBLING) family, are coexpressed in both osteoblasts and osteoclasts and involved in primary and secondary ossification. Previous work suggested that some functions of BSP and OPN are overlapping while others are not. Here, we investigated their degree of specificity and redundancy in a local (calvaria) model of PTH-induced remodeling.

In a model of intermittent injection of hPTH 1-84 (iPTH, 8µg daily, 14 days) over the periosteum of the right mouse hemicalvaria, µCT and histomorphometry analysis showed that iPTH stimulates bone formation in the injected side in both genotypes, increasing to the same degree periosteum and osteoid thickness, bone thickness and porosity. The expression of bone formation and mineralization markers (OPN, osterix, osteocalcin, DMP1) and the endopeptidase Phosphate regulating Endopeptidase Homolog, X-linked (PHEX) was also increased by iPTH treatment in both genotypes. Comparison of calvaria cell cultures from BSP+/+ and BSP-/- mice revealed few osteoblast colonies (bone nodules) and no mineralization in mutant dishes, along with little/no expression of osteocalcin (OCN) nor SIBLING proteins MEPE or DMP1. In contrast, OPN levels were 5x higher in BSP-/- vs BSP+/+ cultures. Treatment of the cultures with 50ng/ml hPTH 1-34 induced an increase in alkaline phosphatase (ALP) activity in both BSP+/+ and BSP-/- cultures, with the induction of OCN expression in BSP-/- dishes, and their mineralization at day 17. siRNA blocking of OPN expression concomitant with iPTH treatment did not alter the anabolic action of the hormone in BSP+/+ calvariae. In contrast, iPTH effects in BSP-/- calvariae were blunted by siRNA-induced reduction in OPN production, with no change in bone volume and porosity, nor in OCN expression, and modest increase in periosteum thickness respective to controls.

In conclusion, full expression of both OPN and BSP is necessary for the anabolic effect of PTH at least in the ectopic calvaria injection model. This suggests that OPN may compensate for the lack of BSP in the response to this hormonal challenge, and provides evidence of functional overlap between these two cognate proteins.

## Introduction

Members of the Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoprotein (SIBLING) family share remarkable biochemical and genetic characteristics [1]. The genes for osteopontin (OPN), bone sialoprotein (BSP), dentin sialophosphoprotein (DSPP), dentin matrix protein 1 (DMP1) and extracellular matrix phosphoglycoprotein (MEPE) are aligned in a portion of chromosome 4 (4q13.21) in humans (5q in mice), referred to as the “Bone gene cluster” (MacDougall et al., 2002)(Rowe et al., 2000b). SIBLING proteins are expressed in bone and dentin and are secreted into the extracellular matrix during osteoid formation and mineralization(Fisher and Fedarko, 2003)(Huq et al., 2005). All SIBLING display post-translational modifications such as phosphorylation, glycosylation and sulfation. They present other common features such as stretches of acidic amino-acids, an RDG (Arg-Gly-Asp) sequence which mediates cell attachment and signaling via integrin binding (Fisher et al., 2001), and an ASARM (acidic serine-rich motif) sequence which appears as a potent inhibitor of mineralization(Addison et al., 2010)(Addison et al., 2008).

BSP and OPN are coexpressed by osteoblasts, osteoclasts and hypertrophic chondrocytes(Boskey et al., 1993). BSP knockout (BSP<sup>-/-</sup>) mice have very low levels of trabecular bone remodeling, with reduced activity of both osteoblasts and osteoclasts(Malaval et al., 2008). OPN<sup>-/-</sup> mice display impaired resorption due to an intrinsic defect of osteoclast activity (Chellaiah et al., 2003), resulting in an absence of bone loss after ovariectomy (Yoshitake et al., 1999) or hind limb unloading (Ishijima et al., 2002). Nonetheless, OPN<sup>-/-</sup> mice display enhanced cortical and trabecular bone formation under intermittent PTH treatment (Kitahara et al., 2003). Likewise, intermittent injection of PTH increases bone formation and resorption in BSP<sup>-/-</sup> mice, along with an increase in expression of OPN (Wade-Gueye et al., 2010). Expression of OPN was also found increased in cultures of BSP<sup>-/-</sup> bone marrow cells (Boudiffa et al., 2010). Furthermore addition of exogenous OPN restored the number of osteoclasts formed in BSP<sup>-/-</sup> spleen cell cultures, and the area of resorption lacunae formed on mineralized substrate by BSP<sup>-/-</sup> osteoclasts (Boudiffa et al., 2010). Taken together, these data suggest a certain degree of redundancy and complementarity between BSP and OPN, which could explain the fact that the hormonal challenges (PTH, ovariectomy) or unloading reactivate bone turnover in BSP<sup>-/-</sup> mice (Malaval et al., 2008)(Wade-Gueye et al., 2010).

In order to clarify the degree of redundancy between the two proteins, we used an in vivo quantitative assay for the local anabolic action of PTH, by transcutaneous injection over the right hemi-calvaria. We show that although BSP<sup>-/-</sup> calvaria bones present with a low bone turnover, they do respond fully to PTH. Blocking OPN expression through siRNA in BSP<sup>+/+</sup> calvariae did not change the response to PTH, while simultaneous extinction of OPN and BSP

impaired the anabolic action of the hormone in BSP-/- calvariae. Thus, full expression of either BSP or OPN is necessary for the anabolic effect of PTH, at least in the ectopic calvaria injection model.

## **Materiel and methods**

### *Care for animals and sampling procedures:*

BSP knockout mice have been generated as described (Malaval et al., 2008) . For line maintenance and experimentation, the animals were housed and bred in the PLEXAN facility (Platform for experiments and analysis, Medical Faculty, University of Saint-Etienne, France). The procedures for the care and killing of the animals were in accordance with the European Community Standards on the care and use of laboratory animals (Ministère de l'Agriculture, France, Authorization 04827). All animal experiments were approved by the "Comité du Bien Etre Animal" of the PLEXAN. Mice were kept at standard temperature (23±2°C), in a light controlled environment (12h light/12h dark cycle). Animals were fed a standard pellet diet and were allowed water *ad libitum*.

### *Local PTH injection in mouse calvariae :*

Three months old male BSP+/+ and BSP-/- mice were randomly distributed between two groups. One received vehicle injections (9‰ NaCl), the other was injected with hPTH 1-84 (Preotact<sup>®</sup>, kind gift from Nycomed, Sweden, stored at 0.8 µg/µl in vehicle). On the first day, injected mice were anesthetized and their heads shaved. An insulin syringe was then used to inject 10 µl (= 8µg) of PTH solution subcutaneously on the right side of the calvaria, over the middle part of the right parietal bone (Figure 1A). Injections were repeated daily until day 15. Two intraperitoneal injections of tetracycline (25mg/kg) were performed on day 11 and day 14 of the experiment. The mice were killed on day 16 by cervical dislocation. For transfection experiments, one group of mice was injected with 20µl of vehicle, the second group with 20µl of vehicle containing 8 µg of PTH and 100ng of siRNA (siOpn: 5'GGAUGUGAUCGAUAGUCAATT3', Ref: SI01432011, Qiagen, Valencia, CA, USA) targeting the OPN transcript (*Spp1* gene, NCBI RefSeq: NM\_001204201). A third group received 8µg of PTH with 100ng scrambled RNA (Scr: 5'UUCUCCGAACGUGUCACGUGdTdT3', Ref: 1022076, Qiagen).

### *Microtomography (µ-CT) and histomorphometry:*

After sacrifice, whole calvariae were scanned with a high resolution µCT (Viva CT40; Scanco Medical, Bassersdorf, Switzerland). Data were acquired at 55 keV, with a 10 µm isotropic voxel size. Three dimensional reconstructions were generated using the following parameters:  $\sigma$ : 1.2, support: 2, threshold: 132. A region of interest (ROI) was defined in the

right parietal bone, spanning the distance between the bone midline (defined as described in Fig. 1B) and the lambdoid suture, and limited by the bone surfaces (outlined in 1B). Structural parameter measurements were taken within the ROI from a segmented 3D reconstruction encompassing 50 slices (=500 $\mu$ m thick). The parameters measured were the total volume of bone (taken as TV within this ROI, in mm<sup>3</sup>), bone thickness (TbTh, in mm), bone porosity (1-(BV/TV), in %), and mineral density (in mg HAP/cm<sup>3</sup>, as calibrated with an HAP phantom).

For histology and histomorphometry, whole calvariae were fixed (3.7% paraformaldehyde in PBS), dehydrated in acetone and embedded in methylmethacrylate. The blocks were frontally sectioned and either stained with Goldner's trichrome, histoenzymatically labeled for tartrate resistant alkaline phosphatase (TRAP) activity or left unstained. Under a DMRB (Leica, Nanterre, France) microscope, the right hemi-calvaria in each section was divided into four fields of equal length (outlined in Fig. 2A). Histomorphometric measurements were performed in the third field from the sagittal suture (Fig. 2A), with the Bone Morpho software (Exploranova, La Rochelle, France). The thickness of the periosteum and of the underlying osteoid were measured on the external and internal surfaces in Goldner stained sections. Tetracyclin fluorescent labeling of mineralizing bone surfaces was visualized in unstained sections and used for the measurement of external and internal periosteal bone formation rate (BFR, in  $\mu$ m<sup>3</sup>/ $\mu$ m<sup>2</sup>/day), taken as the product of the mineral apposition rate (MAR,  $\mu$ m/day, measured from the distance between two tetracyclin labels) and the mineralizing surfaces (MS/BS, the fraction of the bone surface which was labeled, in %).

#### *Calvaria cell culture and PTH treatment:*

Primary osteoprogenitor cells were isolated from calvariae of neonatal (5-6 days old) mice of both genotypes by sequential enzymatic digestion with type 1 collagenase (Sigma Saint-Quentin Fallavier, France). After killing the mice by decapitation, the calvariae were dissected out, cleaned, cut along the sagittal suture and pooled. The fragments were then digested at 37°, under gentle stirring. After centrifugation, calvaria cells were collected and plated in T75 flasks in Eagle's minimum essential medium (Sigma) containing 2mM L-glutamine (Sigma), 50U/ml penicillin (Sigma), 50 $\mu$ g/ml streptomycin (Sigma), and 10% fetal calf serum (FCS). After 24h, attached cells were trypsinized and plated (5000 cells/cm<sup>2</sup>) either in 12 well plates (for dish staining and ELISA assay) or in 6 well plates (for QRT-PCR). Cultures were grown at 37°C under 5% CO<sub>2</sub>. The medium was supplemented with 50 $\mu$ g/ml acid ascorbic (Sigma) and 10mM  $\beta$ -glycerophosphate (Sigma) 24h after seeding. For intermittent PTH exposure, the cells received 50ng/ml hPTH 1-34 (Sigma) for 6 hours on day 1 and day 3 after seeding. In some PTH or control dishes, the cells were transfected for 6 hours at day 1 and 3 with 30nM (final concentration in the culture medium) siRNA (siOpn or

Scr, see above), using Hiperfect (Qiagen) according to the manufacturer's instructions, and then changed to fresh medium.

To perform measurement of alkaline phosphatase (ALP) activity, cells were harvest in lysis buffer. ALP activity was normalized on total protein content, measured with the BCA Protein Assay Kit (Interchim Pierce, Monluçon, France), according to manufacturer's instruction (Interchim Pierce, Monluçon, France). Alkaline phosphatase and Von Kossa staining were performed, on cells fixed with paraformaldehyde.

#### *RNA extraction and QPCR analysis:*

The right half of each calvaria was haversted after death, frozen in liquid nitrogen and crushed with a mixer mill (Retsch, France) using steel balls. RNA was extracted from the bone powder with Tri Reagent (Sigma), then purified on columns, according to the manufacturer's instructions (RNeasy Plus Mini Kit, Qiagen). Total RNA was isolated from calvaria cell cultures at day 6 or 13 with TriReagent. RNA concentration was assessed with the Ribogreen kit (Invitrogen, Life Technologies, Eugene, OR, USA); quality was assessed with the Experion automated electrophoresis station (BIO-RAD, Hercules, CA, USA). Messenger RNA was reverse-transcribed (iScript cDNA synthesis Kit, Biorad) according to manufacturer's instruction, then 400 ng of the cDNA were amplified through QRT-PCR using the SYBR Green I dye (Lightcycler faststart DNA master SYBR green I, Roche, Germany).

**Table 1 : PCR primer sequences in 5'–3' direction**

Gene	Forward	Reverse	Primer Bank ID
BSP	cggaggagacaacggagaag	gtaagtgtcgccacgaggct	NM_008318.3
OPN	cccggtgaaagtgactgattc	atggcttcattggaattgc	NM_009263.2
DMP1	ttcgagaacttcgctgaggt	ttgtggtatctggcaactgg	NM_016779.2
MEPE	ccccaagagcagcaaaggta	ctccgctgtgacatcccttta	NM_053172.2
PHEX	agaattctcaagggaatccaggg	tgactctcaataaagttgacacattt	NM_011077.2
Col1 $\alpha$ 1	caccctcaagagcctgagtc	ttaggcgcaggaaggctcagc	NM_007742.3
OSX	atggcgtcctctctgcttg	aaggtcagcgtatggcttct	NM_130458.3
OCN	ctctgacctcacagatgccaa	ctggtctgatagctcgtcaca	NM_007541.2
PTHR1	tgtgacaccaggcagcagta	agcggctccaagacttctta	NM_001083936
Cyclophilin A	tacacgccataatggcactg	ccatggctccacaatgttc	NM_008907.1
GAPDH	aaggctcgggtgaacggatt	attctcggccttgactgtgc	NM_008084

The meanings of the abbreviations are explained in the text.

Expression of the genes of interest was normalized to cyclophilin A for cell culture samples, and to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GADPH) for bone samples. The expression of either housekeeping gene was not changed by any experimental conditions in either genotype. Primer sequences of the transcripts amplified are listed in Table 1.

*OPN Immunoassay:*

ELISAs were performed on crushed calvaria bones harvested in lysis buffer, and on cell culture lysates, using the DuoSet mouse Osteopontin ELISA Development System (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer's instructions. The culture lysis buffer is composed of PBS with 0.5% Nonidet 40, 1% protease inhibition cocktail (PIC, Sigma), 1 $\mu$ L/mL triton (Sigma) and 1,8 mg/mL iodometacin (Sigma). Each sample was run in duplicate in the assays, and values were normalized to total protein content.

*Statistical analysis :*

Data are presented as mean $\pm$ SD, with N indicated in the figure legend. Statistical analysis was performed with the INSTAT software (version 3.00 for Windows 95, GraphPad, San Diego, CA). The Mann Whitney U test was used whenever two conditions were compared, and one way Anova with fisher's post-test for three conditions or more.

## Results

### **PTH treatment stimulates osteogenesis in BSP+/+ and BSP-/- calvaria bones:**

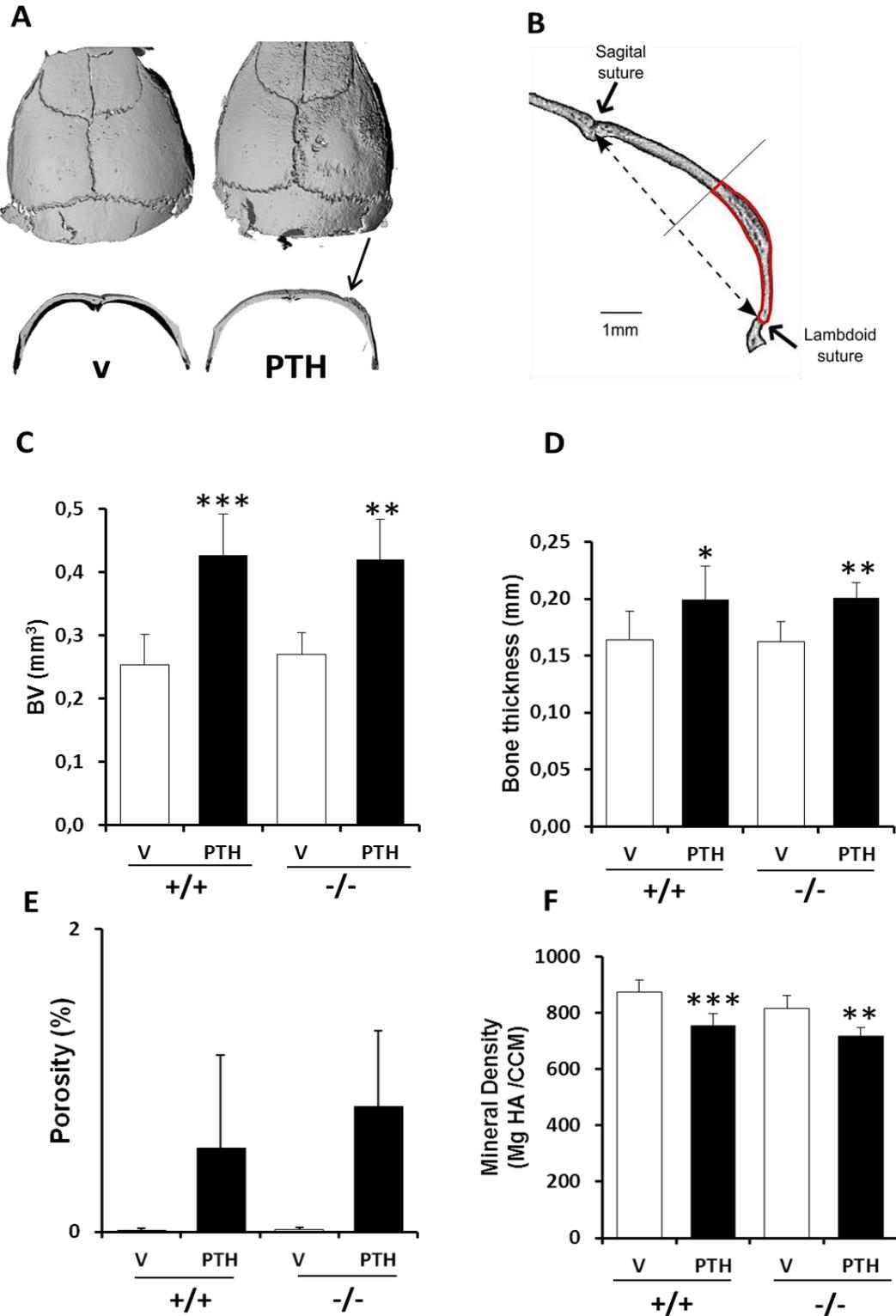
We tested the effects of intermittent local PTH injection over the right parietal bone in BSP+/+ and BSP-/- mice. PTH induced bone accrual on the injected site, as evidenced in Fig. 1A, B. Of note, major effects on calvaria bone thickness were located laterally respective to the injection site (Fig. 1B), suggestive of a lateral “sliding” of the liquid; the definition of the ROI for quantitative analysis (see above) took this aspect into account (Fig.1B, 2A). PTH treatment induced a significant increase in calvaria bone volume (Fig 1C) and total bone thickness (Fig 1D) in BSP+/+ and BSP-/- mice alike. PTH also induced an increase in bone porosity (Fig. 1E) and a decrease in mineral density (Fig. 1F), both probably reflecting the characteristics of the young bone actively formed.

### **Intermittent PTH treatment increases bone formation in calvariae of both BSP+/+ and BSP-/- mice, despite differences in baseline bone activity:**

Histological analysis of Goldner stained sections at day 16 confirmed the anabolic effect of iPTH on parietal bone in both genotype (Fig 2B). Histomorphometric assessment of static and dynamic bone formation parameters in vehicle treated mice showed low levels of activity in the external or internal surface of BSP+/+ calvariae, and virtually none in the BSP-/- (Fig. 2C-F). This was particularly flagrant on the internal calvaria surface, where no osteoid layer could be detected in BSP-/- mice (Fig. 2D). Remarkably, PTH boosted the expression of all histomorphometric markers of bone formation in both phenotypes, as witnessed by the increase in osteoid thickness (Fig. 2C-D), as well as both MAR and MS/BS (Fig. 2E-F). In the BSP-/- in particular, iPTH reactivated inactive bone surfaces to values on a par with BSP+/+ mice, even though they were always lower except for MS/BS (Fig. 2E and F).

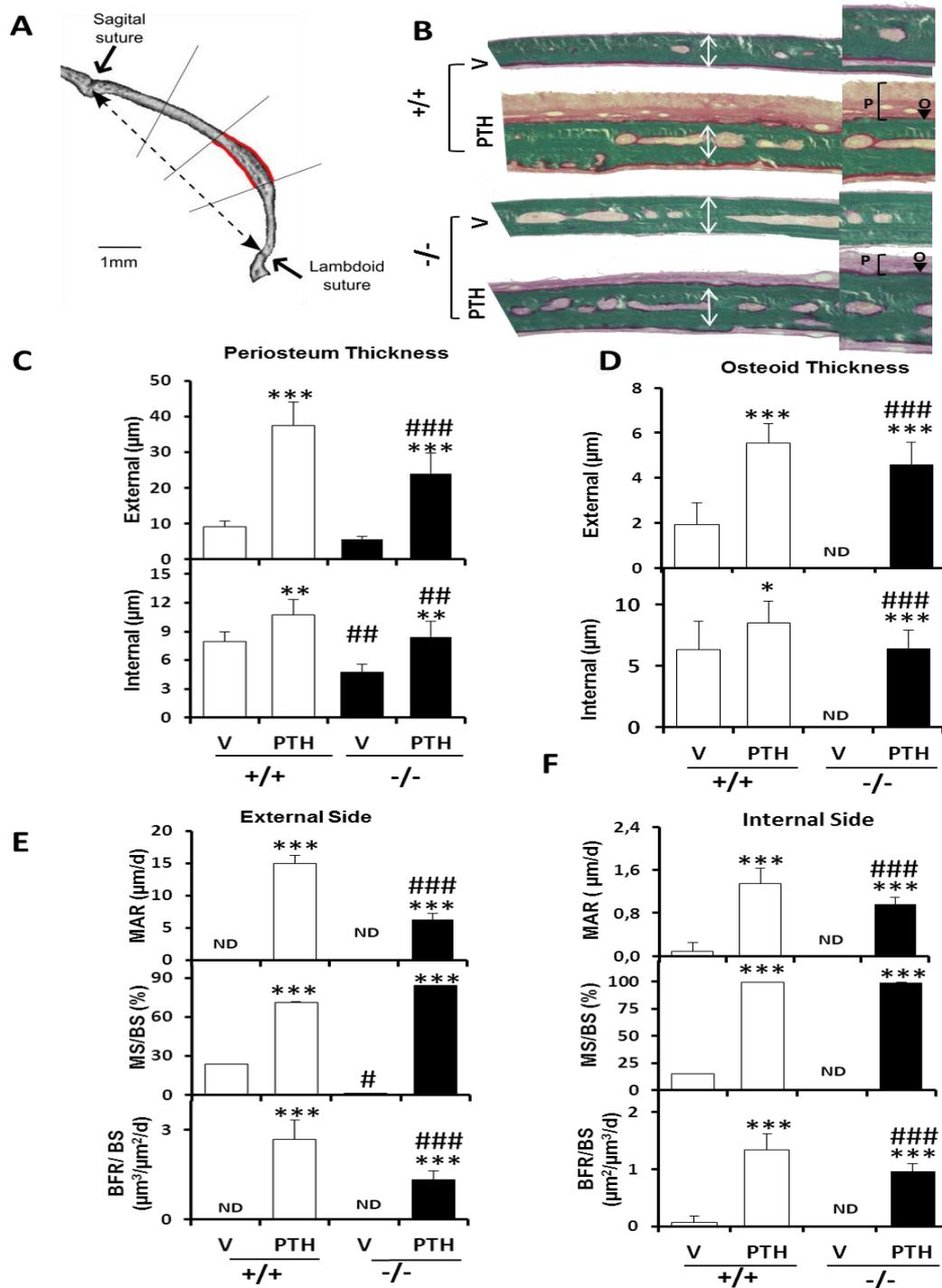
Despite a basic difference in resorption parameters, osteoclasts numbers (data not shown) of and osteoclast surfaces between the two genotypes (Oc.S/BS:  $1.23 \pm 0.01$  Vs  $-/- 0.08 \pm 0.00$ ), intermittent exposure to PTH induced an increase of these parameters at the external side (Oc.S/BS:  $34.50 \pm 0.09$  Vs  $9.07 \pm 0.03$ ), but with a more pronounced effect in BSP+/+ mice.

At the internal side, in basic conditions, no osteoclasts were observed in both genotypes. The intermittent exposure to PTH induces an increase in resorption parameters of the internal side only in the wild type (Data not shown).



Bouleftour et al., Figure 1

**Fig1: PTH enhances osteogenesis in vivo in BSP+/+ and BSP-/- calvaria bones.**(A) Three-dimensional  $\mu$ CT reconstruction of calvaria bones, after sixteen days of PTH of vehicle (V) injection on the right parietal bone. The arrows mark the location of the bone sutures. (B) ROI determination for  $\mu$ CT analysis: The distance between the sagittal and the lamboid suture was measured. The ROI (outlined in red) for microtomographic imaging and measurements was restricted to the external half of the parietal bone. Bone volume (C), bone thickness (D) and bone porosity (E) were measured on the injected side of parietal bones. Values are mean $\pm$ SD of N=4 V samples, N=10 PTH samples for each genotype. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$  \*\*\*:  $p < 0.001$  vs PTH, Mann-Whitney U test.



Bouletfour et al., Figure 2

**Fig 2: Effects of intermittent PTH treatment on cellular activity parameters of bone formation in parietal bone.** (A) ROI determination for histomorphometry: The distance between the sagittal and the lambdoid suture was divided into four equal parts (black line). Histomorphometric analyzes were carried out in the area outlined in red. (B) Goldner stained histological sections of parietal bone illustrating the effects of intermittent vehicle (V) or PTH injections over BSP+/+ and BSP-/- calvariae. Higher magnifications on the right locate the osteoid layer (O, black arrowhead) and the periosteum (P, bracket). White double arrows indicate the thickness of V treated calvariae. (C) Thickness of the external and internal periosteum, (D) osteoid thickness, (E) dynamic bone formation parameters: MAR, MS/BS and BFR/BS measured at day 16 in the ROI. Values are mean ± SD of N=4 V samples, N=10 PTH samples for each genotype. \* p< 0.05, \*\* p< 0.01 \*\*\* p<0.001 vs PTH. #: p<0.05, ##: p<0.01, #### : p<0.001 vs treatment-matched BSP+/+. (ND: not detectable).

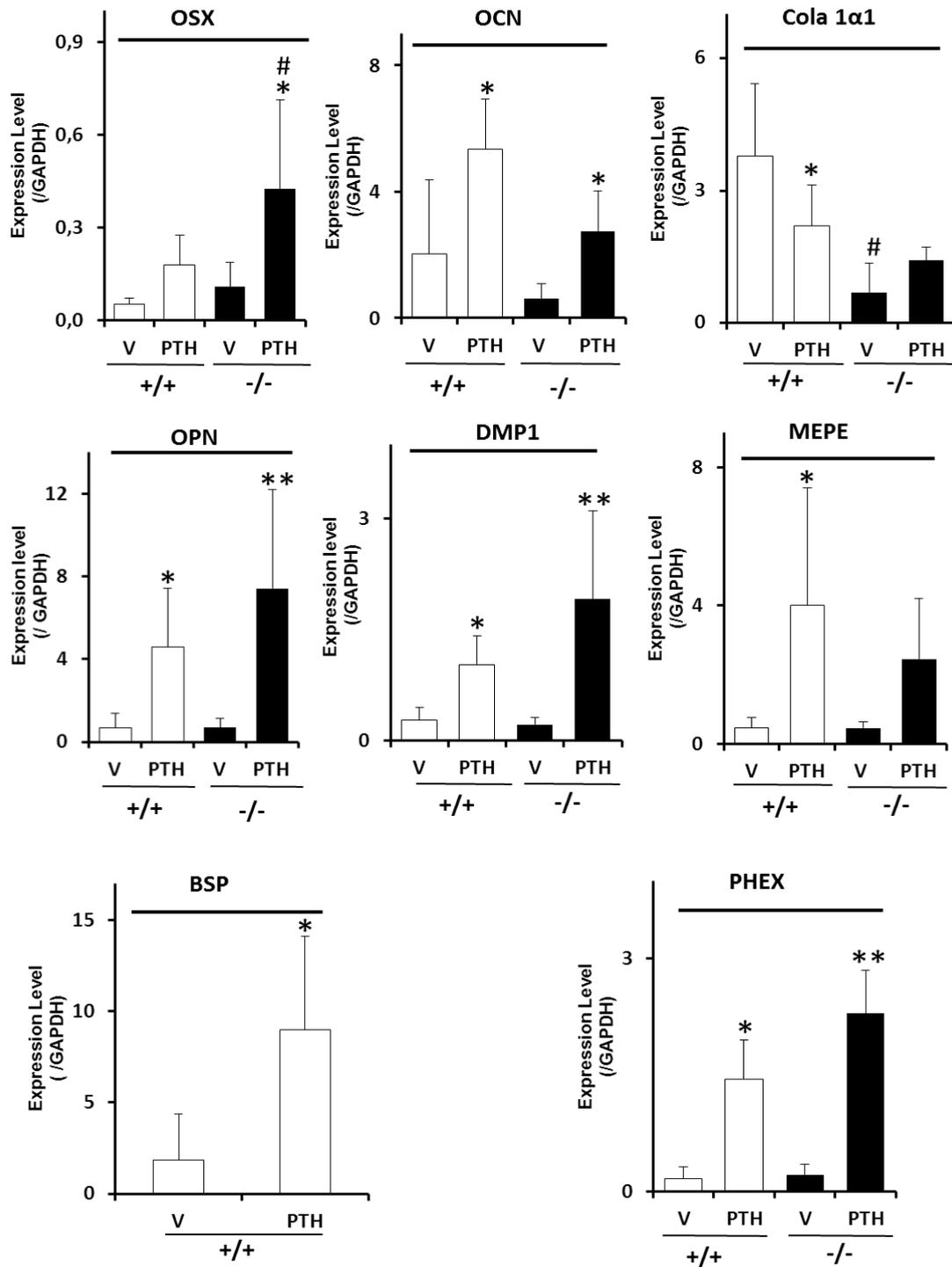
**PTH increases the expression of bone formation markers, including all SIBLING proteins in calvaria bone of BSP+/+ and BSP-/- mice:**

Sixteen day after the start of the injections, mRNA expression of all markers was the same in vehicle injected BSP+/+ and BSP-/- calvariae, with the exception of type I collagen ( $\alpha 1$  chain, Col1 $\alpha 1$ ) which was significantly less expressed in the mutants (Fig. 3). As expected in such strongly anabolic conditions, expression of the early marker of osteoblast differentiation osterix (OSX) and the late marker osteocalcin (OCN) was increased in both genotypes under PTH. Col1 $\alpha 1$  was again an exception, as its expression was reduced by PTH in BSP+/+ calvariae, with no significant change in the BSP-/-. Expression OPN, DMP1 and MEPE was increased by PTH in all genotypes, along with BSP in BSP+/+ calvariae. Expression of PHEX (Phosphate regulating Endopeptidase Homolog, X-linked) was also enhanced by PTH in both genotypes.

**PTH increases the expression of osteoblast markers and bone colony mineralization in BSP+/+ and BSP-/- calvaria cell cultures:**

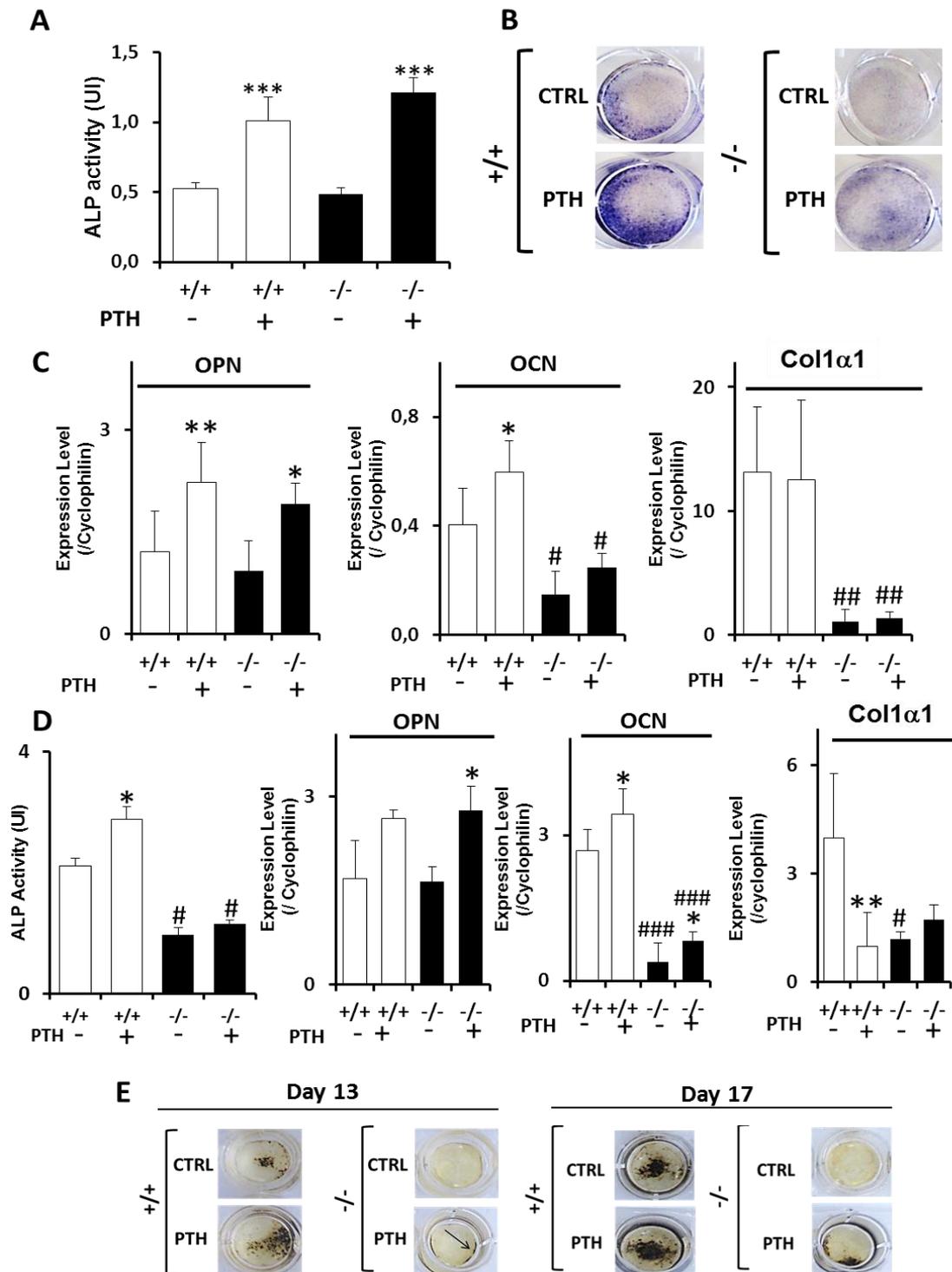
In order to assess the direct effect of PTH on calvaria osteoblasts, cellular populations isolated from BSP+/+ and BSP-/- pups were grown in vitro in osteogenic medium and treated with hPTH 1-34. As previously reported for BSP-/- bone marrow cultures [13], calvaria cell cultures from mutant mice formed very few mineralized colonies, which are the last stage of in vitro primary osteogenesis (see Fig. 4E). At day 6 in our cultures, ALP activity was significantly upregulated in both genotypes (+55%, Fig. 4A) by two 6h pulses of PTH (see Methods), as was confirmed by dish staining for enzyme activity (Fig 4B). At this stage, QRT-PCR already showed a significant expression of OCN and Col1 $\alpha 1$  in untreated BSP+/+ dishes, indicative of osteoblastic differentiation and bone matrix deposition, while much lower levels were observed in BSP-/- cultures (Fig. 4C). PTH upregulated the expression of OCN and OPN in cultures, while it had no effect on Col1 $\alpha 1$  expression (Fig. 4C). To check whether this short exposure of mutant progenitors to PTH had an impact on the later mineralization of the cultures, we performed the same assay over a longer culture time. After 13 days, ALP activity was found increased by the early PTH pulses only in BSP+/+ dishes (Fig. 4D). Baseline expression of OCN and Col1 $\alpha 1$  was way higher at this stage in BSP+/+ than in BSP-/- cultures, in congruence with the later differentiation and mineralization stage. iPTH treatment increased the expression of OCN and OPN in both genotypes (Fig 4D). Of note, OPN was the only SIBLING whose expression was increased by PTH in calvaria cultures at any time (data not shown). Similar to in vivo, the expression of Col1 $\alpha 1$  was decreased by PTH in BSP+/+ dishes, with no significant effect in BSP-/- culture (Fig. 4D). Early pulse treatment of BSP-/- cells with PTH induced the mineralization of later cultures,

still incipient at day 13 but quite significant although always lower than in BSP+/+ at day 17 (Fig 4E).



Boulefour et al., Figure 3

**Fig 3: Intermittent PTH increases the expression of markers of bone formation in both genotypes.** QRT-PCR was performed 16 days after PTH injection on half-calvaria treated or not with PTH and pulverized in Tri-reagent. mRNA expression of markers of bone formation : OSX, OCN, Cola1 $\alpha$ 1, and PHEX, and SIBLING proteins OPN, DMP1 MEPE and BSP. Values are mean $\pm$ SD of N=4 V samples, N=10 PTH samples for each genotype.. \*: p< 0.05, \*\*: p< 0.01 \*\*\*: p<0.001 vs PTH. #: P<0.05 vs treatment-matched BSP+/+.



Bouleftour et al., Figure 4

**Fig 4: Intermittent PTH treatment enhances osteogenesis and mineralization in BSP-/- calvaria cell cultures.** Alkaline phosphatase activity (A) and staining (B) after 6 days (d6) of mouse calvaria cell culture. (C) mRNA expression of OPN, OCN and Cola1α1 at d6. (D) Alkaline phosphatase activity and marker mRNA expression after at d13. (E) Van kossa staining of mineralized cultures at d13 and (G) at d17. Values are mean±SD of N=6 dishes for ALP activity and N=3 for QRT-PCR. \*: p< 0.05, \*\*: p< 0.0,1 \*\*\*: p<0.001 vs PTH treatment. #: p<0.05 , ##: p <0.01, ###: p< 0.001 vs treatment-matched BSP+/+.

### **Effective silencing of OPN expression by siOPN *in vitro* and *in vivo* :**

The inhibition of OPN expression by siOPN was assessed by ELISA and QRT-PCR *in vivo* (day 16 of daily treatment) and *in vitro* (day 6 after pulse 6hr treatments at day 1 and 3). In calvaria cell cultures siOPN treatment induced a significant decrease in OPN mRNA (Fig. 5A) and protein expression (Fig. 5B) in both genotypes, while Scr treated dishes displayed the same level of OPN expression as vehicle treated controls. In PTH-injected calvariae, expression of OPN measured by ELISA was decreased by 80% respective to PTH+Scr treated animals (Fig 5C).

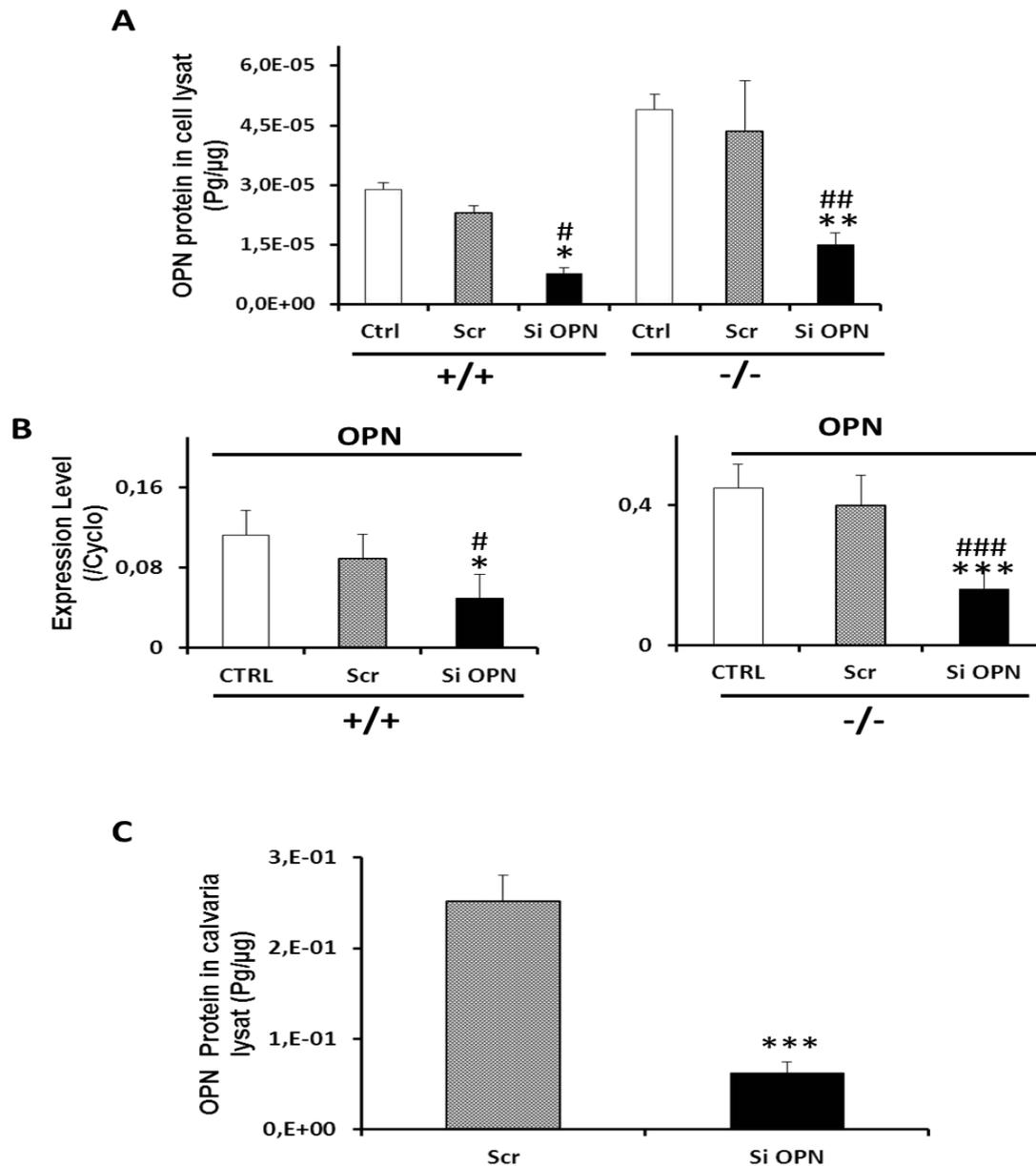
### **Absence of both BSP and OPN quenches the anabolic effect of PTH in calvaria bone:**

Addition of Scr or siOPN to the daily injection of PTH over the calvariae of BSP+/+ mice resulted in the same increase in bone volume, porosity or thickness (Fig. 6A) respective to vehicle control. In contrast, while Scr RNA did not hamper the anabolic effect of iPTH in BSP-/- calvariae, siOPN blocked it, resulting in structural parameter values which did not differ from controls (Fig. 6A, C). Histological analysis revealed an increase in the thickness of external and internal periosteum in BSP+/+ calvariae treated with siOPN or Scr+PTH cocktails (Fig. 6B). PTH did increase periosteum thickness in BSP-/- calvariae co-treated with siOPN, but the effect was significantly lower than in Scr+iPTH controls (Fig. 6C).

In terms of osteoblast markers, mRNA expression of OCN was increased in BSP+/+ calvariae under PTH+siOPN treatment respective to Scr and vehicle, although the increase in the PTH+Scr group was not significant (Fig. 6D). In contrast, while the stimulation of OCN expression by PTH+Scr was significant in BSP-/- mice, blocking OPN expression with siOPN also blocked this effect and kept the values the same level as in the vehicle group (Fig. 6D). As mentioned, PTH treatment increased BSP expression in BSP+/+ mice, and this effect was enhanced when OPN expression was blocked (Fig. 6E).

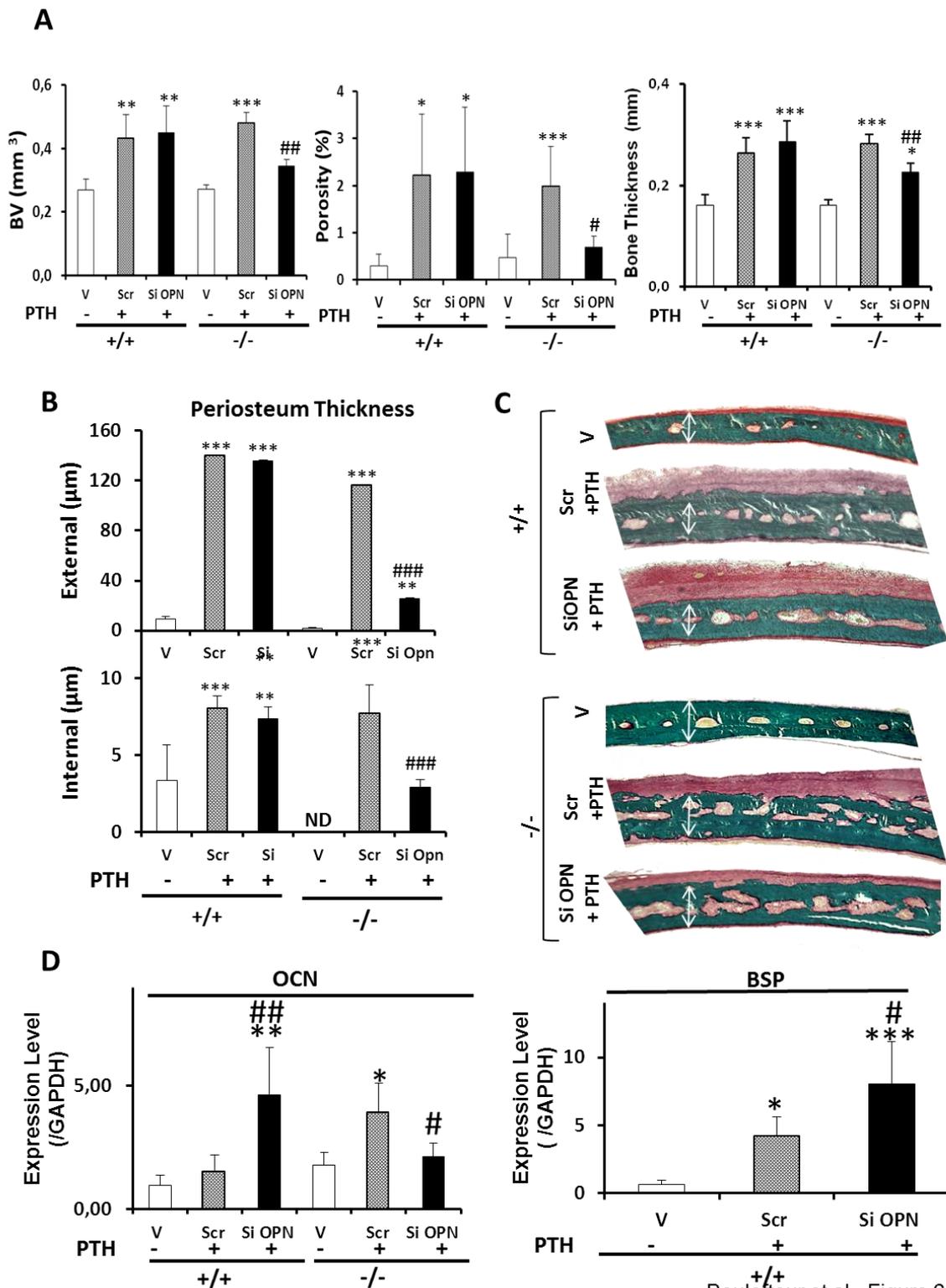
### **Inhibiting OPN expression in BSP-/- calvaria cell cultures blocks the PTH-induced stimulation of osteogenic markers:**

In calvaria cell cultures, inhibition of OPN expression also blunted the anabolic effect on PTH in BSP-/-, not BSP+/+ cultures. Concomitant administration of siOPN or Scr and PTH induced a similar increase as PTH alone in ALP staining (Fig. 7A) or activity (Fig. 7B) in wild type cultures, while only PTH alone or PTH+Scr increased ALP activity in mutant cells (Fig 7A, B). Again, In BSP+/+ cultures, mRNA expression of OCN was significantly higher in siOPN+PTH dishes respective to Scr+PTH or PTH alone (Fig. 7B). In contrast, siOPN+PTH treatment significantly decreased the expression of OCN in BSP-/- cells cultures compared to Scr+PTH or PTH alone (Fig 7B).



Boulefour et al., Figure 5

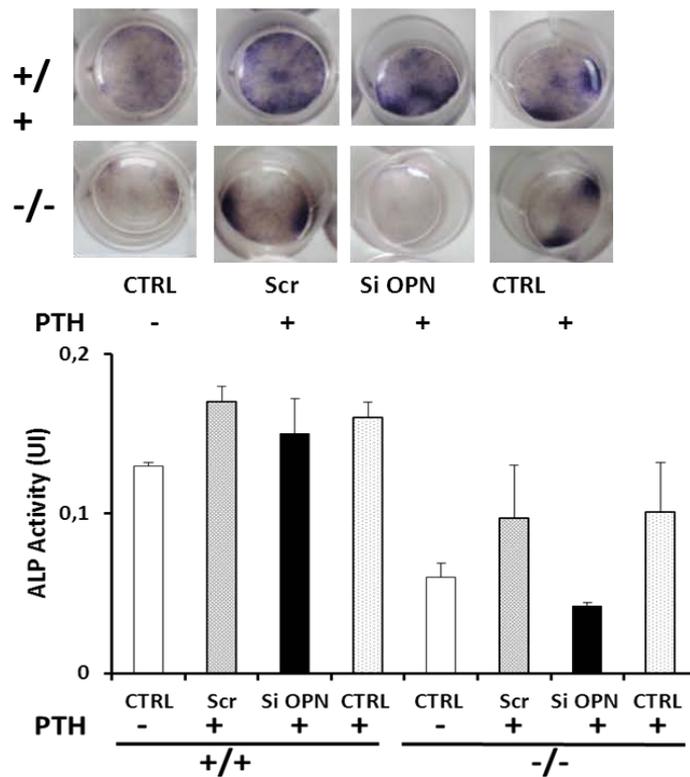
**Fig 5: Effective silencing of OPN expression in vitro and in vivo.** The extinction of the OPN expression was assessed by ELISA assay in vitro and in vivo. (A) Quantitation of OPN protein and (B) mRNA expression in lysates of calvaria cell cultures from BSP+/+ (+/+) and -/- mice, untreated (CTRL) or treated with a scrambled ARN (Scr) or an siRNA targeting OPN messenger (siOPN). (C) Quantitation of OPN protein in calvaria lysates of BSP-/- mice treated or not with scrambled or OPN targeting RNA. Values are mean±SD of N=3 to 6 calvaria or dishes. \* : p< 0.05 \*\*\*: p<0.001 vs CTRL. #: p<0.05, ####: p< 0.001 vs Scr.



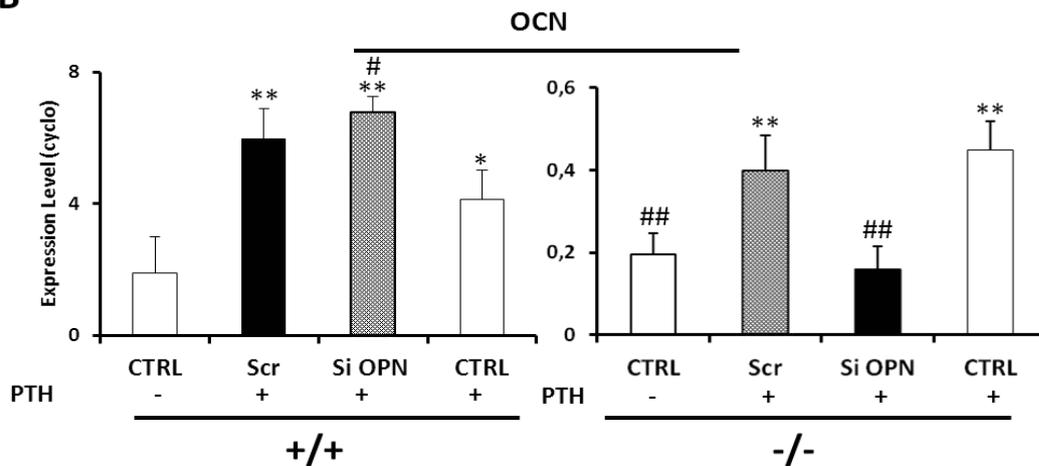
Bouletour et al., Figure 6

**Fig 6: OPN silencing blunts the anabolic effect in BSP<sup>-/-</sup> calvariae. (A) bone volume, bone porosity and bone thickness, (B) periosteum thickness and (C) Goldner-stained histological sections of calvaria bones of BSP<sup>+/+</sup> (+/+) or <sup>-/-</sup> mice treated with vehicle (V) or PTH with scrambled RNA (Scr) or siOPN RNA.. White double arrows indicate the thickness of V treated calvariae. (D) mRNA expression of OCN and BSP and mice treated as above. Values are mean± SD of N=5 (histomorphometry) or 6 (QRT-PCR) mice for each condition. \*: p< 0.05, \*\*: p< 0.01, \*\*\*: p<0.001 vs V, #: p<0.05 , ##: p<0.01. ###: p< 0.001 vs Scr.**

A



B



Bouleftour et al., Figure 7

Fig 7: OPN silencing blocks the PTH-induced stimulation of osteogenic markers in BSP-/- calvaria cell cultures. (A) Alkaline phosphatase staining (top) and activity (bottom) in BSP+/+ (+/+) and -/- mouse calvaria cell cultures untreated (CTRL) or treated with PTH with scrambled RNA (Scr) or siOPN RNA. (C) Blocking OPN expression in PTH treated dishes stimulates OCN expression in +/+ calvaria cell cultures and inhibits it in -/- cultures. Values are mean  $\pm$  SD of N=3 per wells. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$  \*\*\*:  $p < 0.001$  vs CTRL (-); ##:  $p < 0.01$ : vs Scr.

**Discussion:**

The calvaria injection procedure developed by Boyce et al. (Boyce et al., 1989) is an original model for studying the local effects of substances on bone activity *in vivo*. Previous work from our laboratory had shown that the skeletal effect of systemic iPTH on long bones of BSP<sup>-/-</sup> mice is site dependent, enhancing the endosteal bone formation in BSP<sup>+/+</sup> femur, but periosteal formation in mutant femur (Wade-Gueye et al., 2010). These results suggested that iPTH might not act in the same way in wild type and mutant skull bones. We show here that the genetic extinction of BSP does not affect the anabolic response of calvaria bone to iPTH. Indeed, PTH induced periosteal responses in BSP<sup>-/-</sup> calvariae which were on a par with those observed in BSP<sup>+/+</sup>, albeit lower, even though baseline activity was not detectable in the absence of BSP (Fig. 2).

*In vitro*, the number of mature osteoblast colonies (CFU-O = colonies double-positive for ALP activity and mineral deposition) is dramatically reduced in BSP<sup>-/-</sup> bone marrow stromal cell cultures (Malaval et al., 2008), and BSP overexpression induces an increase in the activity of alkaline phosphatase and the number of mineralized bone nodules (Valverde et al., 2008). To check if iPTH restores the differentiation and mineralization of calvaria osteoblasts in the absence of BSP, we treated calvaria cell cultures with the hormone. PTH exerts disparate effects on osteoblast differentiation *in vitro*, stimulating it after short exposure time while it is inhibitory in continuous treatment, as documented for instance in rat osteoblastic cells (Ishizuya et al., 1997). The protocol that we used to treat our mouse calvaria cell cultures was inspired by previously published ones which were efficiently anabolic in Sprague-Dawley rat calvaria cells (Ishizuya et al., 1997) and the mouse MC3T3-E1 cell line (Tian et al., 2011). In these conditions, exposure to PTH was also anabolic in BSP<sup>-/-</sup> calvaria cell cultures, increasing ALP staining after 6 days and even more strikingly mineralization in the dishes after 17 days. Stimulation of bone formation was reflected, *in vivo* and *in vitro* by the expression of osteoblast marker genes, all upregulated with the exception of Col1 $\alpha$ 1. The effect of PTH on the kinetics of collagen transcript expression is not very clear; however most studies (Sugimoto et al., 1992)(Partridge et al., 1994) report that PTH treatment induces a decrease in Col1 $\alpha$ 1 expression, which is consistent with our results (Fig 3 and 4D).

The anabolic effect of iPTH exposition in BSP<sup>-/-</sup> mice suggests a mechanism that compensates for the absence of this protein. Next to the increase in bone formation parameters, systemic injections of PTH were found to induce a significant increase of OPN expression in BSP<sup>-/-</sup>, not BSP<sup>+/+</sup> mice (Wade-Gueye et al., 2010). In our calvaria model, the expression of OPN was increased by iPTH *in vivo* and *in vitro* in both genotypes (Fig 3, 4C). Of note, this was not systematically the case in calvaria cultures (compare Fig 4C and Fig 5A). Kinetics of OPN expression in BSP<sup>-/-</sup> bone marrow cell cultures showed that its expression

was higher than in wild type at early and late time points, and similar to wild type at the peak of OCN expression, which is in part dependent on the kinetics of each culture (Malaval et al., 2008). Detailed analysis of BSP<sup>+/+</sup> and BSP<sup>-/-</sup> calvaria cell culture kinetics show the same pattern (our unpublished results).

Based on these results, we hypothesized that OPN might compensate for the lack of BSP in mutant bones and thus permit a globally normal response to PTH treatment. To test for this, we used an siRNA to block the expression of OPN in vitro and in vivo. The efficiency of siOPN was notably greater in blocking the synthesis of OPN protein (down by ~80 %) than with OPN transcripts (~50 % inhibition), suggesting that its major action is in blocking the translation of the target protein (Ryther et al., 2004).

Microtomography and histomorphometry and QRT-PCR analysis showed that blocking the expression of OPN impaired the anabolic effect of PTH in iPTH treated BSP<sup>-/-</sup>, but not BSP<sup>+/+</sup> calvariae. In PTH+siOPN treated BSP<sup>-/-</sup> calvariae, the hormone had no effect on bone volume or porosity, and a significantly lower effect on calvaria thickness as compared to Scr+PTH treated animals (Fig 6). While blocking OPN also inhibited OCN stimulation by iPTH, periosteum thickness was still significantly increased. These residual effects may reflect the fact that the siOPN is not fully effective (only ~80% inhibition) nor is its action likely to be permanent between two injections. Additionally, while expression of at least BSP or OPN appears mandatory for a full action of iPTH (see below), all effects of the treatment are likely not dependent solely on these two SIBLING.

In BSP <sup>+/+</sup> calvariae, blocking OPN expression did not affect the anabolic action of PTH. Indeed, OCN expression was greater in siOPN than Scr co-treated BSP<sup>+/+</sup> calvariae (Fig 6D) and calvaria cell cultures (Fig 7 B), which could reflect the suppressive effect of OPN on PTH signaling of osteoblast (Ono et al., 2008). Additionally, blocking OPN induced a higher mRNA expression of BSP in wild type mice (Fig 6D), suggesting that BSP might also compensate for absent/reduced OPN in the skeleton. Whether this could contribute to explain that intermittent PTH treatment is anabolic in OPN<sup>-/-</sup> mice (Kitahara et al., 2003) warrants further investigations.

In conclusion, we have shown that the extinction or at least the reduced expression of both OPN and BSP proteins impairs the anabolic effect of PTH, at least in the ectopic calvaria injection model. This suggests that OPN may functionally compensate for the lack of BSP in the response of this hormonal challenge, and provides evidence of functional overlap between these two cognate proteins.

## References

- [1] M. MacDougall, D. Simmons, T. T. Gu, et J. Dong, « MEPE/OF45, a new dentin/bone matrix protein and candidate gene for dentin diseases mapping to chromosome 4q21 », *Connect. Tissue Res.*, vol. 43, n° 2-3, p. 320-330, 2002.
- [2] P. S. Rowe, P. A. de Zoysa, R. Dong, H. R. Wang, K. E. White, M. J. Econs, et C. L. Oudet, « MEPE, a new gene expressed in bone marrow and tumors causing osteomalacia », *Genomics*, vol. 67, n° 1, p. 54-68, juill. 2000.
- [3] L. W. Fisher et N. S. Fedarko, « Six genes expressed in bones and teeth encode the current members of the SIBLING family of proteins », *Connect. Tissue Res.*, vol. 44 Suppl 1, p. 33-40, 2003.
- [4] N. L. Huq, K. J. Cross, M. Ung, et E. C. Reynolds, « A review of protein structure and gene organisation for proteins associated with mineralised tissue and calcium phosphate stabilisation encoded on human chromosome 4 », *Arch. Oral Biol.*, vol. 50, n° 7, p. 599-609, juill. 2005.
- [5] L. W. Fisher, D. A. Torchia, B. Fohr, M. F. Young, et N. S. Fedarko, « Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin », *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 280, n° 2, p. 460-465, janv. 2001.
- [6] W. N. Addison, D. L. Masica, J. J. Gray, et M. D. McKee, « Phosphorylation-dependent inhibition of mineralization by osteopontin ASARM peptides is regulated by PHEX cleavage », *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.*, vol. 25, n° 4, p. 695-705, avr. 2010.
- [7] W. N. Addison, Y. Nakano, T. Loisel, P. Crine, et M. D. McKee, « MEPE-ASARM peptides control extracellular matrix mineralization by binding to hydroxyapatite: an inhibition regulated by PHEX cleavage of ASARM », *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.*, vol. 23, n° 10, p. 1638-1649, oct. 2008.
- [8] A. L. Boskey, M. Maresca, W. Ullrich, S. B. Doty, W. T. Butler, et C. W. Prince, « Osteopontin-hydroxyapatite interactions in vitro: inhibition of hydroxyapatite formation and growth in a gelatin-gel », *Bone Miner.*, vol. 22, n° 2, p. 147-159, août 1993.
- [9] L. Malaval, N. M. Wade-Guéye, M. Boudiffa, J. Fei, R. Zirngibl, F. Chen, N. Laroche, J.-P. Roux, B. Burt-Pichat, F. Duboeuf, G. Boivin, P. Jurdic, M.-H. Lafage-Proust, J. Amédée, L. Vico, J. Rossant, et J. E. Aubin, « Bone sialoprotein plays a functional role in bone formation and osteoclastogenesis », *J. Exp. Med.*, vol. 205, n° 5, p. 1145-1153, mai 2008.
- [10] M. A. Chellaiah, N. Kizer, R. Biswas, U. Alvarez, J. Strauss-Schoenberger, L. Rifas, S. R. Rittling, D. T. Denhardt, et K. A. Hruska, « Osteopontin deficiency produces osteoclast dysfunction due to reduced CD44 surface expression », *Mol. Biol. Cell*, vol. 14, n° 1, p. 173-189, janv. 2003.

- [11] H. Yoshitake, S. R. Rittling, D. T. Denhardt, et M. Noda, « Osteopontin-deficient mice are resistant to ovariectomy-induced bone resorption », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 96, n° 14, p. 8156-8160, juill. 1999.
- [12] M. Ishijima, K. Tsuji, S. R. Rittling, T. Yamashita, H. Kurosawa, D. T. Denhardt, A. Nifuji, et M. Noda, « Resistance to unloading-induced three-dimensional bone loss in osteopontin-deficient mice », *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.*, vol. 17, n° 4, p. 661-667, avr. 2002.
- [13] K. Kitahara, M. Ishijima, S. R. Rittling, K. Tsuji, H. Kurosawa, A. Nifuji, D. T. Denhardt, et M. Noda, « Osteopontin deficiency induces parathyroid hormone enhancement of cortical bone formation », *Endocrinology*, vol. 144, n° 5, p. 2132-2140, mai 2003.
- [14] N. M. Wade-Gueye, M. Boudiffa, N. Laroche, A. Vanden-Bossche, C. Fournier, J. E. Aubin, L. Vico, M.-H. Lafage-Proust, et L. Malaval, « Mice Lacking Bone Sialoprotein (BSP) Lose Bone after Ovariectomy and Display Skeletal Site-Specific Response to Intermittent PTH Treatment », *Endocrinology*, vol. 151, n° 11, p. 5103-5113, sept. 2010.
- [15] M. Boudiffa, N. M. Wade-Gueye, A. Guignandon, A. Vanden-Bossche, O. Sabido, J. E. Aubin, P. Jurdic, L. Vico, M. H. Lafage-Proust, et L. Malaval, « Bone sialoprotein deficiency impairs osteoclastogenesis and mineral resorption in vitro », *J. Bone Miner. Res.*, vol. 25, n° 12, p. 2669-2679, déc. 2010.
- [16] B. F. Boyce, T. B. Aufdemorte, I. R. Garrett, A. J. Yates, et G. R. Mundy, « Effects of interleukin-1 on bone turnover in normal mice », *Endocrinology*, vol. 125, n° 3, p. 1142-1150, sept. 1989.
- [17] P. Valverde, J. Zhang, A. Fix, J. Zhu, W. Ma, Q. Tu, et J. Chen, « Overexpression of bone sialoprotein leads to an uncoupling of bone formation and bone resorption in mice », *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.*, vol. 23, n° 11, p. 1775-1788, nov. 2008.
- [18] T. Ishizuya, S. Yokose, M. Hori, T. Noda, T. Suda, S. Yoshiki, et A. Yamaguchi, « Parathyroid hormone exerts disparate effects on osteoblast differentiation depending on exposure time in rat osteoblastic cells », *J. Clin. Invest.*, vol. 99, n° 12, p. 2961-2970, juin 1997.
- [19] Y. Tian, Y. Xu, Q. Fu, et M. He, « Parathyroid hormone regulates osteoblast differentiation in a Wnt/ $\beta$ -catenin-dependent manner », *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 355, n° 1-2, p. 211-216, sept. 2011.
- [20] T. Sugimoto, J. Kano, M. Fukase, et T. Fujita, « The activation of cAMP-dependent protein kinase is directly linked to homologous desensitization by parathyroid hormone (PTH) and PTH-related peptide in osteoblastic osteosarcoma cells », *Horm. Metab. Res. Horm.- Stoffwechselforschung Horm. Métabolisme*, vol. 24, n° 7, p. 347-348, juill. 1992.
- [21] N. C. Partridge, S. R. Bloch, et A. T. Pearman, « Signal transduction pathways mediating parathyroid hormone regulation of osteoblastic gene expression », *J. Cell. Biochem.*, vol. 55, n° 3, p. 321-327, juill. 1994.

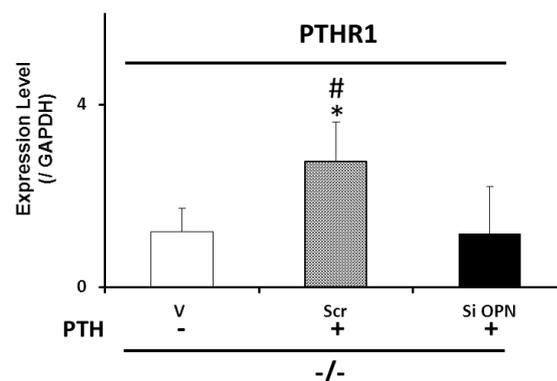
[22] R. C. C. Ryther, A. S. Flynt, B. D. Harris, J. A. Phillips 3rd, et J. G. Patton, « GH1 splicing is regulated by multiple enhancers whose mutation produces a dominant-negative GH isoform that can be degraded by allele-specific small interfering RNA (siRNA) », *Endocrinology*, vol. 145, n° 6, p. 2988-2996, juin 2004.

[23] N. Ono, K. Nakashima, S. R. Rittling, E. Schipani, T. Hayata, K. Soma, D. T. Denhardt, H. M. Kronenberg, Y. Ezura, et M. Noda, « Osteopontin negatively regulates parathyroid hormone receptor signaling in osteoblasts », *J. Biol. Chem.*, vol. 283, n° 28, p. 19400-19409, juill. 2008.

## Résultats et discussion complémentaire :

Dans ce travail, nous avons démontré une vicariance entre la BSP et l'OPN dans un modèle de réponse à un défi hormonal suite à une exposition à la PTH. En effet le blocage de l'expression de l'OPN dans des souris déficientes en BSP abolit très largement l'effet anabolique de la PTH.

Le PTHR1 est un récepteur de la PTH et du PTHrP. Son activité est médiée par les protéines G. Un traitement intermittent par la PTH, dans les conditions de déficiences en BSP et de blocage de l'expression de l'OPN n'induit pas d'augmentation de l'expression en ARNm du PTHR1, contrairement au traitement avec le cocktail Scr+PTH qui induit une augmentation des transcrits du PTHR1 et qui accompagne l'effet anabolique de la PTH (Figure 32). La non augmentation de l'expression du PTHR1 en présence de SiOPN pourrait expliquer en partie l'absence de l'effet anabolique à la PTH chez les souris BSP<sup>-/-</sup> dans ces conditions. Cependant, il nous reste à établir l'effet de ces traitements sur l'expression de PTHR1 chez les souris BSP<sup>+/+</sup> (travail en cours), et aucune étude publiée à ce jour ne détaille le lien existant entre ces deux SIBLING et le récepteur de la PTH.



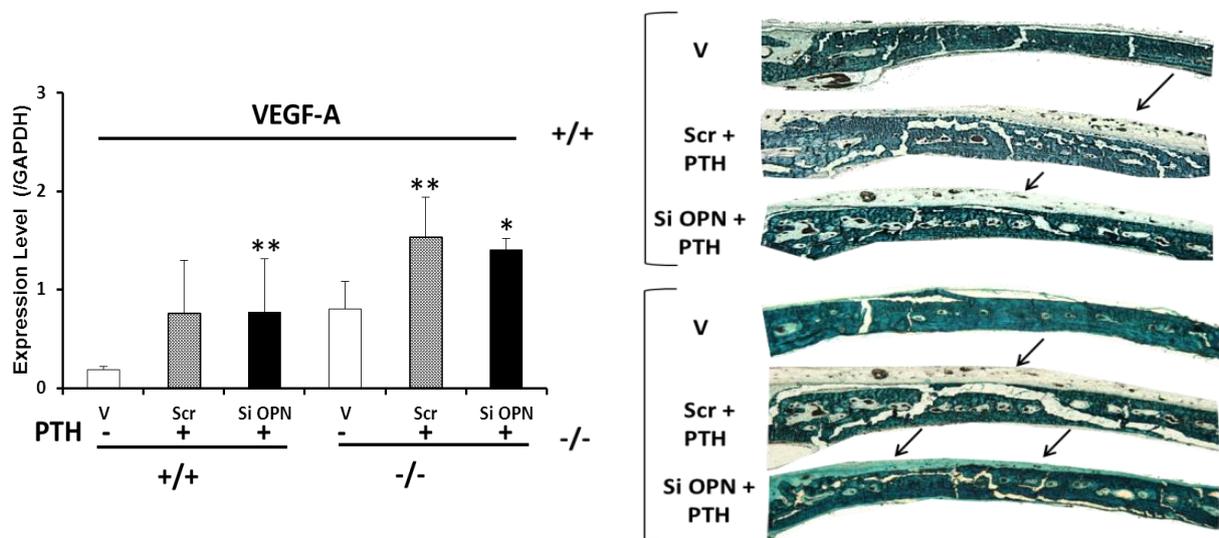
**Figure 32 : Expression en ARNm du récepteur à la PTH chez les souris déficientes en BSP. \* <0.05 VS V, # < 0.05 VS Si OPN**

Les effets angiogéniques de la PTH ne sont pas retrouvés de façon constante dans l'os. L'administration intermittente de la PTH 1-84 pendant 15 jours chez le rat n'apparaît pas angiogéniques malgré une stimulation précoce et fugace de l'expression en ARNm du VEGF (Prisby et al., 2011). D'autres données de la littérature fournissent des arguments en faveur d'un potentiel angiogénique de la PTH, reposant sur la capacité de l'hormone à stimuler

d'autres facteurs angiogéniques tels que le VEGF, dont l'expression suite à un traitement à la PTH, été trouvée augmentée dans les HUVECs (Rashid et al., 2007).

Nous nous sommes donc demandés si la iPTH dans un modèle d'injection sur de l'os pariétal possède des propriétés angiogéniques et si le blocage de l'expression de l'OPN inhibe cette propriété de la parathormone.

Les résultats obtenus (Figure 33) montrent qu'en effet l'injection intermittente de PTH augmente le nombre de vaisseaux dans le périoste des souris BSP+/+ et BSP-/-, d'une manière concomitante avec l'augmentation de son épaisseur et de l'expression génique du VEGF (Figure 33). De manière intéressante, le blocage de l'expression de l'OPN n'altère pas l'effet de la PTH sur l'expression de VEGF, quel que soit le génotype. Ces résultats sont à prendre avec précaution car, il s'agit d'une expérience préliminaire et une seule souris de chaque groupe a été perfusée. Le nombre de souris devra être augmenté et le nombre de



**Figure 33: Impact de l'extinction de l'OPN sur l'effet angiogénique de la iPTH. A gauche : Expression de l'ARNm du VEGF-A. A Droite : Coupes histologiques de calvaria perfusées au sulfate de baryum (Les flèches noires indiquent les vaisseaux sanguins)**

vaisseaux devra être quantifié et surtout normalisé sur la surface du périoste pour vérifier s'il s'agit bien d'un effet angiogénique et non d'une simple amplification du tissu périosté. Notre étude s'est concentrée sur les effets anaboliques de l'iPTH sur le périoste. Une analyse complète de nos résultats devra aussi couvrir les effets des différents traitements sur la résorption osseuse dans l'ensemble de la calvaria, en incluant les cavités médullaires. Ce travail est en cours.

Si l'on se réfère à nos résultats établis, nous avons démontré une vicariance entre la BSP et l'OPN dans la réponse à un traitement hormonal avec de la PTH sur un os plat. Les expériences préliminaires suggèrent que l'absence de l'OPN et de la BSP n'altère pas l'effet de la PTH sur l'augmentation de l'expression du VEGF. Il nous reste à établir clairement les rôles joués par de la BSP et de l'OPN dans l'angiogenèse en réponse à l'administration de la PTH. Le rôle de la BSP dans le processus d'angiogenèse sera étudié dans le travail qui suit.

**(3) La revascularisation du conduit osseux après ablation médullaire est dramatiquement accélérée chez les souris BSP-/-, et s'accompagne d'une recolonisation hématopoïétique plus rapide.**

## Introduction :

L'ablation médullaire des os longs de rongeurs (Figure 34 A) entraîne un cycle de formation osseuse massive suivie d'une résorption de l'os déposé et d'un retour à une structure corticale et trabéculaire normale (Wade-Gueye et al., 2012; Bab et al., 1988). Dans un travail antérieur (Wade-Gueye et al., 2012) le laboratoire a étudié la réponse des souris BSP-/- dans ce modèle expérimental et a montré que la quantité d'os médullaire formée était diminuée chez les mutants, tandis que sa résorption subséquente était retardée (Figure 34 B).

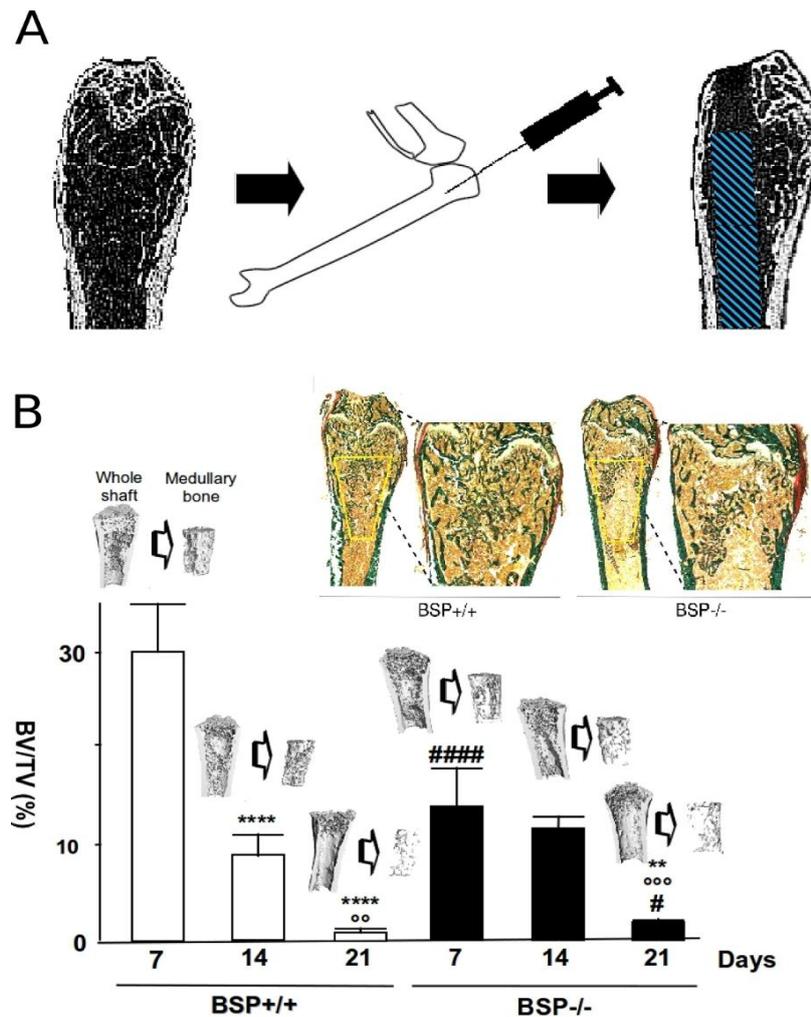


Figure 34: Schéma de la procédure d'ablation médullaire et de son résultat (A). La zone ablatée du conduit diaphysaire est en hachures bleues. (B) Les souris BSP-/- forment un plus faible volume d'os médullaire après ablation, et celui-ci est résorbé plus lentement - histologie, imagerie et quantification tomographique (\*\* :  $p < 0.01$ , \*\*\*\* :  $p < 0.0001$  vs D7 ; ##### :  $p < 0.0001$  vs D7, BSP+/+ ; °° :  $p < 0.01$ , °°° :  $p < 0.001$  vs D14). D'après Wade-Gueye et al., 2012.

Il nous est apparu que dans les premiers stades suivant l'ablation, avant le dépôt massif d'os médullaire (dont le pic se situe au jour 7-8 après l'opération) devait se produire une recolonisation vasculaire et hématologique massive du conduit évidé, et que ce modèle permettrait donc d'étudier l'impact de l'absence de la BSP sur ces processus.

Pour cette étude, des souris BSP+/+ et BSP-/- âgées de 2 mois ont subi une ablation médullaire par aspiration à travers l'épiphyse inférieure du fémur. Le réseau vasculaire intra-osseux a été contrasté par perfusion *in situ* avec du sulfate de baryum. Une quantification histomorphométrique de la densité et du volume vasculaire a été effectuée 3, 5, 6 et 8 jours après ablation, de même qu'une évaluation en QRT-PCR de l'expression de marqueurs. Le développement vasculaire des fémurs non ablatés et des reins des souris BSP-/- a également été analysé.

Il apparaît clairement que la recolonisation vasculaire et hématopoïétique du conduit ablaté est beaucoup plus rapide chez les mutants BSP-/-, ce qui s'accompagne d'une surexpression d'OPN et de VEGF.

*Cette étude est encore en cours ; elle est présentée ici sous forme de données partielles, groupant les travaux d'histomorphométrie et de QRT-PCR, que j'ai personnellement conduit, et les expériences de cytométrie, réalisées par Renata Neves-Granito.*

## Matériels et méthodes:

### Production et élevage des souris BSP-/- :

La production des souris, de même que les conditions et les paramètres d'élevage ont été décrits dans la partie matériels et méthodes (Page 72).

### Procédure d'ablation médullaire :

Des souris mâles BSP+/+ et BSP-/- âgées de 2 mois ont été utilisées. Un analgésique (Buprécare, Axience, France) a été administré aux souris avant l'opération. L'opération a été effectuée sous anesthésie par injection intrapéritonéale d'un mélange de kétamine (50 mg / kg) et de xylazine (10 mg / kg). Au niveau de l'articulation du genou gauche rasée, une incision cutanée de 0.5 cm a été effectuée. Au-dessus du tendon rotulien dégagé, et à l'aide d'une perceuse électrique (Dremel Multipro, Breda, Pays-bas) munie d'un foret en carbure de tungstène, un pré-trou a été réalisé. Le contenu du fût fémoral en os trabéculaire a ensuite été détruit avec des tire-nerfs (Colorinox R, DentsPly, 21 mm). Le conduit osseux a été rincé par injections multiples de PBS stérile. Puis l'incision a été suturée et la peau désinfectée avec de la Bétadine.

### Procédure de perfusion vasculaire :

A 3, 5, 6 et 8 jours post-ablation, les animaux ont été mis à mort par injection intrapéritonéale de Pentobarbital sodique (Ceva Santé Animale SA, France). Après incision de la paroi abdominale, un cathéter contenant une canule a été introduit dans le ventricule droit. Afin de permettre la perfusion de l'agent contrastant et de limiter les surpressions, l'oreillette gauche a été sectionnée. A l'aide d'une pompe péristaltique (MasterFlex,L/S, Cole-Parker Instrument, Germany), 30 ml de sulfate de baryum (50 % baryum : suspension de Micropaque ®, Guerbet, Paris, France plus 1.5 % gélatine) préchauffé à 37 °C ont été perfusés à travers tout l'organisme.

### Histologie et histomorphométrie:

Après dissection, les fémurs ablatés ont été fixés dans du paraformaldéhyde à 3.7 %, déshydraté dans de l'acétone et inclut dans du méthyl méthacrylate. Des coupes longitudinales de 9µm ont été coupées avec un microtome Jung modèle K (Carl Zeiss, Heidelberg, Allemagne), et colorées au vert lumière. Les fémurs non ablatés ont été coupés au

cryomicrotome (Thermo scientific, Microm HM 560, Waltham, MA, USA) juste après la dissection, des cryocoupes de 9  $\mu\text{m}$  ont été colorées au vert lumière.

Les zones d'intérêt pour la quantification des paramètres vasculaires ont été localisées dans la zone d'ablation pour les fémurs opérés et dans la métaphyse proximale pour les fémurs non ablatés.

L'évaluation des paramètres vasculaires et du BV/TV a été effectuée avec un oculaire composé d'une grille carrée à 100 points. Les paramètres vasculaires ont été quantifiés puis normalisés en fonction de la surface de la moelle osseuse, suivant la procédure décrite ci-dessous (Roche et al., 2012)

### Prélèvement des reins et imagerie vasculaire :

Afin d'imager le sulfate de baryum perfusé dans les reins de souris mâles BSP-/- (n= 08) et BSP+/+ (n= 05) âgées de deux mois, les reins ont été scannés avec une résolution élevée (voxel isotrope de 10 $\mu\text{m}$  d'arête) avec le Viva CT 40 (Scanco médical, Suisse). Les données ont été acquises à 45 keV. Les reconstitutions à trois dimensions du réseau vasculaire ont été générées à partir de l'ensemble des coupes de chaque rein, respectant les paramètres suivants : Sigma=1.2, Support=2, Seuil=220. Le volume vasculaire de chaque rein a été normalisé par son volume total, qui a été généré à partir de l'ensemble des coupes selon ces paramètres : Sigma=1.2, Support=2, Seuil= 580 (VV= volume du réseau vasculaire rénal, VK= volume total du rein).

### QRT-PCR:

L'ARN total a été isolé à partir du contenu du conduit fémoral de souris sacrifiées, qui a été élué avec du Tri-Reagent<sup>®</sup> (Sigma, Saint-Louis, USA). L'ARN a ensuite été purifié sur colonne (Kit RNeasy Plus Mini, Qiagen, Inc., Valencia, CA, US). La quantité d'ARN obtenue a été évaluée par l'utilisation d'un kit Quant-iT<sup>™</sup> RiboGreen<sup>®</sup> RNA Assay (In Vitrogen<sup>™</sup>, USA), et la qualité contrôlée avec le système Experion<sup>™</sup> (Bio-rad Laboratories, Hercules, CA, US). Deux microgrammes d'ARN extrait ont été transcrits en ADNc (Biorad kit) selon les recommandations du fournisseur. Ensuite 400 ng d'ADNc ont été amplifiés par RT-PCR quantitative en utilisant le SYBR Green (kit Light Cycler-FastStart DNA Master SYBR Green I, Roche, Penzberg, Allemagne). Les expressions en ARNm des gènes d'intérêt ont été normalisées par rapport au gène de ménage GAPDH, dont l'expression n'a pas été modifiée par les conditions expérimentales (Tableau 1).

### Cytométrie en flux:

La cinétique de recolonisation médullaire a été analysée par cytométrie en flux sur la moelle isolée par élution de tampon à travers le fût de fémurs ablatés. Les sous-populations de progéniteurs hématopoïétiques (cellules LSK : Lin<sup>-</sup> IL-7R $\alpha$ <sup>-</sup> c-Kit<sup>hi</sup> Sca-1<sup>hi</sup>) et des cellules endothéliales (CD45- Ter 199- CD31+) ont été isolées par séparation magnétique et marquées avec des anticorps spécifiques.

### Analyse statistique :

Tous les résultats insérés dans la partie travaux réalisés sont présentés en moyenne  $\pm$  SD. Les significativités statistiques ont été déterminées par les tests non paramétriques de Mann-Whitney, réalisées avec le logiciel INSTAT (version 3.00 pour Windows 95, GraphPad Software, San Diego, CA).

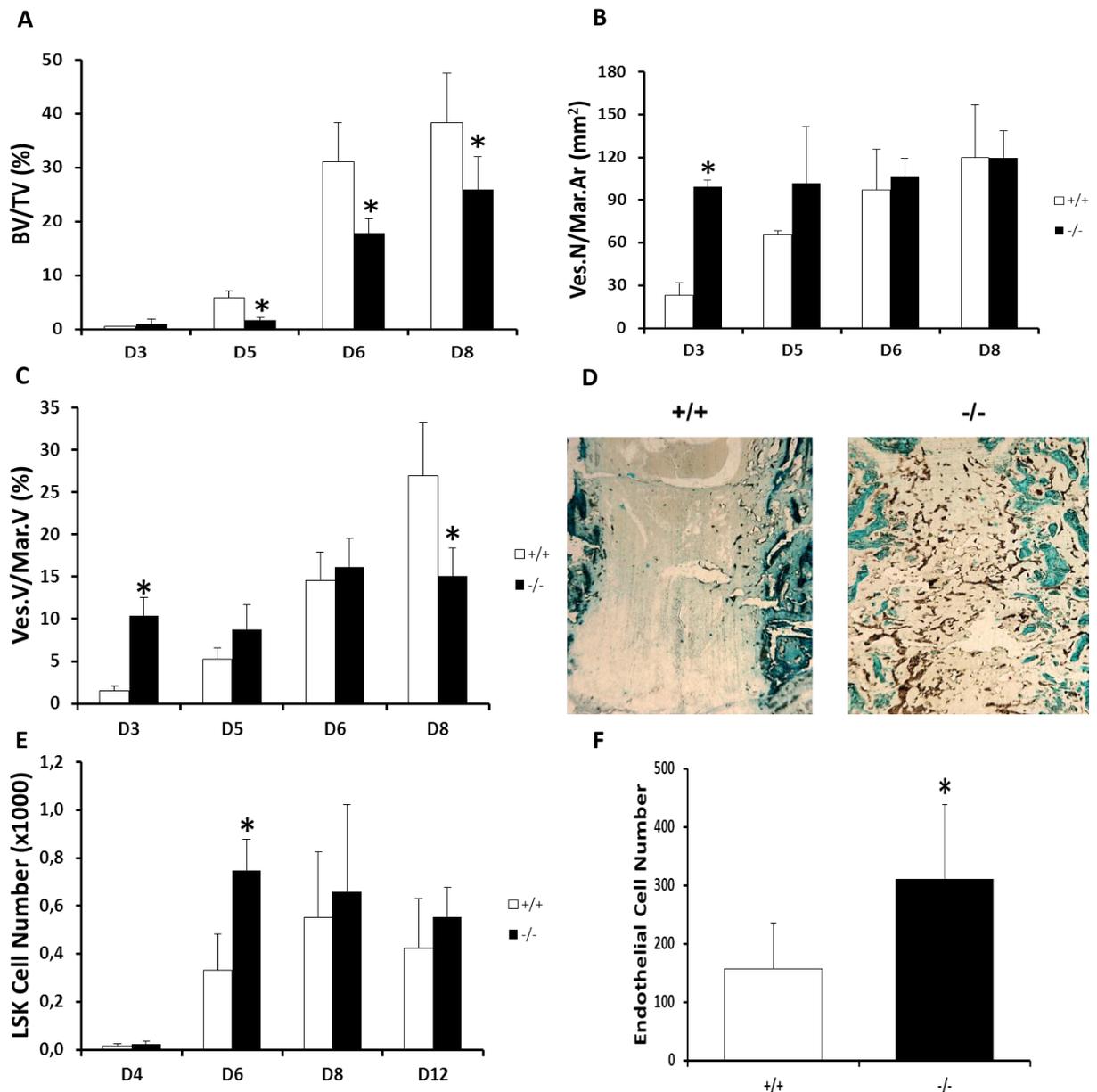
**Tableau 3 : liste et séquences des amorces utilisées**

Gène	Séquence S	Séquence AS	Entrée Genbank
Angiopoietin 1	gcgacagagcagtacaacac	gctctgcagtctgagataag	NM_009640.3
DMP1	ttcgagaacttcgctgaggt	ttgtggatcttgcaactgg	NM_016779.2
FLT-1	gcacattgggtggctgac	ctctccttcggctggcatct	NM_010228.3
GAPDH	aagtcgggtgaacggatt	attctcggccttgactgtgc	NM_008084
Jagged 1	accgtaatcgcctgactg	cggatctgatactcgaagtg	NM_013822.4
KDR	gcgagacgctctcataat	cactgctggcatcataagg	NM_010612.2
N-Cadh	ctctggcgcccttgctca	atacaccgtgccgtcctcgt	NM_007664.4
OPN	cccggtgaaagtgactgattc	atggctttcattggaattgc	NM_009263.2
PDGFR- $\beta$	tctgtggctcaaggacaac	cgtggaaggctcgcatagta	NM_001146268.1
PTHr1	ttccaggatttttgttgc	agtccaatgccaggtccag	NM_001083936
VEGF-A	tgtctaccagcgaagctact	tgctgtaggaagctcatctc	NM_001025250.3
$\alpha$ -SMA	gccagtcgctgcaggaacc	agcgaagccggccttacaga	NM_007392.2

## Résultats :

### 1/ La revascularisation et la recolonisation de la moelle ablatée son beaucoup plus rapides en l'absence de BSP

La formation d'os médullaire après ablation est progressive dans la première semaine après l'opération et la quantité d'os formée après 3 jours (J3) est négligeable (Figure 35 A). Comme décrit dans les travaux antérieurs du laboratoire à des temps plus avancés (Wade-Guéye et al., 2012 et Figure 34 B), les mutants forment moins d'os primaire que les souris sauvages (Figure 35 A). L'analyse histologique de la moelle ablatée des souris BSP<sup>-/-</sup> montre dès J3 après l'opération une densité vasculaire plus élevée ( $99.2 \pm 4.9$  vs  $23.2 \pm 8.5$  vaisseaux/mm<sup>2</sup>,  $p < 0.05$ , Test U de Mann-Whitney, Figures 35 B et 35 D) et une surface vasculaire plus grande ( $\times 7$ , Figure 35 C) que dans les BSP<sup>+/+</sup>. Cependant, à J8 où la densité vasculaire des BSP<sup>+/+</sup> a rejoint les valeurs des mutants, le volume vasculaire est moitié moindre chez les BSP<sup>-/-</sup>, reflétant une taille deux fois moindre des vaisseaux (Figure 35 C). A J6, stade, où l'os médullaire est en cours de formation, on observe un nombre beaucoup plus grand de cellules LSK (Lin<sup>-</sup> IL-7R $\alpha$ <sup>-</sup> c-Kit<sup>hi</sup> Sca-1<sup>hi</sup>) dans la moelle des BSP<sup>-/-</sup>, ce qui indique une recolonisation plus rapide (Figure 35 E). Il en est de même pour les cellules endothéliales (Figure 35 F). Ceci concorde avec l'augmentation du nombre de vaisseaux formés en l'absence de BSP.



**Figure 35:** la revascularisation et la recolonisation de la moelle ablatée sont beaucoup plus rapides en l'absence de BSP. (A) Quantification du volume osseux au niveau de la zone ablatée. (B) Quantification du nombre de vaisseaux sanguins, normalisé par la surface médullaire en mm<sup>2</sup>, 3, 5, 6 et 8 jours après ablation (n=5 pour chaque condition). (C) Mesure du volume vasculaire normalisé par le volume médullaire dans les deux génotypes. (D) Coupe histologique de la zone ablatée 3 jours après l'opération, chez les souris BSP+/+ et BSP-/- . En vert le tissu osseux minéralisé, en gris les vaisseaux sanguins perfusés au sulfate de baryum. (E) Quantification des cellules LSK par cytométrie en flux, à 4, 6, 8 et 12 jours post-ablation. (F) Quantification des cellules endothéliales par cytométrie en flux, 6 jours post-ablation (n=4). P<0.05 vs BSP+/+, Test U de Mann-Whitney.

**2/ trois jours après ablation, l'expression de l'OPN et du VEGF-A est augmentée chez les souris BSP-/-.**

Afin d'essayer d'élucider les mécanismes intervenant dans l'augmentation de la revascularisation et de la recolonisation de la moelle osseuse en absence de BSP, dans ce modèle de réparation vasculaire, des QRT-PCR ont été effectuées sur le contenu du fût des fémurs ablatés.

L'augmentation de la revascularisation chez les souris BSP-/- a été accompagnée par l'augmentation de l'expression génique d'une SIBLING hautement angiogénique : l'OPN (x1.8), ainsi que du VEGF (x1.95, Figure 36 A et 36 B). Un autre résultat intéressant est la diminution de l'expression génique d'une autre SIBLING, anti-angiogénique cette fois-ci : le DMP1 (Figure 36A). Aucune différence significative n'a été observée entre les deux génotypes dans l'expression en ARNm des deux récepteurs du VEGF (FLT-1 et KDR, Figure 36 B), ainsi que dans l'expression de Jagged1 et de l'Angiopoïétine, ou encore celle du PDGFR $\beta$ , la N-Cadherin, le PTHR1 et la  $\alpha$  Sma (Figure 36 D et 36 E).

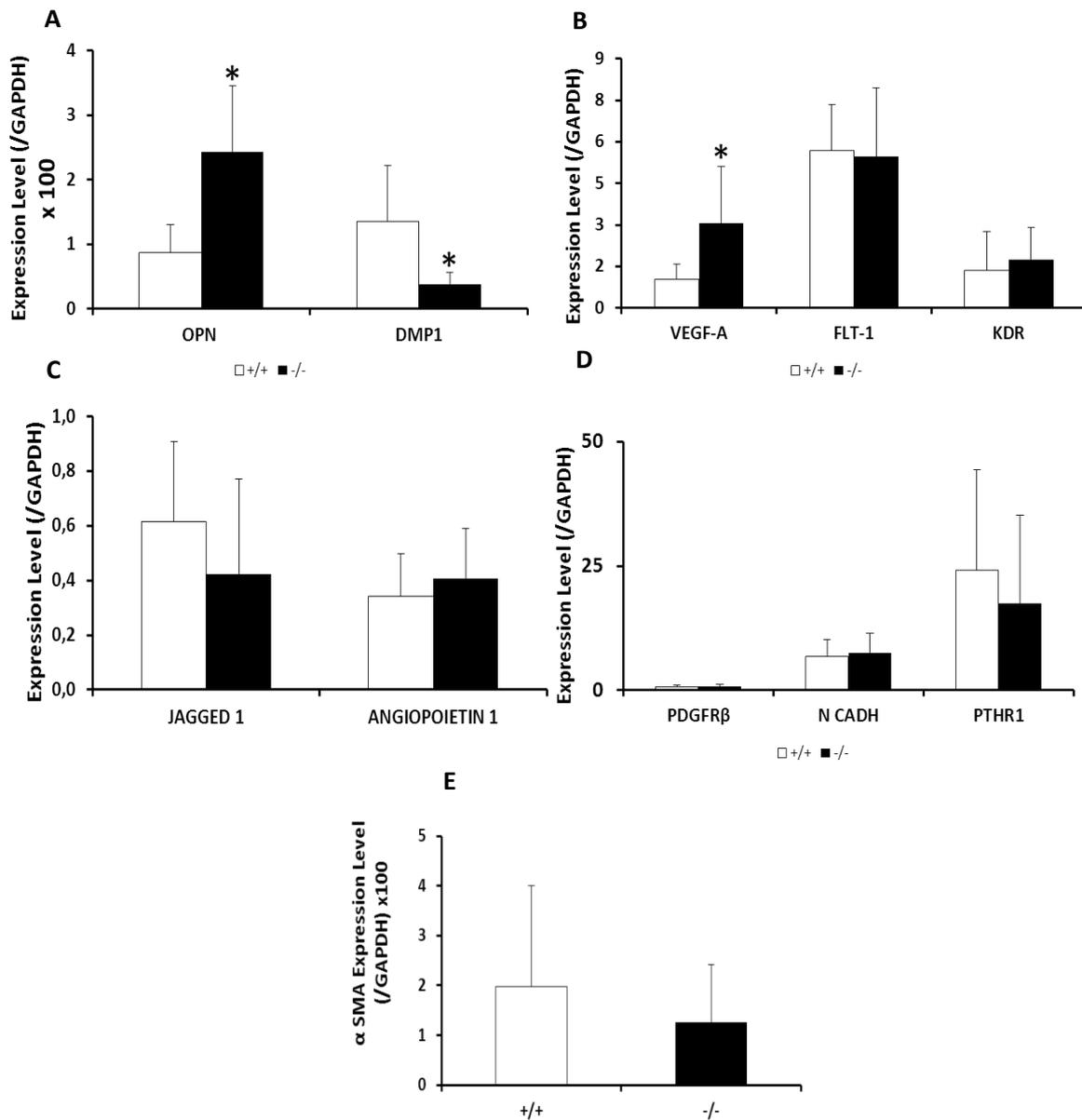


Figure 36: Augmentation de l'expression en ARNm des facteurs angiogéniques en absence de BSP, 3 jours après ablation : (A) SIBLING : OPN et DMP1, (B) VEGF-A et ses deux récepteurs, KDR et FLT-1 (C) Jagged 1 et Angiopoïétine 1 (D) PDGFR $\beta$ , N-Cadhérine et PTHR1 (E)  $\alpha$ -SMA (n=5).  $P < 0.05$  vs BSP+/+, Test U de Mann-Whitney.

**3/ Les os des souris BSP-/- présentent une densité vasculaire plus élevée, tandis qu'aucune différence dans le réseau vasculaire rénal n'a pu être détectée entre les deux génotypes.**

Les résultats précédents nous ont orientés vers la caractérisation du phénotype vasculaire de base des souris BSP-/. Le réseau vasculaire intra-osseux ainsi que le réseau rénal ont été contrastés par perfusion *in situ* de sulfate de baryum. La densité vasculaire, ainsi que le volume vasculaire ont été quantifiés histologiquement sur des coupes réalisées au cryomicrotome. Pour le réseau vasculaire rénal, la quantification a été effectuée par microtomographie ( $\mu$ -CT, Cf : matériel et méthodes).

La moelle des fémurs BSP-/- non ablatés présente également une densité vasculaire plus élevée que chez les BSP+/+ ( $74.2 \pm 8.4$  vs  $58.0 \pm 7.6$  vaisseaux/ $\text{mm}^2$ , N=6,  $p=0.01$ , Test U de Mann-Whitney, Figure 37 A, 37 B), sans pour autant que le volume vasculaire soit affecté (Figure 37 B). Aucune différence significative de volume vasculaire rénal n'a pu être détectée entre les deux génotypes en  $\mu$ -CT (Figure 37 D, 37 E). Des observations en microscope de cryocoupes de reins perfusées ont confirmé ce résultat (Figure 37 F).

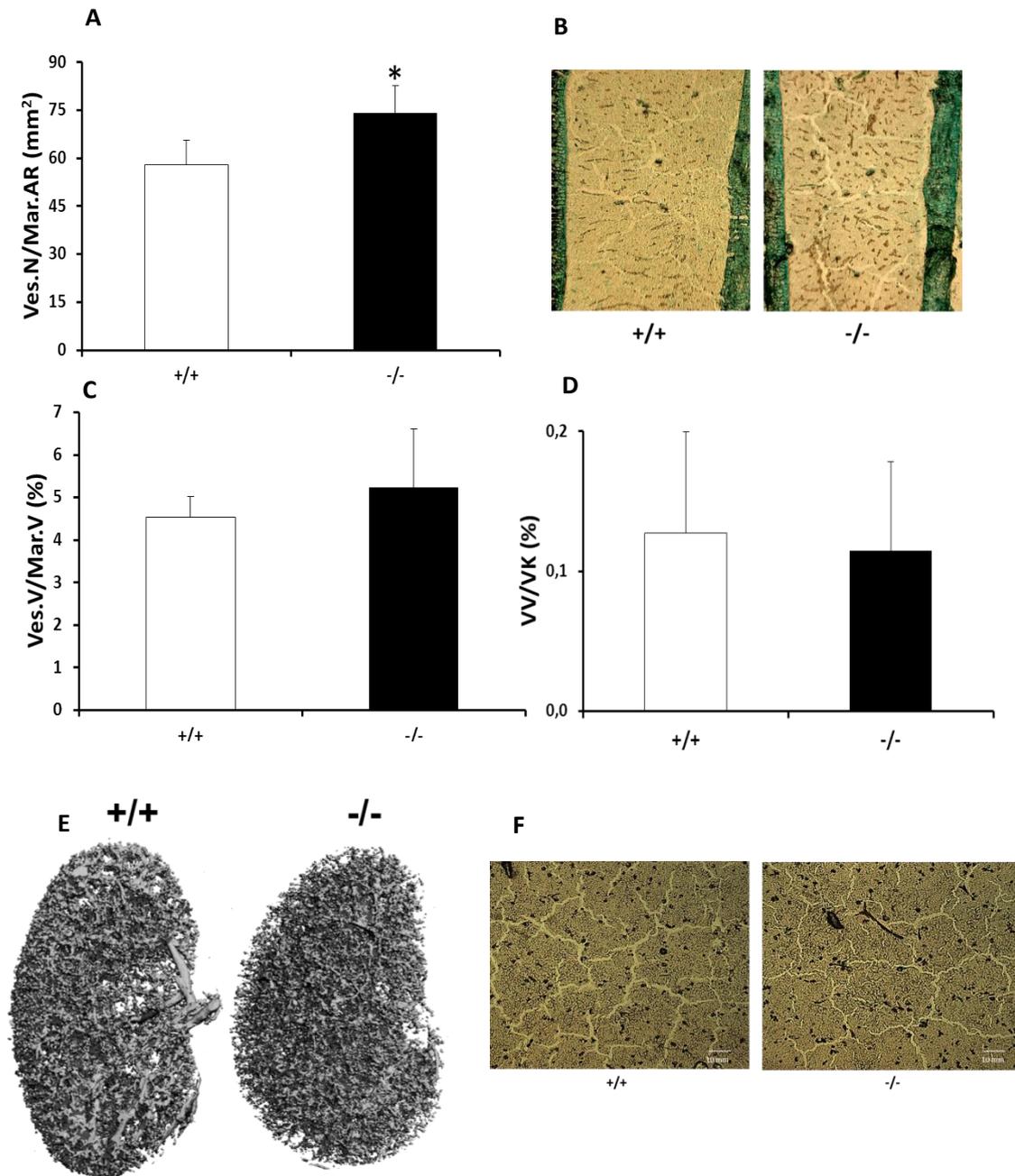


Figure 37: La densité vasculaire osseuse est augmentée chez les souris BSP-/- . (A) Quantification du nombre de vaisseaux sanguins, normalisé par la surface médullaire en mm<sup>2</sup> dans des fémurs de souris BSP+/+ (+/+) et -/- (n=6). (B) Coupe histologique de la diaphyse fémorale dont le réseau vasculaire a été contrasté au sulfate de baryum chez les souris BSP+/+ et BSP-/- . (C) Volume vasculaire normalisé par le volume médullaire dans les deux génotypes. (D) Quantification du réseau vasculaire rénal en  $\mu$ -CT dans les deux génotypes (n=8 pour les BSP-/- et n=5 pour les BSP+/+). (E) reconstitution 3D d'un réseau vasculaire rénal. (F) Cryocoupes de reins de souris +/+ et -/- contrastées au sulfate de baryum.  $P < 0.05$  vs BSP+/+, Test U de Mann-Whitney.

#### **4/Expression accrue du VEGF-A et de l'OPN dans la moelle des fémurs de souris BSP-/-**

L'augmentation de la densité vasculaire chez les souris BSP-/-, nous a conduits naturellement à effectuer des qRT-PCR sur le contenu des fûts diaphysaires de fémurs non ablatés. L'expression génique de l'OPN et de DMP1, ainsi que les gènes impliqués dans l'angiogenèse et dans la régulation des différentes populations de la moelle osseuse a été analysée.

Les os longs des souris BSP-/- montrent une expression plus élevée d'OPN et une diminution de celle de la DMP1 (Figure 38 A), comme nous l'avons déjà constaté dans le modèle d'ablation médullaire. Par ailleurs, l'expression génique du VEGF-A et de son récepteur FLT-1 sont aussi plus élevées en l'absence de BSP (Figure 38 B). Aucune différence significative n'a pu être détectée dans l'expression en ARNm de Jagged1, ni dans celle de de l'angiopoïétine 1 (Figure 38 C), ni dans l'expression du PTHR1 (Figure 38 D). Les expressions de la N-Cadhérine et du PDGFR $\beta$  sont diminuées chez les souris BSP-/- (Figure 38 D) tandis que celle de la  $\alpha$ -Sma est augmentée (Figure 38 E).

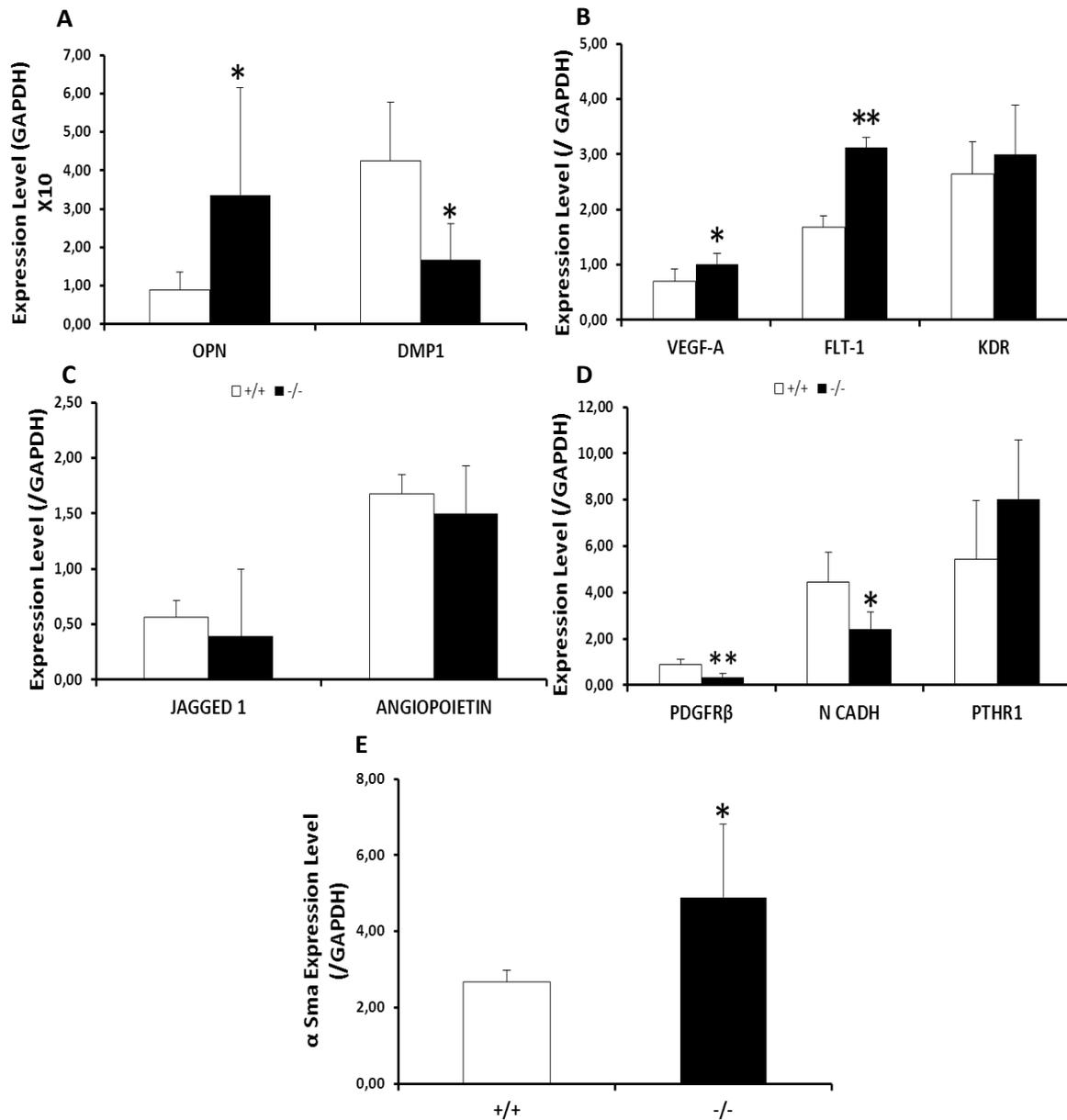


Figure 38: Augmentation de l'expression en ARNm des facteurs angiogéniques en l'absence de BSP. (A) OPN et DMP1 (B) VEGF-A et ses deux récepteurs KDR et FLT-1 (C) Jagged1 et Angiopoïétine 1 (D) PDGFR $\beta$ , N-Cadh et PTHR1 (E)  $\alpha$ -SMA (n=5). \*:P<0.05, \*\*: p<0.01 vs BSP+/+, Test U de Mann-Whitney.

## Discussion :

Peu d'études ont rapporté le lien entre la BSP et l'angiogenèse. Dans ce travail nous montrons que l'absence de BSP affecte significativement ce processus. Le modèle d'ablation médullaire permet d'étudier sur des cinétiques rapides le processus d'angiogenèse, ainsi que la recolonisation hématopoïétique de la moelle. 3 jours (J3) après opération, stade où la quantité d'os médullaire formé est très faible, l'analyse histologique de la moelle ablatée des souris BSP<sup>-/-</sup> montre une densité vasculaire plus élevée, accompagnée d'une expression élevée du VEGF-A, principal facteur impliqué dans la formation de vaisseaux sanguins, et d'OPN, une SIBLING ayant des propriétés hautement angiogéniques. Il est à rappeler que l'OPN augmente l'expression du VEGF dans les cellules endothéliales (Dai et al., 2009). L'expression de DMP1 est diminuée trois jours post ablation ; cette autre SIBLING aurait des propriétés antiangiogéniques, en bloquant l'expression du VEGF (Pirrotte et al., 2011). L'accélération de la revascularisation des fémurs ablatés en absence de BSP pourrait donc être expliquée non seulement par l'absence de cette protéine, mais aussi par un jeu de régulations multiples, impliquant plusieurs SIBLING.

L'analyse en cytométrie en flux a démontré, quatre jours après opération, la faible proportion de cellules LSK dans les deux génotypes reflétant ainsi une élimination quasi-totale des cellules après ablation médullaire. Cette population cellulaire regroupe essentiellement des cellules souche hématopoïétiques les plus primitives pouvant donner naissance à des cellules matures présentes dans le sang nécessaire dans les processus de réparation vasculaire. En concordance avec l'accélération de la revascularisation, une augmentation des proportions des cellules LSK et des cellules endothéliales, nécessaire à la formation des parois vasculaires, a été observée 6 jours post-ablation. Aucune différence significative dans l'expression génique des acteurs de la régulation de la niche, que nous avons analysés n'a été observée. Cependant, il est fort probable que l'analyse effectuée 3 jours post-ablation soit trop précoce. Il serait intéressant d'analyser à ce stade l'expression de l'OPN, qui est connue pour être un régulateur négatif de la niche hématopoïétique (Stier et al., 2005). L'expression de DMP1 était toujours diminuée 7 jours après ablation chez les souris BSP<sup>-/-</sup> (Wade-Gueye et al., 2012), cependant le rôle de la DMP1 dans la régulation de la niche hématopoïétique n'est toujours pas étudié.

Huit jours après ablation, stade correspondant au pic de la formation de l'os médullaire, le volume vasculaire était moitié moindre dans les souris BSP<sup>-/-</sup>, malgré des valeurs identiques de densités vasculaires entre les deux génotypes (Figure 35 C), reflétant une taille deux fois moindre des vaisseaux sanguins des souris BSP<sup>-/-</sup>. Ces résultats sont à prendre avec beaucoup

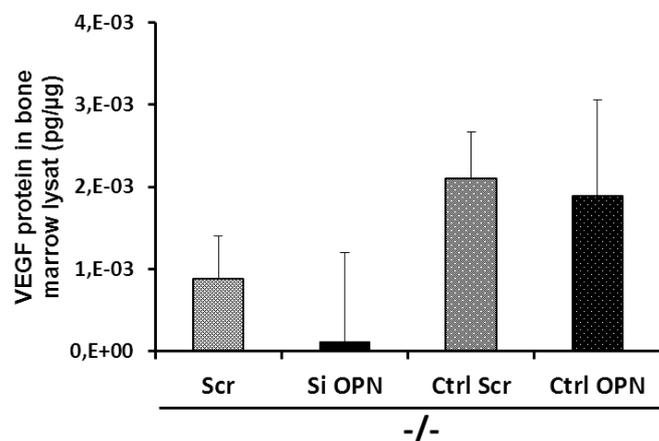
de prudence, car dans un premier temps il faudrait clarifier la nature et la structure des vaisseaux qui se forment après une ablation médullaire et en particulier le degré d'anisotropie de ces vaisseaux, qui est déterminant dans le calcul du volume vasculaire. De ce fait, aucune différence significative de volume vasculaire n'a été observée entre les deux génotypes sur des fémurs non ablatés, alors que la densité vasculaire est plus élevée dans les fémurs BSP-/- (Figure 37 A). Cette plus forte densité des vaisseaux est associée chez les mutants à une expression génique élevée du VEGF-A et de son récepteur FLT-1 nécessaire à la mobilisation de précurseurs de cellules endothéliales à partir de la moelle osseuse (Lyden et al., 2001). Comme dans le modèle d'ablation médullaire, l'augmentation du nombre des vaisseaux est accompagnée par une expression accrue d'OPN médullaire et trabéculaire. D'une manière surprenant l'expression de l'OPN au niveau cortical est apparue diminuée dans des fémurs de mâles BSP-/- au cours d'une étude antérieure (Malaval et al., 2008). Il sera important de clarifier les différences dans la distribution locale de l'OPN selon des sites osseux. La N-cadh est un important régulateur de la différenciation ostéoblastique et l'ostéogenèse, elle serait impliquée également dans le survie des ostéoblastes (Marie, 2002), la diminution de l'expression de la N-Cadh, pourrait expliquer entre autres l'hypominéraliation qui caractérise les souris BSP-/- (Malaval et al., 2008). La discordance entre la diminution de l'expression du PDGFR $\beta$  et l'augmentation de celle de la  $\alpha$ -Sma, tous deux marqueurs de la niche vasculaire, nous oriente à mieux caractériser la niche vasculaire chez les souris BSP-/-, ainsi que l'implication de ces deux facteurs dans sa régulation.

La surexpression de MEPE, une autre protéine de la famille des SIBLING induit une augmentation du nombre des petits vaisseaux sanguins rénaux (David et al., 2009). Aucune différence significative de la densité vasculaire rénale n'a pu être détectée entre les génotypes (Figure 37 D). L'analyse de cryocoupes de rein perfusé a confirmé ce résultat. Cependant, il serait plus judicieux d'affiner cette analyse par une imagerie à plus haute résolution (3 $\mu$ m, grâce à un appareil Nano-CT), afin de pouvoir prendre en considération le réseau capillaire rénal.

L'ensemble de ces résultats met en évidence l'implication de la BSP dans les processus d'angiogenèse et d'hématopoïèse. Cependant, il nous reste à clarifier le rôle de chacune des SIBLING dans ces processus. En effet l'augmentation de la revascularisation en absence de BSP est associée à une expression accrue de facteurs angiogéniques tels que l'OPN du VEGF, ce qui suggère l'intervention de l'un ou de ces deux facteurs dans la stimulation de l'angiogenèse. Des expériences sont en cours de mise au point et de réalisation afin de répondre à ces questions. Elles visent à inhiber l'expression de l'OPN en injectant des siOPN

dans le fûts diaphysaire des fémurs après ablation et celle du VEGF en injectant un inhibiteur (SU 5614), pour ensuite effectuer des quantifications histologiques et des QRT-PCR des marqueurs angiogéniques.

Des résultats préliminaires (Figure 39) très encourageants suggèrent que l'inhibition de l'expression de l'OPN via l'injection de siARN dans le fût diaphysaire fémoral après ablation engendre un effondrement de la concentration du VEGF 3 jours après ablation, suggérant que c'est l'OPN qui induirait l'expression du VEGF comme la démontré l'équipe de Dai dans les cellules endothéliales (Dai et al., 2009). Ce résultat est conforté par l'augmentation de la proportion des cellules endothéliales 6 jours après ablation (Figure 35 F). Toutefois, ces résultats sont très préliminaires et l'extinction de l'expression de l'OPN doit d'abord être confirmée dans ces expériences.



**Figure 39: Mesure de la concentration en Pg/ $\mu$ l du VEGF-A dans les lysats de moelle osseuse 3 jours après ablation en absence de BSP (n=03)**

En conclusion, ce travail démontre le rôle clé de la BSP dans l'interaction entre l'ostéogenèse, l'angiogenèse et l'hématopoïèse, trois processus nécessaires au cours du développement du remodelage osseux, ainsi que dans les processus de réparations fracturaires.

# Discussion générale et perspectives

L'ensemble de ce travail a établi le rôle important joué par la BSP dans les interactions entre le développement osseux, l'ostéogenèse et l'angiogenèse, ainsi que la capacité de l'OPN à compenser au moins en partie son absence.

### **BSP et comportement maternel :**

Dans notre première étude, l'analyse du développement des souriceaux BSP<sup>-/-</sup> a été compliquée par un trouble comportemental de leurs mères qui ne forment pas de nid lors de la mise bas. Nous avons pu démontrer que le phénotype osseux de ces souris est dû uniquement à l'absence de BSP. Il serait intéressant, en collaboration avec des éthologues, de creuser cet aspect comportemental résultant de l'absence de BSP et d'une façon plus générale d'étudier l'impact de l'absence des SIBLING sur le comportement et l'instinct de reproduction des souris déficientes ou surexprimant l'une de ces protéines. Dans le cas des mères BSP<sup>-/-</sup>, et en s'appuyant sur l'exemple évoqué plus haut des souris DMP1<sup>-/-</sup>, il est par exemple possible qu'un défaut de minéralisation des os de l'oreille moyenne ou interne entraîne des perturbations dans la communication avec leur progéniture. Par ailleurs, il est bien connu que la BSP et l'OPN sont exprimées par le placenta. Une étude a montré que l'OPN est importante pour la réussite de l'implantation des embryons et de la gestation, étant donné son rôle dans l'angiogenèse, la prolifération, ainsi que la migration et la survie cellulaire (White et al., 2005). Aussi les souris OPN<sup>-/-</sup> présenteraient des embryons de taille plus petite durant tous les stades gestationnels, ce qui serait dû à une diminution de la perfusion placentaire (Weintraub et al., 2004). Il serait intéressant d'étudier dans ce cadre l'impact de l'absence de la BSP sur l'évolution de la gestation, de la nidation jusqu'à la mise bas. Un autre aspect à envisager dans cette perspective développementale est l'impact de l'absence de BSP sur la qualité du lait maternel, et sur le processus de lactation, fonction physiologique cruciale permettant une bonne constitution du tissu osseux.

L'absence de BSP affecte la dynamique des plaques de croissances, qui se traduit par la taille plus petite des souris BSP<sup>-/-</sup>. La diminution du taux d'IGF-1 pourrait expliquer en partie ce défaut. Néanmoins, comme discuté plus haut, l'implication complexe de ce facteur de croissance dans de multiples voies de signalisation constitue un facteur limitant et une analyse plus approfondie du lien entre la BSP et l'IGF-1 reste à faire. Les chondrocytes hypertrophiques, un des constituants de cette plaque de croissance, expriment la BSP, l'OPN, DMP1 ou MEPE qui est impliqué dans la régulation de la minéralisation de la plaque de croissance (Staines et al., 2012). Il sera intéressant de caractériser le rôle de chacune de ces SIBLING dans la biologie de ces cellules et son implication dans les différentes étapes de

l'ossification endochondrale et de définir le profil d'expression de l'OPN, dont le taux circulant est augmenté chez les souriceaux BSP<sup>-/-</sup> de six jours, et ceux de DMP1 et de MEPE dans les souris déficientes en BSP, afin d'éclaircir le potentiel de complémentarités/compensations ou de synergies entre ces membres de la famille des SIBLING.

### **Vicariance entre la BSP et l'OPN :**

Pour répondre à cette dernière question, nous avons dans la deuxième partie de notre travail, établi le potentiel de complémentarité entre la BSP et l'OPN. Le très faible taux de formation osseuse déjà décrit dans les souris BSP<sup>-/-</sup> (Malaval et al., 2008) est confirmé par nos travaux. Cependant, l'injection locale intermittente de PTH réussit à stimuler l'activité de formation osseuse chez les souris BSP<sup>-/-</sup>, même si c'est à un niveau plus bas que chez les souris sauvages, ce qui suggère que le défaut d'efficacité des ostéoblastes BSP<sup>-/-</sup> à déposer de la matrice osseuse et à la minéraliser aussi établi par Gordon et al. (2007) qui ont montré que la BSP est nécessaire aux ostéoblastes pour l'acquisition d'un phénotype complet, est levé par la PTH. Bien que le blocage de l'expression de l'OPN ait inhibé l'effet anabolique de la PTH dans les calvaria ou les cultures cellulaires déficientes en BSP, nous avons seulement montré que cette protéine était limitante, mais pas établi qu'elle était le seul facteur permettant à la PTH intermittente, mais aussi à d'autres défis (Malaval et al., 2008; Wade-Gueye et al., 2012) de compenser les effets de l'absence de BSP.

Il serait intéressant d'analyser la vicariance entre la BSP et l'OPN chez les souris déficientes en OPN. Elle pourrait par exemple expliquer la réponse des souris OPN<sup>-/-</sup> à l'effet anabolique de la PTH sur l'os trabéculaire, qui est semblable à celle des souris sauvages (Kitahara et al., 2003). Il sera dans les travaux ultérieurs, nécessaire de clarifier les fonctions précises de chaque protéine et son rôle exact dans la physiologie osseuse. Il est vrai que la technologie des siARN offre une méthode rapide et moins coûteuse pour bloquer l'expression d'une protéine; néanmoins l'extinction n'est jamais totale, entravant ainsi une bonne analyse et compréhension des résultats. Il y aura plus à attendre dans notre cadre d'une double extinction de l'expression de l'OPN et de la BSP. Le projet ANR "Mouse\_Kosto", dont les travaux ont déjà commencé dans le laboratoire, et qui a pour objectif d'étudier la redondance et la complémentarité de l'OPN et de la BSP via la génération d'une double extinction génique, permettra de clarifier et de spécifier le rôle de chaque protéine. Rappelons que du fait de l'organisation du "locus SIBLING", la génération de cette double extinction n'est pas triviale, puisqu'elle requiert de réaliser une nouvelle mutation invalidante (ici, de l'OPN) sur un fond

déjà ablaté (ici, les BSP-/-).

Il est clair que si notre intérêt se porte sur la BSP et l'OPN, la similitude structurale, ainsi que la localisation commune des différentes SIBLING depuis l'apparition des tissus minéralisés chez les vertébrés, suggèrent un jeu plus étendu de régulations croisées, qui a fait l'objet de très peu d'intérêt de la part des chercheurs du domaine. Les souris qui surexpriment MEPE présentent une augmentation du nombre des vaisseaux sanguins, associée à une diminution des taux d'expression de l'OPN (David et al., 2009), ce qui va à l'encontre de nos hypothèses et des résultats d'autres équipes. Il faut noter que ces souris présentent des taux non physiologiques de MEPE, mais aussi de peptide ASARM, susceptibles de remplir tout ou partie des rôles de l'OPN et aussi d'interférer avec son expression. Ce modèle est donc encore un exemple de l'importance des régulations croisées entre SIBLING, et de la nécessité de mieux les comprendre pour interpréter leurs rôles physiologiques. Ainsi la production de souris présentant de multiples extinctions, qui par la suite pourront être raffinées en extinctions conditionnelles pour répondre à des interrogations spécifiques, permettra de clarifier les régulations existantes entre ces différentes protéines, afin de spécifier leurs fonctions dans la biologie du tissu osseux.

### **BSP et angiogenèse :**

Il est bien connu que l'OPN est un régulateur de la niche hématopoïétique. En effet le pool des cellules souches hématopoïétiques (HSC) est augmenté chez les souris OPN -/-, suggérant que l'OPN est un inhibiteur de l'expansion des HSC (Zhang et al., 2003). Les travaux menés dans le laboratoire par Renata Neves Granito montrent que les souris BSP-/- présentent une proportion diminuée de cellules HSC dans la moelle osseuse, ainsi qu'une composition altérée de la moelle hématopoïétique. Nos observations sur la surexpression d'OPN dans les souris BSP-/- nous conduiront à interpréter ces résultats comme résultant soit d'une action promotrice de la BSP sur l'expansion du pool HSC, soit d'une action inhibitrice de l'OPN en excès dans ces souris, soit d'une combinaison plus complexe de multiples effets. Ici encore, le modèle de double extinction en cours de développement pourra, si son développement de ces souris est normal, aider à clarifier la question. De même, des expériences d'ablation médullaire dans un modèle de double extinction génique OPN/BSP permettront de confirmer nos hypothèses sur le phénotype des souris BSP-/- ablatées, sous la même réserve de viabilité et de développement normal des double mutants.

L'ensemble de ces travaux vont nous permettre de mieux comprendre le rôle de la BSP dans la physiologie du tissu osseux, ainsi que son interaction avec les différentes protéines de la

famille des SIBLING. Ces informations seront précieuses pour la compréhension des mécanismes physiologiques et pathologiques liés à cette famille de protéines, et leur champ d'application s'étendra au-delà des tissus squelettiques, dans les autres organes où leur expression a été détectée : rein, glandes salivaires, testicules. A l'heure où le squelette des vertébrés apparaît de plus en plus couplé avec, dépendant -mais aussi régulateur- de grands systèmes métaboliques (phosphocalcique, bien sûr mais aussi énergétique), et de grandes fonctions insoupçonnées jusqu'alors (reproduction), le tout sous contrôle du système nerveux central, cette famille de protéines associées au minéral mais finalement très ubiquitaires est en bonne position pour jouer un rôle significatif dans ces mécanismes.

# Bibliographie

- Addison, W.N., Nakano, Y., Loisel, T., Crine, P., and McKee, M.D. (2008). MEPE-ASARM peptides control extracellular matrix mineralization by binding to hydroxyapatite: an inhibition regulated by PHEX cleavage of ASARM. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* *23*, 1638–1649.
- Addison, W.N., Masica, D.L., Gray, J.J., and McKee, M.D. (2010). Phosphorylation-dependent inhibition of mineralization by osteopontin ASARM peptides is regulated by PHEX cleavage. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* *25*, 695–705.
- Araki, S., Mezawa, M., Sasaki, Y., Yang, L., Li, Z., Takai, H., Nakayama, Y., and Ogata, Y. (2009). Parathyroid hormone regulation of the human bone sialoprotein gene transcription is mediated through two cAMP response elements. *J. Cell. Biochem.* *106*, 618–625.
- Ashkar, S., Weber, G.F., Panoutsakopoulou, V., Sanchirico, M.E., Jansson, M., Zawaideh, S., Rittling, S.R., Denhardt, D.T., Glimcher, M.J., and Cantor, H. (2000). Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science* *287*, 860–864.
- Asou, Y., Rittling, S.R., Yoshitake, H., Tsuji, K., Shinomiya, K., Nifuji, A., Denhardt, D.T., and Noda, M. (2001). Osteopontin facilitates angiogenesis, accumulation of osteoclasts, and resorption in ectopic bone. *Endocrinology* *142*, 1325–1332.
- Bab, I., L, P.-E., D, G., E, S., Ba, A., N, P.-R., I, Z., and M, U. (1988). Osteogenesis in in vivo diffusion chamber cultures of human marrow cells. *Bone Miner.* *4*, 373–386.
- Baker, J., Liu, J.P., Robertson, E.J., and Efstratiadis, A. (1993). Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* *75*, 73–82.
- Baron, J., Klein, K.O., Yanovski, J.A., Novosad, J.A., Bacher, J.D., Bolander, M.E., and Cutler, G.B., Jr (1994). Induction of growth plate cartilage ossification by basic fibroblast growth factor. *Endocrinology* *135*, 2790–2793.
- Battegay, E.J., Rupp, J., Iruela-Arispe, L., Sage, E.H., and Pech, M. (1994). PDGF-BB modulates endothelial proliferation and angiogenesis in vitro via PDGF beta-receptors. *J. Cell Biol.* *125*, 917–928.
- Beck, G.R., Jr, Zerler, B., and Moran, E. (2000). Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 8352–8357.
- Bellahcène, A., Bonjean, K., Fohr, B., Fedarko, N.S., Robey, F.A., Young, M.F., Fisher, L.W., and Castronovo, V. (2000). Bone sialoprotein mediates human endothelial cell attachment and migration and promotes angiogenesis. *Circ. Res.* *86*, 885–891.
- Bellahcène, A., Castronovo, V., Ogbureke, K.U.E., Fisher, L.W., and Fedarko, N.S. (2008). Small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs): multifunctional proteins in cancer. *Nat. Rev. Cancer* *8*, 212–226.
- Bellido, T., Ali, A.A., Plotkin, L.I., Fu, Q., Gubrij, I., Roberson, P.K., Weinstein, R.S., O'Brien, C.A., Manolagas, S.C., and Jilka, R.L. (2003). Proteasomal degradation of Runx2 shortens parathyroid hormone-induced anti-apoptotic signaling in osteoblasts. A putative explanation for why intermittent administration is needed for bone anabolism. *J. Biol. Chem.* *278*, 50259–50272.

- Bellido, T., Ali, A.A., Gubrij, I., Plotkin, L.I., Fu, Q., O'Brien, C.A., Manolagas, S.C., and Jilka, R.L. (2005). Chronic elevation of parathyroid hormone in mice reduces expression of sclerostin by osteocytes: a novel mechanism for hormonal control of osteoblastogenesis. *Endocrinology* *146*, 4577–4583.
- Beninati, S., Senger, D.R., Cordella-Miele, E., Mukherjee, A.B., Chackalaparampil, I., Shanmugam, V., Singh, K., and Mukherjee, B.B. (1994). Osteopontin: its transglutaminase-catalyzed posttranslational modifications and cross-linking to fibronectin. *J. Biochem. (Tokyo)* *115*, 675–682.
- Ten Berge, D., Brugmann, S.A., Helms, J.A., and Nusse, R. (2008). Wnt and FGF signals interact to coordinate growth with cell fate specification during limb development. *Dev. Camb. Engl.* *135*, 3247–3257.
- Van Bezooijen, R.L., ten Dijke, P., Papapoulos, S.E., and Löwik, C.W.G.M. (2005). SOST/sclerostin, an osteocyte-derived negative regulator of bone formation. *Cytokine Growth Factor Rev.* *16*, 319–327.
- Bianco, P., Fisher, L.W., Young, M.F., Termine, J.D., and Robey, P.G. (1991). Expression of bone sialoprotein (BSP) in developing human tissues. *Calcif. Tissue Int.* *49*, 421–426.
- Bikle, D., Majumdar, S., Laib, A., Powell-Braxton, L., Rosen, C., Beamer, W., Nauman, E., Leary, C., and Halloran, B. (2001). The skeletal structure of insulin-like growth factor I-deficient mice. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* *16*, 2320–2329.
- Bikle, D.D., Sakata, T., Leary, C., Elalieh, H., Ginzinger, D., Rosen, C.J., Beamer, W., Majumdar, S., and Halloran, B.P. (2002). Insulin-like growth factor I is required for the anabolic actions of parathyroid hormone on mouse bone. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* *17*, 1570–1578.
- Bilezikian, J.P., Raisz, L.G., and Martin, T.J. (2008). *Principles of Bone Biology, Two-Volume Set* (Academic Press).
- Bodine, P.V.N., Seestaller-Wehr, L., Kharode, Y.P., Bex, F.J., and Komm, B.S. (2007). Bone anabolic effects of parathyroid hormone are blunted by deletion of the Wnt antagonist secreted frizzled-related protein-1. *J. Cell. Physiol.* *210*, 352–357.
- Bonnelye, E., Kung, V., Laplace, C., Galson, D.L., and Aubin, J.E. (2002). Estrogen receptor-related receptor alpha impinges on the estrogen axis in bone: potential function in osteoporosis. *Endocrinology* *143*, 3658–3670.
- Boskey, A.L. (1995). Osteopontin and related phosphorylated sialoproteins: effects on mineralization. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *760*, 249–256.
- Boskey, A.L., Maresca, M., Ullrich, W., Doty, S.B., Butler, W.T., and Prince, C.W. (1993). Osteopontin-hydroxyapatite interactions in vitro: inhibition of hydroxyapatite formation and growth in a gelatin-gel. *Bone Miner.* *22*, 147–159.
- Boskey, A.L., Spevak, L., Paschalis, E., Doty, S.B., and McKee, M.D. (2002). Osteopontin deficiency increases mineral content and mineral crystallinity in mouse bone. *Calcif. Tissue Int.* *71*, 145–154.

- Boudiffa, M., Wade-Gueye, N.M., Guignandon, A., Vanden-Bossche, A., Sabido, O., Aubin, J.E., Jurdic, P., Vico, L., Lafage-Proust, M.H., and Malaval, L. (2010). Bone sialoprotein deficiency impairs osteoclastogenesis and mineral resorption in vitro. *J. Bone Miner. Res.* 25, 2669–2679.
- Boyce, B.F., Aufdemorte, T.B., Garrett, I.R., Yates, A.J., and Mundy, G.R. (1989). Effects of interleukin-1 on bone turnover in normal mice. *Endocrinology* 125, 1142–1150.
- Brooks, P.C. (1996). Role of integrins in angiogenesis. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 32A, 2423–2429.
- Brooks, P.C., Clark, R.A., and Cheresh, D.A. (1994). Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science* 264, 569–571.
- Byzova, T.V., Goldman, C.K., Pampori, N., Thomas, K.A., Bett, A., Shattil, S.J., and Plow, E.F. (2000). A Mechanism for Modulation of Cellular Responses to VEGF: Activation of the Integrins. *Mol. Cell* 6, 851–860.
- Carmeliet, P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat. Med.* 6, 389–395.
- Carmeliet, P., and Jain, R.K. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 473, 298–307.
- Chan, G.K., Deckelbaum, R.A., Bolivar, I., Goltzman, D., and Karaplis, A.C. (2001). PTHrP inhibits adipocyte differentiation by down-regulating PPAR gamma activity via a MAPK-dependent pathway. *Endocrinology* 142, 4900–4909.
- Chellaiah, M.A., and Hruska, K.A. (2003). The integrin alpha(v)beta(3) and CD44 regulate the actions of osteopontin on osteoclast motility. *Calcif. Tissue Int.* 72, 197–205.
- Chellaiah, M.A., Kizer, N., Biswas, R., Alvarez, U., Strauss-Schoenberger, J., Rifas, L., Rittling, S.R., Denhardt, D.T., and Hruska, K.A. (2003). Osteopontin deficiency produces osteoclast dysfunction due to reduced CD44 surface expression. *Mol. Biol. Cell* 14, 173–189.
- Chen, J., Shapiro, H.S., and Sodek, J. (1992). Development expression of bone sialoprotein mRNA in rat mineralized connective tissues. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 7, 987–997.
- Chen, J.K., Shapiro, H.S., Wrana, J.L., Reimers, S., Heersche, J.N., and Sodek, J. (1991). Localization of bone sialoprotein (BSP) expression to sites of mineralized tissue formation in fetal rat tissues by in situ hybridization. *Matrix Stuttg. Ger.* 11, 133–143.
- Chenu, C., Colucci, S., Grano, M., Zigrino, P., Barattolo, R., Zambonin, G., Baldini, N., Vergnaud, P., Delmas, P.D., and Zallone, A.Z. (1994). Osteocalcin induces chemotaxis, secretion of matrix proteins, and calcium-mediated intracellular signaling in human osteoclast-like cells. *J. Cell Biol.* 127, 1149–1158.
- Chiang, T.-I., Chang, I.-C., Lee, H.-S., Lee, H., Huang, C.-H., and Cheng, Y.-W. (2011). Osteopontin regulates anabolic effect in human menopausal osteoporosis with intermittent parathyroid hormone treatment. *Osteoporos. Int. J. Establ. Result Coop. Eur. Found. Osteoporos. Natl. Osteoporos. Found. USA* 22, 577–585.

- Chung, U.-I. (2004). Essential role of hypertrophic chondrocytes in endochondral bone development. *Endocr. J.* *51*, 19–24.
- Cohen, M.M., Jr (2006). The new bone biology: pathologic, molecular, and clinical correlates. *Am. J. Med. Genet. A.* *140*, 2646–2706.
- Colnot, C., de la Fuente, L., Huang, S., Hu, D., Lu, C., St-Jacques, B., and Helms, J.A. (2005). Indian hedgehog synchronizes skeletal angiogenesis and perichondrial maturation with cartilage development. *Dev. Camb. Engl.* *132*, 1057–1067.
- Curtin, P., McHugh, K.P., Zhou, H.-Y., Flückiger, R., Goldhaber, P., Oppenheim, F.G., and Salih, E. (2009). Modulation of bone resorption by phosphorylation state of bone sialoprotein. *Biochemistry (Mosc.)* *48*, 6876–6886.
- Dai, J., Peng, L., Fan, K., Wang, H., Wei, R., Ji, G., Cai, J., Lu, B., Li, B., Zhang, D., et al. (2009). Osteopontin induces angiogenesis through activation of PI3K/AKT and ERK1/2 in endothelial cells. *Oncogene* *28*, 3412–3422.
- Datta, N.S., Chen, C., Berry, J.E., and McCauley, L.K. (2005). PTHrP signaling targets cyclin D1 and induces osteoblastic cell growth arrest. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* *20*, 1051–1064.
- David, V., Martin, A., Hedge, A.-M., and Rowe, P.S.N. (2009). Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein (MEPE) Is a New Bone Renal Hormone and Vascularization Modulator. *Endocrinology* *150*, 4012–4023.
- Day, T.F., and Yang, Y. (2008). Wnt and hedgehog signaling pathways in bone development. *J. Bone Joint Surg. Am.* *90 Suppl 1*, 19–24.
- Denhardt, D.T., and Noda, M. (1998). Osteopontin expression and function: role in bone remodeling. *J. Cell. Biochem. Suppl.* *30-31*, 92–102.
- Denhardt, D.T., Noda, M., O'Regan, A.W., Pavlin, D., and Berman, J.S. (2001). Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *J. Clin. Invest.* *107*, 1055–1061.
- Dissanayaka, W.L., Zhan, X., Zhang, C., Hargreaves, K.M., Jin, L., and Tong, E.H.Y. (2012). Coculture of dental pulp stem cells with endothelial cells enhances osteo-/odontogenic and angiogenic potential in vitro. *J. Endod.* *38*, 454–463.
- Dobnig, H., and Turner, R.T. (1995). Evidence that intermittent treatment with parathyroid hormone increases bone formation in adult rats by activation of bone lining cells. *Endocrinology* *136*, 3632–3638.
- Dodds, R.A., Connor, J.R., James, I.E., Rykaczewski, E.L., Appelbaum, E., Dul, E., and Gowen, M. (1995). Human osteoclasts, not osteoblasts, deposit osteopontin onto resorption surfaces: an in vitro and ex vivo study of remodeling bone. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* *10*, 1666–1680.
- Ek-Rylander, B., Flores, M., Wendel, M., Heinegård, D., and Andersson, G. (1994). Dephosphorylation of osteopontin and bone sialoprotein by osteoclastic tartrate-resistant

- acid phosphatase. Modulation of osteoclast adhesion in vitro. *J. Biol. Chem.* *269*, 14853–14856.
- Embery, G., Hall, R., Waddington, R., Septier, D., and Goldberg, M. (2001). Proteoglycans in dentinogenesis. *Crit. Rev. Oral Biol. Med. Off. Publ. Am. Assoc. Oral Biol.* *12*, 331–349.
- Faccio, R., Grano, M., Colucci, S., Zallone, A.Z., Quaranta, V., and Pelletier, A.J. (1998). Activation of alpha v beta 3 integrin on human osteoclast-like cells stimulates adhesion and migration in response to osteopontin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *249*, 522–525.
- Farrow, E.G., Davis, S.I., Ward, L.M., Summers, L.J., Bubbear, J.S., Keen, R., Stamp, T.C.B., Baker, L.R.I., Bonewald, L.F., and White, K.E. (2009). Molecular analysis of DMP1 mutants causing autosomal recessive hypophosphatemic rickets. *Bone* *44*, 287–294.
- Fen, J.Q., Zhang, J., Dallas, S.L., Lu, Y., Chen, S., Tan, X., Owen, M., Harris, S.E., and MacDougall, M. (2002). Dentin matrix protein 1, a target molecule for Cbfa1 in bone, is a unique bone marker gene. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* *17*, 1822–1831.
- Feng, J.Q., Huang, H., Lu, Y., Ye, L., Xie, Y., Tsutsui, T.W., Kunieda, T., Castranio, T., Scott, G., Bonewald, L.B., et al. (2003). The Dentin matrix protein 1 (Dmp1) is specifically expressed in mineralized, but not soft, tissues during development. *J. Dent. Res.* *82*, 776–780.
- Feng, J.Q., Ward, L.M., Liu, S., Lu, Y., Xie, Y., Yuan, B., Yu, X., Rauch, F., Davis, S.I., Zhang, S., et al. (2006). Loss of DMP1 causes rickets and osteomalacia and identifies a role for osteocytes in mineral metabolism. *Nat. Genet.* *38*, 1310–1315.
- Fisher, L.W., and Fedarko, N.S. (2003). Six genes expressed in bones and teeth encode the current members of the SIBLING family of proteins. *Connect. Tissue Res.* *44 Suppl 1*, 33–40.
- Fisher, L.W., Torchia, D.A., Fohr, B., Young, M.F., and Fedarko, N.S. (2001). Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *280*, 460–465.
- Folkman, J., and Shing, Y. (1992). Angiogenesis. *J. Biol. Chem.* *267*, 10931–10934.
- Forster, I.C., Virkki, L., Bossi, E., Murer, H., and Biber, J. (2006a). Electrogenic kinetics of a mammalian intestinal type IIb Na<sup>(+)</sup>/P(i) cotransporter. *J. Membr. Biol.* *212*, 177–190.
- Forster, I.C., Hernando, N., Biber, J., and Murer, H. (2006b). Proximal tubular handling of phosphate: A molecular perspective. *Kidney Int.* *70*, 1548–1559.
- Freedman, S.B., and Isner, J.M. (2001). Therapeutic angiogenesis for ischemic cardiovascular disease. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *33*, 379–393.
- Fu, Q., Jilka, R.L., Manolagas, S.C., and O'Brien, C.A. (2002). Parathyroid hormone stimulates receptor activator of NFkappa B ligand and inhibits osteoprotegerin expression via protein kinase A activation of cAMP-response element-binding protein. *J. Biol. Chem.* *277*, 48868–48875.

- Fujisawa, R., and Kuboki, Y. (1992). Affinity of bone sialoprotein and several other bone and dentin acidic proteins to collagen fibrils. *Calcif. Tissue Int.* *51*, 438–442.
- Gadeau, A.P., Campan, M., Millet, D., Candresse, T., and Desgranges, C. (1993). Osteopontin overexpression is associated with arterial smooth muscle cell proliferation in vitro. *Arterioscler. Thromb. J. Vasc. Biol. Am. Heart Assoc.* *13*, 120–125.
- Ganss, B., Kim, R.H., and Sodek, J. (1999). Bone sialoprotein. *Crit. Rev. Oral Biol. Med. Off. Publ. Am. Assoc. Oral Biol.* *10*, 79–98.
- Gao, Q. (2011). Phenotypic Changes in Mineralized Tissues of Dentin Sialophosphoprotein Knock-out Mice.
- Gao, C., Guo, H., Downey, L., Marroquin, C., Wei, J., and Kuo, P.C. (2003). Osteopontin-dependent CD44v6 expression and cell adhesion in HepG2 cells. *Carcinogenesis* *24*, 1871–1878.
- Gennero, I., Moulin, P., Edouard, T., Conte-Auriol, F., Tauber, M.T., and Salles, J.P. (2004). [Bone mineral metabolism: recent data and perspectives related to osteogenesis]. *Arch. Pédiatrie Organe Off. Société Fr. Pédiatrie* *11*, 1473–1483.
- George, A., Silberstein, R., and Veis, A. (1995). In situ hybridization shows Dmp1 (AG1) to be a developmentally regulated dentin-specific protein produced by mature odontoblasts. *Connect. Tissue Res.* *33*, 67–72.
- Gerber, H.P., and Ferrara, N. (2000). Angiogenesis and bone growth. *Trends Cardiovasc. Med.* *10*, 223–228.
- Gerber, H.P., Vu, T.H., Ryan, A.M., Kowalski, J., Werb, Z., and Ferrara, N. (1999). VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat. Med.* *5*, 623–628.
- Goldberg, H.A., Warner, K.J., Li, M.C., and Hunter, G.K. (2001). Binding of bone sialoprotein, osteopontin and synthetic polypeptides to hydroxyapatite. *Connect. Tissue Res.* *42*, 25–37.
- Gordon, J.A.R., Tye, C.E., Sampaio, A.V., Underhill, T.M., Hunter, G.K., and Goldberg, H.A. (2007). Bone sialoprotein expression enhances osteoblast differentiation and matrix mineralization in vitro. *Bone* *41*, 462–473.
- Gordon, J.A.R., Hunter, G.K., and Goldberg, H.A. (2009). Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway by bone sialoprotein regulates osteoblast differentiation. *Cells Tissues Organs* *189*, 138–143.
- Gorski, J.P., Wang, A., Lovitch, D., Law, D., Powell, K., and Midura, R.J. (2004). Extracellular bone acidic glycoprotein-75 defines condensed mesenchyme regions to be mineralized and localizes with bone sialoprotein during intramembranous bone formation. *J. Biol. Chem.* *279*, 25455–25463.
- Govoni, K.E., Wergedal, J.E., Florin, L., Angel, P., Baylink, D.J., and Mohan, S. (2007a). Conditional deletion of insulin-like growth factor-I in collagen type 1alpha2-expressing cells

- results in postnatal lethality and a dramatic reduction in bone accretion. *Endocrinology* 148, 5706–5715.
- Govoni, K.E., Lee, S.K., Chung, Y.-S., Behringer, R.R., Wergedal, J.E., Baylink, D.J., and Mohan, S. (2007b). Disruption of insulin-like growth factor-I expression in type II $\alpha$  collagen-expressing cells reduces bone length and width in mice. *Physiol. Genomics* 30, 354–362.
- Gowen, L.C., Petersen, D.N., Mansolf, A.L., Qi, H., Stock, J.L., Tkalcevic, G.T., Simmons, H.A., Crawford, D.T., Chidsey-Frink, K.L., Ke, H.Z., et al. (2003). Targeted disruption of the osteoblast/osteocyte factor 45 gene (OF45) results in increased bone formation and bone mass. *J. Biol. Chem.* 278, 1998–2007.
- Griffioen, A.W., and Molema, G. (2000). Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. *Pharmacol. Rev.* 52, 237–268.
- Gronthos, S., Zannettino, A.C., Graves, S.E., Ohta, S., Hay, S.J., and Simmons, P.J. (1999). Differential cell surface expression of the STRO-1 and alkaline phosphatase antigens on discrete developmental stages in primary cultures of human bone cells. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 14, 47–56.
- Guevara-Aguirre, J., Rosenbloom, A.L., Vasconez, O., Martinez, V., Gargosky, S.E., Allen, L., and Rosenfeld, R.G. (1997). Two-year treatment of growth hormone (GH) receptor deficiency with recombinant insulin-like growth factor I in 22 children: comparison of two dosage levels and to GH-treated GH deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 629–633.
- Guimarães, G.N., Stipp, R.N., Rodrigues, T.L., de Souza, A.P., Line, S.R.P., and Marques, M.R. (2013). Evaluation of the effects of transient or continuous PTH administration to odontoblast-like cells. *Arch. Oral Biol.* 58, 638–645.
- Guo, R., Rowe, P.S.N., Liu, S., Simpson, L.G., Xiao, Z.-S., and Quarles, L.D. (2002). Inhibition of MEPE cleavage by Phex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297, 38–45.
- Haigh, J.J., Gerber, H.P., Ferrara, N., and Wagner, E.F. (2000). Conditional inactivation of VEGF-A in areas of collagen2a1 expression results in embryonic lethality in the heterozygous state. *Dev. Camb. Engl.* 127, 1445–1453.
- Hamada, Y., Nokihara, K., Okazaki, M., Fujitani, W., Matsumoto, T., Matsuo, M., Umakoshi, Y., Takahashi, J., and Matsuura, N. (2003). Angiogenic activity of osteopontin-derived peptide SVVYGLR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310, 153–157.
- Hartmann, C. (2006). A Wnt canon orchestrating osteoblastogenesis. *Trends Cell Biol.* 16, 151–158.
- Hazenberg, J.G., Taylor, D., and Lee, T.C. (2006). Dynamic short crack growth in cortical bone. *Technol. Health Care Off. J. Eur. Soc. Eng. Med.* 14, 393–402.
- Hiraki, Y., Inoue, H., Iyama, K., Kamizono, A., Ochiai, M., Shukunami, C., Iijima, S., Suzuki, F., and Kondo, J. (1997). Identification of chondromodulin I as a novel endothelial cell growth inhibitor. Purification and its localization in the avascular zone of epiphyseal cartilage. *J. Biol. Chem.* 272, 32419–32426.

- Hirama, M., Takahashi, F., Takahashi, K., Akutagawa, S., Shimizu, K., Soma, S., Shimanuki, Y., Nishio, K., and Fukuchi, Y. (2003). Osteopontin overproduced by tumor cells acts as a potent angiogenic factor contributing to tumor growth. *Cancer Lett.* *198*, 107–117.
- Hirst, K.L., Ibaraki-O'Connor, K., Young, M.F., and Dixon, M.J. (1997). Cloning and expression analysis of the bovine dentin matrix acidic phosphoprotein gene. *J. Dent. Res.* *76*, 754–760.
- Horner, A., Bishop, N.J., Bord, S., Beeton, C., Kelsall, A.W., Coleman, N., and Compston, J.E. (1999). Immunolocalisation of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human neonatal growth plate cartilage. *J. Anat.* *194 (Pt 4)*, 519–524.
- Horton, W.A., and Degnin, C.R. (2009). FGFs in endochondral skeletal development. *Trends Endocrinol. Metab.* *TEM 20*, 341–348.
- Hruska, K.A., Rolnick, F., Huskey, M., Alvarez, U., and Cheresch, D. (1995). Engagement of the osteoclast integrin alpha v beta 3 by osteopontin stimulates phosphatidylinositol 3-hydroxyl kinase activity. *Endocrinology* *136*, 2984–2992.
- Hu, D.D., Lin, E.C., Kovach, N.L., Hoyer, J.R., and Smith, J.W. (1995a). A biochemical characterization of the binding of osteopontin to integrins alpha v beta 1 and alpha v beta 5. *J. Biol. Chem.* *270*, 26232–26238.
- Hu, D.D., Hoyer, J.R., and Smith, J.W. (1995b). Ca<sup>2+</sup> suppresses cell adhesion to osteopontin by attenuating binding affinity for integrin alpha v beta 3. *J. Biol. Chem.* *270*, 9917–9925.
- Huang, W., Carlsen, B., Rudkin, G., Berry, M., Ishida, K., Yamaguchi, D.T., and Miller, T.A. (2004). Osteopontin is a negative regulator of proliferation and differentiation in MC3T3-E1 pre-osteoblastic cells. *Bone* *34*, 799–808.
- Hunter, G.K., Wong, K.S., and Kim, J.J. (1988). Binding of calcium to glycosaminoglycans: an equilibrium dialysis study. *Arch. Biochem. Biophys.* *260*, 161–167.
- Hunter, G.K., Kyle, C.L., and Goldberg, H.A. (1994). Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: structural specificity of the osteopontin-mediated inhibition of hydroxyapatite formation. *Biochem. J.* *300 (Pt 3)*, 723–728.
- Hunter, G.K., Hauschka, P.V., Poole, A.R., Rosenberg, L.C., and Goldberg, H.A. (1996). Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochem. J.* *317 (Pt 1)*, 59–64.
- Hunziker, E.B., Wagner, J., and Zapf, J. (1994). Differential effects of insulin-like growth factor I and growth hormone on developmental stages of rat growth plate chondrocytes in vivo. *J. Clin. Invest.* *93*, 1078–1086.
- Huq, N.L., Cross, K.J., Ung, M., and Reynolds, E.C. (2005). A review of protein structure and gene organisation for proteins associated with mineralised tissue and calcium phosphate stabilisation encoded on human chromosome 4. *Arch. Oral Biol.* *50*, 599–609.
- Hurley, M.M., Tetradis, S., Huang, Y.F., Hock, J., Kream, B.E., Raisz, L.G., and Sabbieti, M.G. (1999). Parathyroid hormone regulates the expression of fibroblast growth factor-2 mRNA

- and fibroblast growth factor receptor mRNA in osteoblastic cells. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* *14*, 776–783.
- Ihara, H., Denhardt, D.T., Furuya, K., Yamashita, T., Muguruma, Y., Tsuji, K., Hruska, K.A., Higashio, K., Enomoto, S., Nifuji, A., et al. (2001). Parathyroid hormone-induced bone resorption does not occur in the absence of osteopontin. *J. Biol. Chem.* *276*, 13065–13071.
- Ishijima, M., Tsuji, K., Rittling, S.R., Yamashita, T., Kurosawa, H., Denhardt, D.T., Nifuji, A., and Noda, M. (2002). Resistance to unloading-induced three-dimensional bone loss in osteopontin-deficient mice. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* *17*, 661–667.
- Ishizuya, T., Yokose, S., Hori, M., Noda, T., Suda, T., Yoshiki, S., and Yamaguchi, A. (1997). Parathyroid hormone exerts disparate effects on osteoblast differentiation depending on exposure time in rat osteoblastic cells. *J. Clin. Invest.* *99*, 2961–2970.
- Iwaniec, U.T., Wronski, T.J., Liu, J., Rivera, M.F., Arzaga, R.R., Hansen, G., and Brommage, R. (2007). PTH stimulates bone formation in mice deficient in *Lrp5*. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* *22*, 394–402.
- Jain, A., Fedarko, N.S., Collins, M.T., Gelman, R., Ankrom, M.A., Tayback, M., and Fisher, L.W. (2004). Serum Levels of Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein (MEPE) in Normal Humans Correlate with Serum Phosphorus, Parathyroid Hormone and Bone Mineral Density. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *89*, 4158–4161.
- Jain, A., Karadag, A., Fisher, L.W., and Fedarko, N.S. (2008). Structural requirements for bone sialoprotein binding and modulation of matrix metalloproteinase-2. *Biochemistry (Mosc.)* *47*, 10162–10170.
- Jang, J.-H., and Kim, J.-H. (2005). Improved cellular response of osteoblast cells using recombinant human osteopontin protein produced by *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* *27*, 1767–1770.
- Jilka, R.L. (2007). Molecular and cellular mechanisms of the anabolic effect of intermittent PTH. *Bone* *40*, 1434–1446.
- Jilka, R.L., Weinstein, R.S., Bellido, T., Roberson, P., Parfitt, A.M., and Manolagas, S.C. (1999). Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone. *J. Clin. Invest.* *104*, 439–446.
- Jono, S., Peinado, C., and Giachelli, C.M. (2000). Phosphorylation of osteopontin is required for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification. *J. Biol. Chem.* *275*, 20197–20203.
- Joshi, R., Tawfik, A., Edeh, N., McCloud, V., Looney, S., Lewis, J., Hsu, S., and Ogbureke, K.U.E. (2010). Dentin sialophosphoprotein (DSPP) gene-silencing inhibits key tumorigenic activities in human oral cancer cell line, OSC2. *PloS One* *5*, e13974.
- Kaartinen, M.T., Pirhonen, A., Linnala-Kankkunen, A., and Mäenpää, P.H. (1999). Cross-linking of osteopontin by tissue transglutaminase increases its collagen binding properties. *J. Biol. Chem.* *274*, 1729–1735.

- Kasugai, S., Zhang, Q., Overall, C.M., Wrana, J.L., Butler, W.T., and Sodek, J. (1991). Differential regulation of the 55 and 44 kDa forms of secreted phosphoprotein 1 (SPP-1, osteopontin) in normal and transformed rat bone cells by osteotropic hormones, growth factors and a tumor promoter. *Bone Miner.* *13*, 235–250.
- Katayama, Y., House, C.M., Udagawa, N., Kazama, J.J., McFarland, R.J., Martin, T.J., and Findlay, D.M. (1998). Casein kinase 2 phosphorylation of recombinant rat osteopontin enhances adhesion of osteoclasts but not osteoblasts. *J. Cell. Physiol.* *176*, 179–187.
- Kato, N., Nakayama, Y., Nakajima, Y., Samoto, H., Saito, R., Yamanouchi, F., Masunaga, H., Shimizu, E., and Ogata, Y. (2006). Regulation of bone sialoprotein (BSP) gene transcription by lipopolysaccharide. *J. Cell. Biochem.* *97*, 368–379.
- Kawasaki, K. (2011). The SCPP gene family and the complexity of hard tissues in vertebrates. *Cells Tissues Organs* *194*, 108–112.
- Kawasaki, K., and Weiss, K.M. (2006). Evolutionary genetics of vertebrate tissue mineralization: the origin and evolution of the secretory calcium-binding phosphoprotein family. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* *306*, 295–316.
- Kawasaki, K., Buchanan, A.V., and Weiss, K.M. (2007). Gene duplication and the evolution of vertebrate skeletal mineralization. *Cells Tissues Organs* *186*, 7–24.
- Keller, H., and Kneissel, M. (2005). SOST is a target gene for PTH in bone. *Bone* *37*, 148–158.
- Khan, S.A., Lopez-Chua, C.A., Zhang, J., Fisher, L.W., Sørensen, E.S., and Denhardt, D.T. (2002). Soluble osteopontin inhibits apoptosis of adherent endothelial cells deprived of growth factors. *J. Cell. Biochem.* *85*, 728–736.
- Khan, S.A., Cook, A.C., Kappil, M., Günthert, U., Chambers, A.F., Tuck, A.B., and Denhardt, D.T. (2005). Enhanced cell surface CD44 variant (v6, v9) expression by osteopontin in breast cancer epithelial cells facilitates tumor cell migration: novel post-transcriptional, post-translational regulation. *Clin. Exp. Metastasis* *22*, 663–673.
- Kim, R.H., and Sodek, J. (1999). Transcription of the bone sialoprotein gene is stimulated by v-Src acting through an inverted CCAAT box. *Cancer Res.* *59*, 565–571.
- Kitahara, K., Ishijima, M., Rittling, S.R., Tsuji, K., Kurosawa, H., Nifuji, A., Denhardt, D.T., and Noda, M. (2003). Osteopontin deficiency induces parathyroid hormone enhancement of cortical bone formation. *Endocrinology* *144*, 2132–2140.
- Koyama, Y., Rittling, S.R., Tsuji, K., Hino, K., Salincarnboriboon, R., Yano, T., Taketani, Y., Nifuji, A., Denhardt, D.T., and Noda, M. (2006). Osteopontin deficiency suppresses high phosphate load-induced bone loss via specific modulation of osteoclasts. *Endocrinology* *147*, 3040–3049.
- Kramer, I., Keller, H., Leupin, O., and Kneissel, M. (2010). Does osteocytic SOST suppression mediate PTH bone anabolism? *Trends Endocrinol. Metab. TEM* *21*, 237–244.
- Krishnan, V., Bryant, H.U., and Macdougald, O.A. (2006). Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J. Clin. Invest.* *116*, 1202–1209.

- Kronenberg, H.M. (2003). Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 423, 332–336.
- Lakka, S.S., Gondi, C.S., Yanamandra, N., Dinh, D.H., Olivero, W.C., Gujrati, M., and Rao, J.S. (2003). Synergistic down-regulation of urokinase plasminogen activator receptor and matrix metalloproteinase-9 in SNB19 glioblastoma cells efficiently inhibits glioma cell invasion, angiogenesis, and tumor growth. *Cancer Res.* 63, 2454–2461.
- Landis, W.J., Jacquet, R., Hillyer, J., and Zhang, J. (2003). Analysis of osteopontin in mouse growth plate cartilage by application of laser capture microdissection and RT-PCR. *Connect. Tissue Res.* 44 Suppl 1, 28–32.
- Laroche, M. (2002). Intraosseous circulation from physiology to disease. *Jt. Bone Spine Rev. Rhum.* 69, 262–269.
- Lasa, M., Chang, P.L., Prince, C.W., and Pinna, L.A. (1997). Phosphorylation of osteopontin by Golgi apparatus casein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240, 602–605.
- Leali, D., Dell’Era, P., Stabile, H., Sennino, B., Chambers, A.F., Naldini, A., Sozzani, S., Nico, B., Ribatti, D., and Presta, M. (2003). Osteopontin (Eta-1) and fibroblast growth factor-2 cross-talk in angiogenesis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 171, 1085–1093.
- Lebrin, F., Deckers, M., Bertolino, P., and Ten Dijke, P. (2005). TGF-beta receptor function in the endothelium. *Cardiovasc. Res.* 65, 599–608.
- Lee, S.K., and Lorenzo, J.A. (1999). Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acid expression in murine bone marrow cultures: correlation with osteoclast-like cell formation. *Endocrinology* 140, 3552–3561.
- Li, X., Zhou, L., Takai, H., Sasaki, Y., Mezawa, M., Li, Z., Wang, Z., Yang, L., Wang, S., Matsumura, H., et al. (2012). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide regulates bone sialoprotein gene transcription. *J. Cell. Biochem.* 113, 2822–2834.
- Li, Z., Wang, Z., Yang, L., Li, X., Sasaki, Y., Wang, S., Araki, S., Mezawa, M., Takai, H., Nakayama, Y., et al. (2010). Fibroblast growth factor 2 regulates bone sialoprotein gene transcription in human breast cancer cells. *J. Oral Sci.* 52, 125–132.
- Liaw, L., Almeida, M., Hart, C.E., Schwartz, S.M., and Giachelli, C.M. (1994). Osteopontin promotes vascular cell adhesion and spreading and is chemotactic for smooth muscle cells in vitro. *Circ. Res.* 74, 214–224.
- Liaw, L., Lindner, V., Schwartz, S.M., Chambers, A.F., and Giachelli, C.M. (1995). Osteopontin and beta 3 integrin are coordinately expressed in regenerating endothelium in vivo and stimulate Arg-Gly-Asp-dependent endothelial migration in vitro. *Circ. Res.* 77, 665–672.
- Ling, Y., Rios, H.F., Myers, E.R., Lu, Y., Feng, J.Q., and Boskey, A.L. (2005). DMP1 depletion decreases bone mineralization in vivo: an FTIR imaging analysis. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 20, 2169–2177.
- Long, F., Chung, U., Ohba, S., McMahon, J., Kronenberg, H.M., and McMahon, A.P. (2004). Ihh signaling is directly required for the osteoblast lineage in the endochondral skeleton. *Dev. Camb. Engl.* 131, 1309–1318.

- Lories, R.J., Corr, M., and Lane, N.E. (2013). To Wnt or not to Wnt: the bone and joint health dilemma. *Nat. Rev. Rheumatol.* *9*, 328–339.
- Lu, Y., Yuan, B., Qin, C., Cao, Z., Xie, Y., Dallas, S.L., McKee, M.D., Drezner, M.K., Bonewald, L.F., and Feng, J.Q. (2011). The biological function of DMP-1 in osteocyte maturation is mediated by its 57-kDa C-terminal fragment. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* *26*, 331–340.
- Lv, K., Huang, H., Lu, Y., Qin, C., Li, Z., and Feng, J.Q. (2010). Circling behavior developed in *Dmp1* null mice is due to bone defects in the vestibular apparatus. *Int. J. Biol. Sci.* *6*, 537–545.
- Lyden, D., Hattori, K., Dias, S., Costa, C., Blaikie, P., Butros, L., Chadburn, A., Heissig, B., Marks, W., Witte, L., et al. (2001). Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat. Med.* *7*, 1194–1201.
- Ma, Y.L., Cain, R.L., Halladay, D.L., Yang, X., Zeng, Q., Miles, R.R., Chandrasekhar, S., Martin, T.J., and Onyia, J.E. (2001). Catabolic effects of continuous human PTH (1–38) in vivo is associated with sustained stimulation of RANKL and inhibition of osteoprotegerin and gene-associated bone formation. *Endocrinology* *142*, 4047–4054.
- MacDougall, M., Simmons, D., Gu, T.T., and Dong, J. (2002). MEPE/OF45, a new dentin/bone matrix protein and candidate gene for dentin diseases mapping to chromosome 4q21. *Connect. Tissue Res.* *43*, 320–330.
- Malaval, L., Wade-Guéye, N.M., Boudiffa, M., Fei, J., Zirngibl, R., Chen, F., Laroche, N., Roux, J.-P., Burt-Pichat, B., Duboeuf, F., et al. (2008). Bone sialoprotein plays a functional role in bone formation and osteoclastogenesis. *J. Exp. Med.* *205*, 1145–1153.
- Mariani, F.V., Ahn, C.P., and Martin, G.R. (2008). Genetic evidence that FGFs have an instructive role in limb proximal-distal patterning. *Nature* *453*, 401–405.
- Marie, P.J. (2002). Role of N-cadherin in bone formation. *J. Cell. Physiol.* *190*, 297–305.
- Mariotti, M., and Maier, J.A.M. (2006). Angiogenesis: An Overview. In *New Frontiers in Angiogenesis*, R. Forough, ed. (Springer Netherlands), pp. 1–29.
- Mark, M.P., Prince, C.W., Oosawa, T., Gay, S., Bronckers, A.L., and Butler, W.T. (1987). Immunohistochemical demonstration of a 44-KD phosphoprotein in developing rat bones. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* *35*, 707–715.
- Martin, A., David, V., Laurence, J.S., Schwarz, P.M., Lafer, E.M., Hedge, A.-M., and Rowe, P.S.N. (2008). Degradation of MEPE, DMP1, and release of SIBLING ASARM-peptides (minhibins): ASARM-peptide(s) are directly responsible for defective mineralization in HYP. *Endocrinology* *149*, 1757–1772.
- Martin, A., David, V., and Quarles, L.D. (2012). Regulation and function of the FGF23/klotho endocrine pathways. *Physiol. Rev.* *92*, 131–155.

- McKee, M.D., and Nanci, A. (1996a). Osteopontin at mineralized tissue interfaces in bone, teeth, and osseointegrated implants: ultrastructural distribution and implications for mineralized tissue formation, turnover, and repair. *Microsc. Res. Tech.* *33*, 141–164.
- McKee, M.D., and Nanci, A. (1996b). Osteopontin deposition in remodeling bone: an osteoblast mediated event. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* *11*, 873–875.
- McWay, F., Lessard, M., and Lafage-Proust, M.-H. (2012). Physiopathologie de l'ostéodystrophie rénale. *Rev. Rhum.* *79*, *Supplement 1*, A18–A21.
- Mezawa, M., Araki, S., Takai, H., Sasaki, Y., Wang, S., Li, X., Kim, D.-S., Nakayama, Y., and Ogata, Y. (2009). Regulation of human bone sialoprotein gene transcription by platelet-derived growth factor-BB. *Gene* *435*, 80–87.
- Miyauchi, A., Alvarez, J., Greenfield, E.M., Teti, A., Grano, M., Colucci, S., Zamboni-Zallone, A., Ross, F.P., Teitelbaum, S.L., and Cheresch, D. (1991). Recognition of osteopontin and related peptides by an alpha v beta 3 integrin stimulates immediate cell signals in osteoclasts. *J. Biol. Chem.* *266*, 20369–20374.
- Mohan, S., Richman, C., Guo, R., Amaar, Y., Donahue, L.R., Wergedal, J., and Baylink, D.J. (2003). Insulin-like growth factor regulates peak bone mineral density in mice by both growth hormone-dependent and -independent mechanisms. *Endocrinology* *144*, 929–936.
- Moses, M.A. (1993). A cartilage-derived inhibitor of neovascularization and metalloproteinases. *Clin. Exp. Rheumatol.* *11 Suppl 8*, S67–69.
- Moses, M.A., Sudhalter, J., and Langer, R. (1990). Identification of an inhibitor of neovascularization from cartilage. *Science* *248*, 1408–1410.
- Moses, M.A., Sudhalter, J., and Langer, R. (1992). Isolation and characterization of an inhibitor of neovascularization from scapular chondrocytes. *J. Cell Biol.* *119*, 475–482.
- Murrills, R. (2006). Parathyroid hormone and bone cells. *Clin. Rev. Bone Miner. Metab.* *4*, 233–257.
- Murshed, M., Schinke, T., McKee, M.D., and Karsenty, G. (2004). Extracellular matrix mineralization is regulated locally; different roles of two gla-containing proteins. *J. Cell Biol.* *165*, 625–630.
- Nagata, T., Todescan, R., Goldberg, H.A., Zhang, Q., and Sodek, J. (1989). Sulphation of secreted phosphoprotein I (SPPI, osteopontin) is associated with mineralized tissue formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *165*, 234–240.
- Nakayama, Y., Nakajima, Y., Kato, N., Takai, H., Kim, D.-S., Arai, M., Mezawa, M., Araki, S., Sodek, J., and Ogata, Y. (2006). Insulin-like growth factor-I increases bone sialoprotein (BSP) expression through fibroblast growth factor-2 response element and homeodomain protein-binding site in the proximal promoter of the BSP gene. *J. Cell. Physiol.* *208*, 326–335.
- Nampei, A., Hashimoto, J., Hayashida, K., Tsuboi, H., Shi, K., Tsuji, I., Miyashita, H., Yamada, T., Matsukawa, N., Matsumoto, M., et al. (2004). Matrix extracellular phosphoglycoprotein

- (MEPE) is highly expressed in osteocytes in human bone. *J. Bone Miner. Metab.* 22, 176–184.
- Nanci, A. (1999). Content and distribution of noncollagenous matrix proteins in bone and cementum: relationship to speed of formation and collagen packing density. *J. Struct. Biol.* 126, 256–269.
- Narayanan, K., Srinivas, R., Ramachandran, A., Hao, J., Quinn, B., and George, A. (2001). Differentiation of embryonic mesenchymal cells to odontoblast-like cells by overexpression of dentin matrix protein 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 4516–4521.
- Nilsson, O., Marino, R., De Luca, F., Phillip, M., and Baron, J. (2005). Endocrine regulation of the growth plate. *Horm. Res.* 64, 157–165.
- Noda, M., and Rodan, G.A. (1989). Transcriptional regulation of osteopontin production in rat osteoblast-like cells by parathyroid hormone. *J. Cell Biol.* 108, 713–718.
- Ogata, Y. (2008). Bone sialoprotein and its transcriptional regulatory mechanism. *J. Periodontal Res.* 43, 127–135.
- Ogata, Y., Nakao, S., Kim, R.H., Li, J.J., Furuyama, S., Sugiya, H., and Sodek, J. (2000). Parathyroid hormone regulation of bone sialoprotein (BSP) gene transcription is mediated through a pituitary-specific transcription factor-1 (Pit-1) motif in the rat BSP gene promoter. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 19, 395–407.
- Ogbureke, K.U.E., and Fisher, L.W. (2004). Expression of SIBLINGs and their partner MMPs in salivary glands. *J. Dent. Res.* 83, 664–670.
- Ogbureke, K.U.E., and Fisher, L.W. (2005). Renal expression of SIBLING proteins and their partner matrix metalloproteinases (MMPs). *Kidney Int.* 68, 155–166.
- Ogbureke, K.U.E., Nikitakis, N.G., Warburton, G., Ord, R.A., Sauk, J.J., Waller, J.L., and Fisher, L.W. (2007). Up-regulation of SIBLING proteins and correlation with cognate MMP expression in oral cancer. *Oral Oncol.* 43, 920–932.
- Ogbureke, K.U.E., Abdelsayed, R.A., Kushner, H., Li, L., and Fisher, L.W. (2010). Two members of the SIBLING family of proteins, DSPP and BSP, may predict the transition of oral epithelial dysplasia to oral squamous cell carcinoma. *Cancer* 116, 1709–1717.
- Ohba, Y., Goto, Y., Kimura, Y., Suzuki, F., Hisa, T., Takahashi, K., and Takigawa, M. (1995). Purification of an angiogenesis inhibitor from culture medium conditioned by a human chondrosarcoma-derived chondrocytic cell line, HCS-2/8. *Biochim. Biophys. Acta* 1245, 1–8.
- Ohlsson, C., Mohan, S., Sjögren, K., Tivesten, A., Isgaard, J., Isaksson, O., Jansson, J.-O., and Svensson, J. (2009). The role of liver-derived insulin-like growth factor-I. *Endocr. Rev.* 30, 494–535.
- Oldberg, A., Franzén, A., and Heinegård, D. (1988). The primary structure of a cell-binding bone sialoprotein. *J. Biol. Chem.* 263, 19430–19432.

- Oldberg, A., Jirskog-Hed, B., Axelsson, S., and Heinegård, D. (1989). Regulation of bone sialoprotein mRNA by steroid hormones. *J. Cell Biol.* *109*, 3183–3186.
- Oni, O.O.A., and Gregg, P.J. (1990). The Routes of Venous Escape from the Marrow of the Diaphysis of Long Bones. In *Bone Circulation and Bone Necrosis*, J. Arlet, and B. Mazières, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 7–10.
- Ono, N., Nakashima, K., Rittling, S.R., Schipani, E., Hayata, T., Soma, K., Denhardt, D.T., Kronenberg, H.M., Ezura, Y., and Noda, M. (2008). Osteopontin negatively regulates parathyroid hormone receptor signaling in osteoblasts. *J. Biol. Chem.* *283*, 19400–19409.
- Ouyang, H., Franceschi, R.T., McCauley, L.K., Wang, D., and Somerman, M.J. (2000). Parathyroid hormone-related protein down-regulates bone sialoprotein gene expression in cementoblasts: role of the protein kinase A pathway. *Endocrinology* *141*, 4671–4680.
- Owen, T.A., Aronow, M., Shalhoub, V., Barone, L.M., Wilming, L., Tassinari, M.S., Kennedy, M.B., Pockwinse, S., Lian, J.B., and Stein, G.S. (1990). Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J. Cell. Physiol.* *143*, 420–430.
- pang, J., WU, B., and ZHANG, Y. (2003). Effect of PTH on the expression of DMP1 in human dental papilla cells in vitro-- 《Chinese Journal of Conservative Dentistry》 2003年07期.
- Paniccia, R., Colucci, S., Grano, M., Serra, M., Zallone, A.Z., and Teti, A. (1993). Immediate cell signal by bone-related peptides in human osteoclast-like cells. *Am. J. Physiol.* *265*, C1289–1297.
- Partridge, N.C., Bloch, S.R., and Pearman, A.T. (1994). Signal transduction pathways mediating parathyroid hormone regulation of osteoblastic gene expression. *J. Cell. Biochem.* *55*, 321–327.
- Petersen, D.N., Tkalcevic, G.T., Mansolf, A.L., Rivera-Gonzalez, R., and Brown, T.A. (2000). Identification of osteoblast/osteocyte factor 45 (OF45), a bone-specific cDNA encoding an RGD-containing protein that is highly expressed in osteoblasts and osteocytes. *J. Biol. Chem.* *275*, 36172–36180.
- Pirrotte, S., Lamour, V., Lambert, V., Alvarez Gonzalez, M.-L., Ormenese, S., Noël, A., Mottet, D., Castronovo, V., and Bellahcène, A. (2011). Dentin matrix protein 1 induces membrane expression of VE-cadherin on endothelial cells and inhibits VEGF-induced angiogenesis by blocking VEGFR-2 phosphorylation. *Blood* *117*, 2515–2526.
- Poole, K.E.S., and Reeve, J. (2005). Parathyroid hormone - a bone anabolic and catabolic agent. *Curr. Opin. Pharmacol.* *5*, 612–617.
- Pooley, J., Pooley, J.E., and Montgomery, R.J. (1990). The Central Venous Sinus of Long Bones - Its Role in Relation to Exercise. In *Bone Circulation and Bone Necrosis*, P.D.J. Arlet, and P.D.B. Mazières, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 35–39.

- Potente, M., Gerhardt, H., and Carmeliet, P. (2011). Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell* 146, 873–887.
- Prisby, R., Guignandon, A., Vanden-Bossche, A., Mac-Way, F., Linossier, M.-T., Thomas, M., Laroche, N., Malaval, L., Langer, M., Peter, Z.-A., et al. (2011). Intermittent PTH(1-84) is osteoanabolic but not osteoangiogenic and relocates bone marrow blood vessels closer to bone-forming sites. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 26, 2583–2596.
- Pugsley, M.K., and Tabrizchi, R. (2000). The vascular system. An overview of structure and function. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 44, 333–340.
- Qin, L., Li, X., Ko, J.-K., and Partridge, N.C. (2005). Parathyroid hormone uses multiple mechanisms to arrest the cell cycle progression of osteoblastic cells from G1 to S phase. *J. Biol. Chem.* 280, 3104–3111.
- Rashid, G., Bernheim, J., Green, J., and Benchetrit, S. (2007). Parathyroid hormone stimulates the endothelial nitric oxide synthase through protein kinase A and C pathways. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* 22, 2831–2837.
- Reinholt, F.P., Hulthenby, K., Oldberg, A., and Heinegård, D. (1990). Osteopontin--a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 4473–4475.
- Rickard, D.J., Wang, F.-L., Rodriguez-Rojas, A.-M., Wu, Z., Trice, W.J., Hoffman, S.J., Votta, B., Stroup, G.B., Kumar, S., and Nuttall, M.E. (2006). Intermittent treatment with parathyroid hormone (PTH) as well as a non-peptide small molecule agonist of the PTH1 receptor inhibits adipocyte differentiation in human bone marrow stromal cells. *Bone* 39, 1361–1372.
- Rittling, S.R., Matsumoto, H.N., McKee, M.D., Nanci, A., An, X.R., Novick, K.E., Kowalski, A.J., Noda, M., and Denhardt, D.T. (1998). Mice lacking osteopontin show normal development and bone structure but display altered osteoclast formation in vitro. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 13, 1101–1111.
- Roche, B., David, V., Vanden-Bossche, A., Peyrin, F., Malaval, L., Vico, L., and Lafage-Proust, M.-H. (2012). Structure and quantification of microvascularisation within mouse long bones: what and how should we measure? *Bone* 50, 390–399.
- Ross, F.P., Chappel, J., Alvarez, J.I., Sander, D., Butler, W.T., Farach-Carson, M.C., Mintz, K.A., Robey, P.G., Teitelbaum, S.L., and Cheresch, D.A. (1993). Interactions between the bone matrix proteins osteopontin and bone sialoprotein and the osteoclast integrin alpha v beta 3 potentiate bone resorption. *J. Biol. Chem.* 268, 9901–9907.
- Rowe, P.S., de Zoysa, P.A., Dong, R., Wang, H.R., White, K.E., Econs, M.J., and Oudet, C.L. (2000a). MEPE, a new gene expressed in bone marrow and tumors causing osteomalacia. *Genomics* 67, 54–68.
- Rowe, P.S., de Zoysa, P.A., Dong, R., Wang, H.R., White, K.E., Econs, M.J., and Oudet, C.L. (2000b). MEPE, a new gene expressed in bone marrow and tumors causing osteomalacia. *Genomics* 67, 54–68.

- Rowe, P.S.N., Matsumoto, N., Jo, O.D., Shih, R.N.J., Oconnor, J., Roudier, M.P., Bain, S., Liu, S., Harrison, J., and Yanagawa, N. (2006). Correction of the mineralization defect in hyp mice treated with protease inhibitors CA074 and pepstatin. *Bone* 39, 773–786.
- Ryther, R.C.C., Flynt, A.S., Harris, B.D., Phillips, J.A., 3rd, and Patton, J.G. (2004). GH1 splicing is regulated by multiple enhancers whose mutation produces a dominant-negative GH isoform that can be degraded by allele-specific small interfering RNA (siRNA). *Endocrinology* 145, 2988–2996.
- Saavedra, R.A. (1994). The roles of autophosphorylation and phosphorylation in the life of osteopontin. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 16, 913–918.
- Samanna, V., Wei, H., Ego-Osuala, D., and Chellaiah, M.A. (2006). Alpha-V-dependent outside-in signaling is required for the regulation of CD44 surface expression, MMP-2 secretion, and cell migration by osteopontin in human melanoma cells. *Exp. Cell Res.* 312, 2214–2230.
- Samoto, H., Shimizu, E., Matsuda-Honjo, Y., Saito, R., Yamazaki, M., Kasai, K., Furuyama, S., Sugiya, H., Sodek, J., and Ogata, Y. (2002). TNF-alpha suppresses bone sialoprotein (BSP) expression in ROS17/2.8 cells. *J. Cell. Biochem.* 87, 313–323.
- Samoto, H., Shimizu, E., Matsuda-Honjo, Y., Saito, R., Nakao, S., Yamazaki, M., Furuyama, S., Sugiya, H., Sodek, J., and Ogata, Y. (2003). Prostaglandin E2 stimulates bone sialoprotein (BSP) expression through cAMP and fibroblast growth factor 2 response elements in the proximal promoter of the rat BSP gene. *J. Biol. Chem.* 278, 28659–28667.
- Sasaki, Y., Wang, S., and Ogata, Y. (2011). Transcriptional regulation of bone sialoprotein gene by CO(2) laser irradiation. *J. Oral Sci.* 53, 51–59.
- Sato, M., Westmore, M., Ma, Y.L., Schmidt, A., Zeng, Q.Q., Glass, E.V., Vahle, J., Brommage, R., Jerome, C.P., and Turner, C.H. (2004). Teriparatide [PTH(1-34)] strengthens the proximal femur of ovariectomized nonhuman primates despite increasing porosity. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 19, 623–629.
- Sawakami, K., Robling, A.G., Ai, M., Pitner, N.D., Liu, D., Warden, S.J., Li, J., Maye, P., Rowe, D.W., Duncan, R.L., et al. (2006). The Wnt co-receptor LRP5 is essential for skeletal mechanotransduction but not for the anabolic bone response to parathyroid hormone treatment. *J. Biol. Chem.* 281, 23698–23711.
- Scatena, M., Almeida, M., Chaisson, M.L., Fausto, N., Nicosia, R.F., and Giachelli, C.M. (1998). NF-kappaB mediates alphavbeta3 integrin-induced endothelial cell survival. *J. Cell Biol.* 141, 1083–1093.
- Schiavi, S.C. (2006). Bone talk. *Nat. Genet.* 38, 1230–1231.
- Schiffrin, E.L. (2006). Effects of aldosterone on the vasculature. *Hypertension* 47, 312–318.
- Schneider, G.B., Whitson, S.W., and Cooper, L.F. (1999). Restricted and coordinated expression of beta3-integrin and bone sialoprotein during cultured osteoblast differentiation. *Bone* 24, 321–327.

- Senger, D.R., Ledbetter, S.R., Claffey, K.P., Papadopoulos-Sergiou, A., Peruzzi, C.A., and Detmar, M. (1996). Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving the alphavbeta3 integrin, osteopontin, and thrombin. *Am. J. Pathol.* *149*, 293–305.
- Serini, G., Valdembri, D., and Bussolino, F. (2006). Integrins and angiogenesis: a sticky business. *Exp. Cell Res.* *312*, 651–658.
- Shen, Z., Heinegård, D., and Sommarin, Y. (1995). Distribution and expression of cartilage oligomeric matrix protein and bone sialoprotein show marked changes during rat femoral head development. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* *14*, 773–781.
- Shimizu, E., and Ogata, Y. (2002). Activation of bone sialoprotein gene transcription by flavonoids is mediated through an inverted CCAAT box in ROS 17/2.8 cells. *J. Cell. Biochem.* *86*, 35–44.
- Shimizu, E., Matsuda-Honjyo, Y., Samoto, H., Saito, R., Nakajima, Y., Nakayama, Y., Kato, N., Yamazaki, M., and Ogata, Y. (2004). Static magnetic fields-induced bone sialoprotein (BSP) expression is mediated through FGF2 response element and pituitary-specific transcription factor-1 motif. *J. Cell. Biochem.* *91*, 1183–1196.
- Shimizu-Sasaki, E., Yamazaki, M., Furuyama, S., Sugiya, H., Sodek, J., and Ogata, Y. (2001). Identification of a novel response element in the rat bone sialoprotein (BSP) gene promoter that mediates constitutive and fibroblast growth factor 2-induced expression of BSP. *J. Biol. Chem.* *276*, 5459–5466.
- Shimizu-Sasaki, E., Yamazaki, M., Furuyama, S., Sugiya, H., Sodek, J., and Ogata, Y. (2003). Identification of FGF2-response element in the rat bone sialoprotein gene promoter. *Connect. Tissue Res.* *44 Suppl 1*, 103–108.
- Silvestrini, G., Ballanti, P., Leopizzi, M., Sebastiani, M., Berni, S., Di Vito, M., and Bonucci, E. (2007). Effects of intermittent parathyroid hormone (PTH) administration on SOST mRNA and protein in rat bone. *J. Mol. Histol.* *38*, 261–269.
- Sims, N.A., Clément-Lacroix, P., Da Ponte, F., Bouali, Y., Binart, N., Moriggl, R., Goffin, V., Coschigano, K., Gaillard-Kelly, M., Kopchick, J., et al. (2000). Bone homeostasis in growth hormone receptor-null mice is restored by IGF-I but independent of Stat5. *J. Clin. Invest.* *106*, 1095–1103.
- Sodek, J., Chen, J., Nagata, T., Kasugai, S., Todescan, R., Jr, Li, I.W., and Kim, R.H. (1995). Regulation of osteopontin expression in osteoblasts. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *760*, 223–241.
- Sodek, J., Ganss, B., and McKee, M.D. (2000). Osteopontin. *Crit. Rev. Oral Biol. Med. Off. Publ. Am. Assoc. Oral Biol.* *11*, 279–303.
- Sreenath, T., Thyagarajan, T., Hall, B., Longenecker, G., D'Souza, R., Hong, S., Wright, J.T., MacDougall, M., Sauk, J., and Kulkarni, A.B. (2003). Dentin sialophosphoprotein knockout mouse teeth display widened predentin zone and develop defective dentin mineralization similar to human dentinogenesis imperfecta type III. *J. Biol. Chem.* *278*, 24874–24880.

- Staines, K.A., Mackenzie, N.C.W., Clarkin, C.E., Zelenchuk, L., Rowe, P.S., MacRae, V.E., and Farquharson, C. (2012). MEPE is a novel regulator of growth plate cartilage mineralization. *Bone* 51, 418–430.
- Stier, S., Ko, Y., Forkert, R., Lutz, C., Neuhaus, T., Grünwald, E., Cheng, T., Dombkowski, D., Calvi, L.M., Rittling, S.R., et al. (2005). Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size. *J. Exp. Med.* 201, 1781–1791.
- Sugimoto, T., Kano, J., Fukase, M., and Fujita, T. (1992). The activation of cAMP-dependent protein kinase is directly linked to homologous desensitization by parathyroid hormone (PTH) and PTH-related peptide in osteoblastic osteosarcoma cells. *Horm. Metab. Res. Horm. Stoffwechselforschung Horm. Métabolisme* 24, 347–348.
- Sutter, N.B., Bustamante, C.D., Chase, K., Gray, M.M., Zhao, K., Zhu, L., Padhukasahasram, B., Karlins, E., Davis, S., Jones, P.G., et al. (2007). A single IGF1 allele is a major determinant of small size in dogs. *Science* 316, 112–115.
- Suzuki, K., Zhu, B., Rittling, S.R., Denhardt, D.T., Goldberg, H.A., McCulloch, C.A.G., and Sodek, J. (2002). Colocalization of intracellular osteopontin with CD44 is associated with migration, cell fusion, and resorption in osteoclasts. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 17, 1486–1497.
- Suzuki, S., Sreenath, T., Haruyama, N., Honeycutt, C., Terse, A., Cho, A., Kohler, T., Müller, R., Goldberg, M., and Kulkarni, A.B. (2009). Dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein have distinct roles in dentin mineralization. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 28, 221–229.
- Tada, K., Fukunaga, T., Wakabayashi, Y., Masumi, S., Sato, Y., Izumi, H., Kohno, K., and Kuwano, M. (1994). Inhibition of tubular morphogenesis in human microvascular endothelial cells by co-culture with chondrocytes and involvement of transforming growth factor beta: a model for avascularity in human cartilage. *Biochim. Biophys. Acta* 1201, 135–142.
- Takahashi, F., Akutagawa, S., Fukumoto, H., Tsukiyama, S., Ohe, Y., Takahashi, K., Fukuchi, Y., Saijo, N., and Nishio, K. (2002). Osteopontin induces angiogenesis of murine neuroblastoma cells in mice. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 98, 707–712.
- Terasawa, M., Shimokawa, R., Terashima, T., Ohya, K., Takagi, Y., and Shimokawa, H. (2004). Expression of dentin matrix protein 1 (DMP1) in nonmineralized tissues. *J. Bone Miner. Metab.* 22, 430–438.
- Tfelt-Hansen, J., and Brown, E.M. (2005). The calcium-sensing receptor in normal physiology and pathophysiology: a review. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 42, 35–70.
- Turner, P.J., Chen, C.G., Ionova-Martin, S., Sun, L., Harman, A., Porter, A., Ager, J.W., 3rd, Ritchie, R.O., and Alliston, T. (2010). Osteopontin deficiency increases bone fragility but preserves bone mass. *Bone* 46, 1564–1573.
- Tian, Y., Xu, Y., Fu, Q., and He, M. (2011). Parathyroid hormone regulates osteoblast differentiation in a Wnt/ $\beta$ -catenin-dependent manner. *Mol. Cell. Biochem.* 355, 211–216.

- Trueta, J., and Amato, V.P. (1960). The vascular contribution to osteogenesis. III. Changes in the growth cartilage caused by experimentally induced ischaemia. *J. Bone Joint Surg. Br.* *42-B*, 571–587.
- TRUETA, J., and MORGAN, J.D. (1960). The vascular contribution to osteogenesis. I. Studies by the injection method. *J. Bone Joint Surg. Br.* *42-B*, 97–109.
- Tsuchiya, S., Simmer, J.P., Hu, J.C.-C., Richardson, A.S., Yamakoshi, F., and Yamakoshi, Y. (2011). Astacin proteases cleave dentin sialophosphoprotein (Dspp) to generate dentin phosphoprotein (Dpp). *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* *26*, 220–228.
- Ucuzian, A.A., Gassman, A.A., East, A.T., and Greisler, H.P. (2010). Molecular mediators of angiogenesis. *J. Burn Care Res. Off. Publ. Am. Burn Assoc.* *31*, 158–175.
- Valverde, P., Tu, Q., and Chen, J. (2005). BSP and RANKL induce osteoclastogenesis and bone resorption synergistically. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* *20*, 1669–1679.
- Valverde, P., Zhang, J., Fix, A., Zhu, J., Ma, W., Tu, Q., and Chen, J. (2008). Overexpression of bone sialoprotein leads to an uncoupling of bone formation and bone resorption in mice. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* *23*, 1775–1788.
- Verdelis, K., Ling, Y., Sreenath, T., Haruyama, N., MacDougall, M., van der Meulen, M.C.H., Lukashova, L., Spevak, L., Kulkarni, A.B., and Boskey, A.L. (2008). DSPP effects on in vivo bone mineralization. *Bone* *43*, 983–990.
- Wade-Gueye, N.M., Boudiffa, M., Laroche, N., Vanden-Bossche, A., Fournier, C., Aubin, J.E., Vico, L., Lafage-Proust, M.-H., and Malaval, L. (2010). Mice Lacking Bone Sialoprotein (BSP) Lose Bone after Ovariectomy and Display Skeletal Site-Specific Response to Intermittent PTH Treatment. *Endocrinology* *151*, 5103–5113.
- Wade-Gueye, N.M., Boudiffa, M., Vanden-Bossche, A., Laroche, N., Aubin, J.E., Vico, L., Lafage-Proust, M.-H., and Malaval, L. (2012). Absence of bone sialoprotein (BSP) impairs primary bone formation and resorption: the marrow ablation model under PTH challenge. *Bone* *50*, 1064–1073.
- Wang, J., Zhou, J., and Bondy, C.A. (1999a). Igf1 promotes longitudinal bone growth by insulin-like actions augmenting chondrocyte hypertrophy. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *13*, 1985–1990.
- Wang, J., Zhou, J., and Bondy, C.A. (1999b). Igf1 promotes longitudinal bone growth by insulin-like actions augmenting chondrocyte hypertrophy. *FASEB J.* *13*, 1985–1990.
- Wang, S., Sasaki, Y., Zhou, L., Matsumura, H., Araki, S., Mezawa, M., Takai, H., Chen, Z., and Ogata, Y. (2011). Transcriptional regulation of bone sialoprotein gene by interleukin-11. *Gene* *476*, 46–55.
- Weber, G.F., Ashkar, S., Glimcher, M.J., and Cantor, H. (1996). Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). *Science* *271*, 509–512.

- Weintraub, A.S., Lin, X., Itskovich, V.V., Aguinaldo, J.G.S., Chaplin, W.F., Denhardt, D.T., and Fayad, Z.A. (2004). Prenatal detection of embryo resorption in osteopontin-deficient mice using serial noninvasive magnetic resonance microscopy. *Pediatr. Res.* *55*, 419–424.
- Werner, A., and Kinne, R.K. (2001). Evolution of the Na-P(i) cotransport systems. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* *280*, R301–312.
- White, F.J., Ross, J.W., Joyce, M.M., Geisert, R.D., Burghardt, R.C., and Johnson, G.A. (2005). Steroid regulation of cell specific secreted phosphoprotein 1 (osteopontin) expression in the pregnant porcine uterus. *Biol. Reprod.* *73*, 1294–1301.
- Witty, J.P., Foster, S.A., Stricklin, G.P., Matrisian, L.M., and Stern, P.H. (1996). Parathyroid hormone-induced resorption in fetal rat limb bones is associated with production of the metalloproteinases collagenase and gelatinase B. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* *11*, 72–78.
- Xu, L., Anderson, A.L., Lu, Q., and Wang, J. (2007). Role of fibrillar structure of collagenous carrier in bone sialoprotein-mediated matrix mineralization and osteoblast differentiation. *Biomaterials* *28*, 750–761.
- Yakar, S., Rosen, C.J., Beamer, W.G., Ackert-Bicknell, C.L., Wu, Y., Liu, J.-L., Ooi, G.T., Setser, J., Frystyk, J., Boisclair, Y.R., et al. (2002). Circulating levels of IGF-1 directly regulate bone growth and density. *J. Clin. Invest.* *110*, 771–781.
- Yamakoshi, Y., Hu, J.C.-C., Fukae, M., Zhang, H., and Simmer, J.P. (2005). Dentin glycoprotein: the protein in the middle of the dentin sialophosphoprotein chimera. *J. Biol. Chem.* *280*, 17472–17479.
- Yang, Y. (2009). Growth and patterning in the limb: signaling gradients make the decision. *Sci. Signal.* *2*, pe3.
- Ye, L., Mishina, Y., Chen, D., Huang, H., Dallas, S.L., Dallas, M.R., Sivakumar, P., Kunieda, T., Tsutsui, T.W., Boskey, A., et al. (2005). *Dmp1*-deficient mice display severe defects in cartilage formation responsible for a chondrodysplasia-like phenotype. *J. Biol. Chem.* *280*, 6197–6203.
- Yoshitake, H., Rittling, S.R., Denhardt, D.T., and Noda, M. (1999). Osteopontin-deficient mice are resistant to ovariectomy-induced bone resorption. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 8156–8160.
- Young, M.F., Kerr, J.M., Ibaraki, K., Heegaard, A.M., and Robey, P.G. (1992). Structure, expression, and regulation of the major noncollagenous matrix proteins of bone. *Clin. Orthop.* 275–294.
- Yue, T.L., McKenna, P.J., Ohlstein, E.H., Farach-Carson, M.C., Butler, W.T., Johanson, K., McDevitt, P., Feuerstein, G.Z., and Stadel, J.M. (1994). Osteopontin-stimulated vascular smooth muscle cell migration is mediated by beta 3 integrin. *Exp. Cell Res.* *214*, 459–464.
- Zeeb, M., Strilic, B., and Lammert, E. (2010). Resolving cell-cell junctions: lumen formation in blood vessels. *Curr. Opin. Cell Biol.* *22*, 626–632.

- Zelzer, E., and Olsen, B.R. (2003). The genetic basis for skeletal diseases. *Nature* 423, 343–348.
- Zhang, J., Niu, C., Ye, L., Huang, H., He, X., Tong, W.-G., Ross, J., Haug, J., Johnson, T., Feng, J.Q., et al. (2003). Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 425, 836–841.
- Zhou, L., Matsumura, H., Mezawa, M., Takai, H., Nakayama, Y., Mitarai, M., and Ogata, Y. (2013). Protamine stimulates bone sialoprotein gene expression. *Gene* 516, 228–237.
- Zhu, X., Luo, C., Ferrier, J.M., and Sodek, J. (1997). Evidence of ectokinase-mediated phosphorylation of osteopontin and bone sialoprotein by osteoblasts during bone formation in vitro. *Biochem. J.* 323 (Pt 3), 637–643.
- Zhu, X.L., Ganss, B., Goldberg, H.A., and Sodek, J. (2001). Synthesis and processing of bone sialoproteins during de novo bone formation in vitro. *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.* 79, 737–746.
- Zohar, R., Cheifetz, S., McCulloch, C.A., and Sodek, J. (1998). Analysis of intracellular osteopontin as a marker of osteoblastic cell differentiation and mesenchymal cell migration. *Eur. J. Oral Sci.* 106 Suppl 1, 401–407.

# **Annexe 1: Publications et communications personnelles**

# PRODUCTION PERSONNELLE

## Articles:

**Bouleftour W**, Boudiffa M, Wade-Gueye MN, Bouët G, Cardelli M, Laroche N, Vanden-Bossche A, Thomas M, Bonnelye E, Aubin J E, Vico L, Lafage-Proust MH, Malaval L. Skeletal development of mice lacking bone sialoprotein (BSP) - Impairment of long bone growth and progressive establishment of high trabecular bone mass (Soumis à PlosONE)

**Bouleftour W**, Bouët G, Granito R N, Thomas M, Linossier MT, Vanden Bossche A, Aubin JE, Lafage-Proust MH, Vico L, Malaval L. Extinction of both bone sialoprotein (BSP) and osteopontin (OPN) expression in mouse calvaria bone impairs the anabolic action of PTH. (En préparation)

Bouët G., **Bouleftour W.**, Thomas M., Vanden Bossche A., Aubin JE., Vico L., Marchat D., Malaval L. The impairment of osteogenesis in BSP knockout bone cell cultures is cell density dependent. (En préparation)

Granito RN, Sabido O, Lescale C, **Bouleftour W**, Aubin JE, Goodhardt M, Vico L, Malaval L. Bone sialoprotein regulates hematopoietic stem cell pool size and fate. (En révision)

## Communications orales:

**2013 : Bouleftour W**, Granito RN, Vanden Bossche A, Roche B, Sabido O, Thomas M, Linossier MT, Vico L, Lafage-Proust MH, Malaval L

La revascularisation du conduit osseux après ablation médullaire est dramatiquement accélérée chez les souris BSP<sup>-/-</sup>, et s'accompagne d'une recolonisation hématopoïétique plus rapide. 15<sup>ièmes</sup> JFBTM "Journées Françaises de la Biologie des tissus Minéralisés", 30 mai - 01 juin, Poitiers

**2012 : Bouleftour W**, Granito RN, Bouët G, Vico L, Lafage-Proust MH, Malaval L

La PTH stimule l'ostéogenèse par les cellules de calvaria de souris in vivo et in vitro, Même en l'absence de sialoprotéine osseuse (BSP). 14<sup>ièmes</sup> JFBTM, 29-31 mai, Bordeaux

**2012 : Granito RN, Bouleftour W**, Vanden-Bossche A, Sabido O, Vico L, Malaval L

L'ablation médullaire fémorale de souris n'exprimant pas la sialoprotéine osseuse (BSP<sup>-/-</sup>) Entraîne une recolonisation hématopoïétique accélérée, Avec un degré plus élevé de vascularisation. 25<sup>e</sup> Congrès Français de Rhumatologie, 9-12 décembre, Paris

### Communications affichées:

**2013 : Bouleftour W**, Granito RN, Vanden Bossche A, Sabido O, Roche B, Thomas M, Linossier MT, Aubin J, Lafage-Proust MH, Vico L, Malaval L

Bone shaft revascularization after marrow ablation is dramatically accelerated in BSP<sup>-/-</sup> mice, along with faster hematopoietic recolonization. American Society for Bone and Mineral Research Meeting, 04/10 au 07/10 à Baltimore, MD, USA (**“oral poster”, Award Travel Grant**)

**2013 : Bouleftour W**, Bouet G, Granito RN, Thomas M, Linossier MT, Vanden Bossche A, Aubin J, Lafage- Proust MH, Vico L, Malaval L

Expression of both bone sialoprotein and osteopontin is necessary to the anabolic action of PTH on calvaria bone mouse. American Society for Bone and Mineral Research Meeting, 04/10 au 07/10 à Baltimore, MD, USA

**2013 : Bouleftour W**, Granito RN, Vanden Bossche A, Roche B, Sabido O, Vico L, Lafage-Proust MH, Malaval L

La revascularisation du conduit osseux après ablation médullaire est dramatiquement accélérée chez les souris BSP<sup>-/-</sup>, et s'accompagne d'une recolonisation hématopoïétique plus rapide. Journée de la recherche 17 juin 2013 à Saint Etienne (**3eme prix aequo**)

**2012 : Bouleftour W**, Granito RN, Bouët G, Vico L, Lafage-Proust MH, Malaval L

La parathormone stimule l'ostéogenèse par les cellules de calvaria de souris in vivo et in vitro, même en l'absence de sialoprotéine osseuse (BSP). IFRESIS (Institut Fédératif de Recherche en Sciences et Ingénierie de la Santé), le 15 novembre 2012, à Saint-Etienne,

**2012 : Bouleftour W**, Granito RN, Bouët G, Vico L, Lafage-Proust MH, Malaval L

La parathormone stimule l'ostéogenèse par les cellules de calvaria de souris in vivo et in vitro, même en l'absence de sialoprotéine osseuse (BSP). Journée de la recherche 14 juin 2012 à Saint Etienne (**3 eme prix aequo**)

# Annexe 2: Curriculum Vitae

## Wafa ESQUIS

49 Bis rue Désiré Claude  
42100 Saint-Étienne

☎ + (33) 6 64 04 31 11

@ [bouleftourwafa@yahoo.fr](mailto:bouleftourwafa@yahoo.fr)

33 ans, mariée

### Permis B

Adresse professionnelle :

15 rue Ambroise paré

42023 St Etienne cedex02



### Doctorante en science de la vie Master Recherche en Physiologie Intégrée en Conditions Extrêmes Docteur Vétérinaire

#### Expériences professionnelles

Depuis 2010	<p><b>Recherche</b> : Chef de projet scientifique "rôle de la sialoprotéine osseuse dans l'ostéogenèse et son couplage avec l'angiogenèse" <b>INSERMU1059</b></p> <p><b>Enseignement</b> : Université Jean Monnet, Faculté de Médecine, Saint Etienne : biologie du développement animal ; biologie cellulaire, histologie, bioinformatique, analyse d'articles scientifiques</p> <p><b>Publications</b> : Congrès : communications orales, , posters ; 1 article en révision</p> <p><b>Compétences</b> : <b>Culture cellules primaires, extraction ARN, transfection siARN</b>  <b>Q-RTPCR, génotypage, Western blot, Dotblot, ELISA, dosages enzymatiques</b>  <b>Gestion d'élevage de souris GM, expérimentation animale</b>  <b>Dissection, histologie, cryotomie, immunohistochimie (tissu osseux)</b>  <b>Histomorphométrie, microtomographie</b>  <b>Maitrise de Word, Excel, Power-Point, Instat, Statistica, Bibliographie Zotero</b></p>
2009-2010	<p><b>Recherche</b> : "Impact de l'inflammation sur l'induction ostéogénique des Cellules souches mésenchymateuses" <b>Unité immunogénomique EA 4130 Lyon</b></p> <p><b>Compétences</b> : <b>Culture de cellules souches mésenchymateuses humaines, Immunofluorescence, cytométrie en flux</b></p>
2008-2009	<p><b>Recherche</b> : "Influence du strontium sur les ostéoclastes humains" <b>INSERM U1033, Lyon</b></p> <p><b>Compétences</b> : <b>Isolement et culture des ostéoclastes à partir de sang humain, microscopie confocale, histologie</b></p>
2003-2008	<p>Cadre supérieur (CDI) en qualité de docteur vétérinaire au sein de l'ORAVIE (<b>Oued-zenati, ALGERIE</b>)</p> <p><b>Compétences</b> : <b>Gestion du personnel (plus de 20 personnes)</b>  <b>Diagnostic des pathologies aviaires, vaccinations</b>  <b>Stage à Merial, Lyon : "Fabrication des vaccins aviaires" (2007)</b>  <b>Protocole de désinfection et schéma du vide sanitaire</b></p>

Protocole de désinfection et schéma du vide sanitaire

2001-2003  
2001 Stage de fin d'études au Laboratoire Régional Vétérinaire de Constantine (ALGERIE)  
Diplôme de Docteur Vétérinaire (Institut des sciences vétérinaires Constantine.  
(ALGERIE)

## Formations

Depuis 2010 Doctorante en Sciences de la Vie, option Biologie Moléculaire et Cellulaire (3<sup>ème</sup> année), INSERM U1059, Saint-Etienne

2011 Diplôme interuniversitaire de Bioexperimentation Animale, Niveau 1

2009-2010 Master 2 en physiologie intégrée des conditions extrêmes, Lyon 1 (Mention A/B)

2008-2009 Master I en physiologie et neurosciences, Lyon 1

1996-2001 Diplôme de docteur vétérinaire (Institut des sciences vétérinaires Constantine.  
(ALGERIE)

## Informations Complémentaires

Arabe (langue maternelle), Français (expert), Anglais (bon)  
Espagnol, Portugais, Russe (bases)

2011 Premiers secours en équipe de niveau 1

2010 Habilitation à utiliser un autoclave

1997 Diplôme d'agent de saisie en informatique

## Centres d'intérêt

Vie associative :

2012/2013 Trésorière de l'Association Stéphanoise des Jeunes Chercheurs

2010/2012 Membre du conseil d'administration de l'Association Stéphanoise des Jeunes Chercheurs

2011 Membre du comité d'organisation du Forum International Biovision (Programme Biovision next)

Loisirs :  
Salsa, chorale, cinéma, voyages, géographie

## Références

**Dr Laurence Vico**  
Unité INSERM 1059  
Faculté de Médecine  
Saint-Etienne  
@ [vico@univ-st-etienne.fr](mailto:vico@univ-st-etienne.fr)  
☎ (33/0)4 77 42 18 57

**Dr Luc Malaval**  
Unité INSERM 1059  
Faculté de Médecine  
Saint-Etienne  
@ [luc.malaval@univ-st-etienne.fr](mailto:luc.malaval@univ-st-etienne.fr)  
☎ (33/0)4 77 42 14 44

**Dr Georges Boivin**  
Unité INSERM 1033  
Faculté de Médecine Laennec  
Lyon  
@ [georges.boivin@univ-lyon1.fr](mailto:georges.boivin@univ-lyon1.fr)  
☎ (33/0)4.78.77.86.72

## **Annexe 3:Manuscrit de**

**l'article:**"Skeletal development of mice

lacking bone sialoprotein (BSP) - Impairment of  
long bone growth and progressive establishment  
of high trabecular bone mass" (soumis à PlosOne)

**Skeletal development of mice lacking bone sialoprotein (BSP) -  
Impairment of long bone growth and progressive establishment of high  
trabecular bone mass**

Wafa Bouleftour<sup>1\*</sup>, Maya Boudiffa<sup>1\*</sup>, Ndeye Marième Wade-Gueye<sup>1</sup>, Guéneaëlle Bouët<sup>1</sup>, Marco Cardelli<sup>2</sup>, Norbert Laroche<sup>1</sup>, Arnaud Vanden-Bossche<sup>1</sup>, Mireille Thomas<sup>1</sup>, Edith Bonnelye<sup>3</sup>, Jane E Aubin<sup>2</sup>, Laurence Vico<sup>1</sup>, Marie Hélène Lafage-Proust<sup>1</sup>, Luc Malaval<sup>1</sup>

1 : LBTO-INSERM U1059, Université de Lyon, F42023, Saint-Etienne, France.

2: Dept. of Molecular Genetics, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada.

3: INSERM U1033, Université de Lyon, Université Claude Bernard, F69372, Lyon, France

\*: These two authors contributed equally to the work

Corresponding author:

Dr. Luc MALAVAL

INSERM U1059

Université Jean Monnet Faculté de Médecine

15. rue A. Paré 42023 St Etienne Cedex 02 France

Phone : 33-4-77-42-14-44 T

Telefax : 33-4 -77-57-55-72

E-mail : luc.malaval@univ-st-etienne.fr

Key words: BSP, SIBLING proteins, Development, Growth, Mineralization

**Abstract**

Adult mice with a knockout of the *Ibsp* gene (BSP<sup>-/-</sup>) present with a shorter stature, as well as lower bone turnover and higher trabecular bone mass than wild type, the latter resulting from impaired bone resorption. Unexpectedly, BSP knockout also affects the reproductive behavior of female mice, which do not construct a proper "nest" for their offsprings. Multiple crossing experiments nonetheless indicated that the shorter stature and lower weight of BSP<sup>-/-</sup> mice, since birth and throughout life, as well as their shorter femur and tibia bones are independent of the genotype of the mothers, and thus reflect genetic inheritance. In BSP<sup>-/-</sup> newborns,  $\mu$ CT analysis revealed a delay in membranous primary ossification, with wider cranial sutures, as well as thinner femoral cortical bone and lower tissue mineral density. However, trabecular bone volume and osteoclast parameters of long bones do not differ between genotypes. As early as 3 weeks after birth, osteoclast number and surface drop in the mutants, concomitant with trabecular bone accumulation. The growth plates present a thinner hypertrophic zone in newborns, while at 3 weeks the proliferating zone is thinner and the hypertrophic zone thicker in BSP<sup>-/-</sup> than in BSP<sup>+/+</sup> mice of either sex, maybe reflecting a combination of lower chondrocyte proliferation and impaired cartilage resorption. Interestingly, young (6 days old) BSP<sup>-/-</sup> mice display a higher osteopontin levels than wild type, which is maintained late in adult life. In conclusion, lack of BSP alters long bone growth, as well as membranous/cortical primary bone formation and mineralization. Endochondral development is however normal in mutant mice and the accumulation of trabecular bone observed in adults develops progressively in the weeks following birth. The higher levels of circulating osteopontin may be a compensatory mechanism which would allow normal endochondral development in BSP<sup>-/-</sup> mice, while impairing primary mineralization.

## Introduction

Members of the SIBLING (Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoprotein) family [1] are known to play key biological roles in the development, turnover and mineralization of bone and dentin. Among this family, bone sialoprotein (BSP, IBSP, [2]) as well as osteopontin (OPN, SPP1, [3]) are strongly expressed by osteoblasts, osteoclasts and hypertrophic chondrocytes. Incipient expression of BSP, which is particularly abundant in sites of primary bone formation [4][5] coincides with the initial formation of membranous and endochondral bone, maximal level being reached during the formation of embryonic bone [5]. We previously showed that adult mice (16 week old) with a knockout of the *Ibsp* gene (BSP<sup>-/-</sup>) are shorter than their wild type counterparts and display a low level of bone remodeling, with both bone formation and mineralization severely impaired *in vivo* and in *in vitro* models [6]. We also showed that BSP<sup>-/-</sup> mice display lower osteoclast numbers and surfaces *in vivo* [6], and that osteoclast recruitment and activity *in vitro* were impaired in the absence of BSP [7]. Interestingly, and despite their low level of bone remodeling, adult BSP<sup>-/-</sup> mice present a higher trabecular bone mass than the BSP<sup>+/+</sup> [6], which raises questions about the development of the BSP<sup>-/-</sup> adult phenotype.

In this study, we monitored the skeletal development of BSP<sup>-/-</sup> and BSP<sup>+/+</sup> mice, asking when and how the short size and high trabecular bone of the adult were set up. BSP<sup>-/-</sup> mothers display an abnormal pup care behavior, which does not impair the growth of wild type and heterozygous mice, showing that the skeletal phenotype of BSP<sup>-/-</sup> mice is gene-based. We show that BSP<sup>-/-</sup> mice are born with their shorter stature and that the lack of BSP alters long bone growth, membranous/cortical primary bone formation and mineralization, as well as OPN circulating levels. However, the endochondral development is normal in mutant mice and the accumulation of trabecular bone observed in the adults develops progressively in the weeks following birth.

## Material and methods

### ***Production of BSP<sup>-/-</sup> mice:***

BSP Knock-out mice were generated as described in [6]. Briefly, exons II-III of the mouse Bsp gene were replaced by a PGKneo cassette that created a null allele in mouse embryonic stem (ES) cells (R1 passage 8; kindly provided by Dr. Andras Nägy [8]). After selection, positive clones were used to generate chimeric mice which were crossed to albino CD1 outbred females, and a chimeric male with germline transmission of the mutation was used to establish offspring on a 129/CD1 background. BSP<sup>-/-</sup> mice are viable and fertile; their phenotype has been extensively described elsewhere [6].

### ***Animal reproduction and genotyping:***

Wild type and mutant mice were kept as separate lines, except for cross-foster experiments. They were housed under controlled conditions at 23±2°C on a 12-h light/12-h dark cycle, fed with A03 food preparation (SAFE, Avry, France) and given tap water with free access. Whenever required, the offsprings genotyping was performed by PCR (Qiagen) on genomic DNA Tail isolated with Direct PCR Lysis Reagent (Viagen, Biotech Inc., Los Angeles, Ca, USA) plus proteinase K (Euromedex, France). The PCR reaction was performed with the following primers: BSP-forward=AGGACTAGGGGTCAAACAC, BSP-reverse =AGTAGCGTGGCCGGTACTTA, and Neomycin (RLP 290) =TCGCCTTCTTGACGAGTTCTGAG, in the appropriate PCR conditions. Results were analyzed by running the samples in a 2% agarose (Sigma) gel electrophoresis. Expected bands were at 481bp for BSP<sup>+/+</sup>, 550bp for BSP<sup>-/-</sup> and both for BSP<sup>+/-</sup> samples.

### ***Sampling procedures:***

Newborn mice were killed by hypothermia, and fixed in 100% EtOH for 24h. Three, 10 and 16 week old mice were killed by cervical dislocation and the femurs and tibiae dissected out and fixed in 3.7% paraformaldehyde in PBS. Six day and 12 month old animals were killed by decapitation

for serum collection and storage at  $-80^{\circ}\text{C}$ . For 6 days old mice, blood was collected from 5-6 individuals and pooled in the same tube; N in the results thus refers to the number of blood pools assayed. The procedures for the care and killing of the animals were in accordance with the European Community Standards on the care and use of laboratory animals (Ministère de l'Agriculture, France, Authorization 04827). All animal experiments were approved by the "Comité du Bien Etre Animal" of the medical faculty experimentation platform (PLEXAN, Université Jean Monnet, Saint-Etienne, France).

***Morphological and morphometric assessment:***

Fixed newborn mice were dissected, skinned, eviscerated and dehydrated in 100% acetone for 24h. The samples were then processed for whole mount skeletal preparation according to established methods [9]. Alcian blue was used to stain cartilage and Alizarin red was used to stain calcified tissues.

To check whether the altered behavior of BSP<sup>-/-</sup> mothers had impact on their bone phenotype, multiple crossing experiments were performed. We first crossed BSP<sup>+/+</sup> with BSP<sup>-/-</sup> mice to generate heterozygous progeny. Then, female BSP<sup>-/-</sup> mice were crossed with heterozygous BSP<sup>+/-</sup> male mice, giving a mixed progeny of BSP<sup>-/-</sup> and BSP<sup>+/-</sup> pups. Finally, we crossed all heterozygous mice to obtain a Mendelian mix of BSP<sup>+/+</sup>, <sup>-/-</sup> and <sup>+/-</sup> progeny. In all configurations, we compared length and weight growth curves between 8 and 35 days, as well as femur length at 40 days in pups of different genotypes raised by BSP<sup>+/+</sup>, <sup>+/-</sup> or <sup>-/-</sup> mothers. To do this, mice were tagged for identification at day 7 after birth, and then weighted every other day with a 0.1g precision scale. Their length was measured (nose to tail insertion) with an electronic digital caliper. At day 40, mice of all genotypes were killed and the femurs and tibias collected (see above) were measured with a caliper. In all cases, we took care to compare mice from litters of similar sizes.

***Tridimensional microtomography ( $\mu$ CT):***

Newborn whole skeletons and femurs from 3, 10 and 16 week old BSP+/+ and BSP-/- mice were scanned with a high resolution  $\mu$ CT (Viva CT40, Scanco Medical, Bassersdorf, Switzerland). Newborn mice, were scanned at 45keV with a 10 $\mu$ m cubic resolution. For isolated femurs, the secondary spongiosa of trabecular bone was scanned within the metaphysis below the growth plate and the cortical bone was scanned in the diaphysis, at 55keV with a 10 $\mu$ m cubic resolution. Three-dimensional reconstructions were generated using the following parameters for newborn whole skeletons : Sigma, 1.2; Support, 2; Threshold, 225. Parameters were ; Sigma, 1.2; Support, 2; Threshold, 276 for trabecular bone and Sigma, 1.2; Support, 2; Threshold, 280 for cortical bone of 3 week old femurs, and Sigma, 1.2; Support, 2; Threshold, 245 for trabecular bone and Sigma, 1.2; Support, 2; Threshold, 280 for cortical bone of 10 and 16 weeks femurs. The structural parameters of trabecular bone, bone volume (BV/TV), trabecular thickness (Tb.Th), trabecular number (Tb.N), trabecular separation (Tb.Sp), and structure model index (SMI) were generated from a set of 80 sections, without assuming a constant model, as previously described [10]. Cortical area and thickness (Ct.Th) were calculated by integration of the value on each transverse section of a set of 30 chosen in the midshaft area.

***Bone histology and histomorphometry:***

Excised and fixed femurs and the lower half of fetuses were dehydrated in acetone and embedded in methylmethacrylate. Longitudinal slices were performed with a Jung model K microtome (Carl Zeiss, Heidelberg, Germany) and used for modified Goldner staining, tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining of osteoclasts and Von Kossa staining of calcified tissues. Trabecular bone volume (BV/TV), osteoid surface (OS/BS), growth plate thickness and hypertrophic zone thickness were measured on Goldner stained sections. Osteoclast number (Oc.N/BS) and osteoclast surface (Oc.S/B.Ar) were measured on TRAP stained sections. ROI for bone parameters were

evaluated in the secondary spongiosa of trabecular bone within the metaphysis below the growth plate as shown in Fig. 6.

***ELISA assays:***

Serum samples were assayed with a commercial ELISA kit for OPN (DuoSet mouse Osteopontin, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) used according to the manufacturer's instructions. Serum was obtained as described in sampling procedures. Each sample was run in duplicate in the assay.

***Statistical Analysis:***

All results are presented as mean  $\pm$  SEM. Data were submitted to Kruskal and Wallis with post-test (Figure 3E) or Mann-Whitney U tests, performed with the INSTAT software (version 3.00 for Windows 95, GraphPad Software, San Diego, CA).

## Results

### ***Developmental effects of the BSP gene knockout:***

BSP<sup>-/-</sup> mice were significantly smaller than BSP<sup>+/+</sup>, since birth (Fig. 1A) and up to senescence as shown by weight curves (Fig. 1B) and as previously reported from long bone measurements [6].

### ***Delayed skeletal mineralization in mice lacking BSP:***

General aspect or whole mount skeletal preparations of newborn BSP<sup>+/+</sup> and BSP<sup>-/-</sup> mice revealed no differences in morphology nor endochondral ossification stage (Fig. 2A), nor did histological observations indicate any delay in the appearance of ossification centers (not shown). However, the skeletal elements of newborn BSP<sup>-/-</sup> mice were undermineralized respective to BSP<sup>+/+</sup>, as showed in 3D  $\mu$ CT reconstructions by missing finger bones (Fig.2B) porous skull elements and widened sutures (Fig. 2C).

### ***The altered reproductive behavior of BSP<sup>-/-</sup> mothers does not bear on the expression of the mutant phenotype:***

Observation of weaning wild type and mutant mice revealed that mothers lacking BSP display an aberrant behavior. Pieces of soft paper were put in the cages 5 days before birth to provide the mothers with proper material for nest construction [11]. While BSP<sup>+/+</sup> mice built nests for their offsprings by carefully dilacerating the paper material, BSP<sup>-/-</sup> mothers did not tear the paper apart and hardly gathered the fragments around their pups (Fig. 3A). Although this was not quantified, BSP<sup>-/-</sup> mothers also spent more time wandering in the cages and less time in contact with the pups than the BSP<sup>+/+</sup>.

Concerned that altered care for the offsprings might be a confounding factor, we analysed the effect of the genotype of mothers on the development of the BSP<sup>-/-</sup> phenotype in the pups and designed cross-fostering experiments. First, we crossed mutant and wild type mice and assessed the growth curve of heterozygous offsprings. As shown in Figure 3B, the mother's genotype did not affect the

rate of weight or length accrual during the weaning period. Also, femur and tibia length of 40 days old BSP<sup>+/-</sup> mice did not differ whether they were raised by <sup>+/+</sup> or <sup>-/-</sup> mothers (Fig. 3C). Second, we crossed BSP<sup>-/-</sup> females with <sup>+/-</sup> males and measured femur and tibia length at day 40; as expected and published before [6], we found that the long bones of <sup>-/-</sup> offsprings were shorter than those of <sup>+/-</sup> siblings of the same <sup>-/-</sup> mother (Fig. 3D). Conversely, the crossing of <sup>+/-</sup> mice gave a mendelian ratio (not shown) of <sup>+/+</sup>, <sup>-/-</sup> and <sup>+/-</sup> offsprings, with significantly lower body weight and femur length only in the BSP<sup>-/-</sup> (Fig. 3E), reflecting the effect of the mutation and its recessive character, as previously described [6]. Therefore, no mother effect was observed for the skeletal impact of the absence of BSP, which appears to be strictly gene based.

***BSP<sup>-/-</sup> mice display altered growth plate parameters:***

In newborn BSP<sup>-/-</sup> mice, growth plate thickness was significantly lower than in BSP<sup>+/+</sup>, and the hypertrophic zone was thinner (Fig. 4). At 3 weeks of age, growth plate thickness was similar in both genotypes, but with a thicker hypertrophic zone and a thinner proliferating zone in both sexes. No difference was observed between the two genotypes in the growth plates of 10 week old femurs, nor at 16 weeks when growth activity was residual and the plates were starting to mineralize (Fig. 4).

***Newborn BSP<sup>-/-</sup> mice display thinner, hypomineralized cortical bone:***

Microtomographic analysis of femurs in newborn BSP<sup>+/+</sup> and BSP<sup>-/-</sup> mice showed that mutant bones had a lower global bone volume, explained by a thinner cortical envelope (see also pictures in Fig. 5C) as well as a lower tissue mineral density (Fig. 5A), as previously reported [6]. In contrast, histomorphometric analysis of femoral trabecular bone showed no difference in BV/TV between mutant and wild type (Fig. 5B, C). Osteoclast parameters, Oc.S/BS and Oc.N/B.Ar did not differ between newborn BSP<sup>-/-</sup> and BSP<sup>+/+</sup> mice (Fig. 5b).

***BSP<sup>-/-</sup> mice have higher serum levels of OPN:***

ELISA assay of OPN in the blood of BSP<sup>+/+</sup> and <sup>-/-</sup> 6 day old mice showed significantly higher values (+64%) in BSP<sup>-/-</sup> than in the BSP<sup>+/+</sup> at 6 days (Fig. 6), and interestingly they were still higher (+48%) in the blood of aged, 12 month old mutant mice whose mineral density is no longer different from the wild type [6].

***Progressive development of the adults BSP<sup>-/-</sup> bone phenotype:***

As early as 3 weeks after birth, and at 10 and 16 weeks of age trabecular BV/TV in the femurs of BSP<sup>-/-</sup> mice was higher than in BSP<sup>+/+</sup>, in both male and female (Fig. 7). This was concomitant with a decrease of osteoclast parameters, both Oc.S/BS and Oc.N/B.Ar in mutant mice of both sexes. Cortical bone of BSP<sup>-/-</sup> mice became transiently thicker at 3 weeks respective to BSP<sup>+/+</sup>, to become thinner at 10 and 16 weeks of age (Fig. 7). Interestingly, OS/BS values were significantly lower in BSP<sup>-/-</sup> mice at 3 and 10 weeks of age, to become higher than in BSP<sup>+/+</sup> at 16 weeks (Fig. 7), as previously published [6].

## Discussion

In this study, we show that mice lacking BSP are smaller than their wild type counterparts since birth and throughout their developmental process. The study of their skeleton did not show any other morphological effect of the mutation. However, the amount of primary mineralized bone is lower in the skull and long bone cortex of BSP<sup>-/-</sup> newborn mice. Moreover, and as previously shown [6], the volumetric bone density in BSP<sup>-/-</sup> newborns is lower than in BSP<sup>+/+</sup>.

Our study was further complicated by the unexpected discovery that weaning female BSP<sup>-/-</sup> mice do not display normal care for their pups. That the lack of BSP, an extracellular matrix protein would affect behavior is both surprising and novel. To the best of our knowledge, the only other case of a behavioral impact of the absence of a SIBLING member is the "circling behavior" and hyper-reactivity to touch of DMP1<sup>-/-</sup> mice [12]. This has been ascribed to the undermineralization of the vestibular bone, which would alter sensory (balance) perception in this line [12]. In a recent analysis of the genetics of nest building in two inbred mouse strains, chromosome 5 -which carries the SIBLING locus in mice- displayed no direct effect QTL, but was found involved in several epistatic effects [13]. Extensive studies, including ethological, will be required to assess the full impact of the BSP<sup>-/-</sup> mutation on mouse behavior and evaluate whether it reflects a direct (e.g. neurological) effect or an indirect, e.g. sensory one as for the DMP1 knockout. Because we kept the mutants as a separate line, and the mother's aberrant behavior might have a thermic and/or trophic impact on the pup's development, we conducted a thorough analysis of the growth of BSP<sup>+/+</sup>, <sup>+/-</sup> and <sup>-/-</sup> mice from mothers of various genotype. Of note, variations in growth kinetics were observed according to the number of pups (not shown) as was expected [14], and we took care to compare genotype effects between litters of similar sizes. The results (Fig. 3) show without doubt that the phenotype of the mutant mice only reflects the absence of the BSP protein, and is thus independent from the mother's genetics.

BSP is expressed in hypertrophic chondrocytes [15], and given its effects on endothelial cells migration on the one hand [16] and hydroxyapatite nucleation on the other hand [17], one could expect an effect of the lack of BSP on the onset of endochondral ossification. Surprisingly, this process does not seem to be affected in BSP<sup>-/-</sup> mice, as no delay appears in the onset of ossification centers, and trabecular BV/TV and osteoclast parameters in newborn femurs are similar between genotypes. This suggests that some compensatory mechanisms may exist to override the absence of BSP. In particular, other SIBLING members, OPN and DMP-1 are expressed by hypertrophic chondrocytes and osteoblasts in the chondro-osseous border, and are thought to play an important role in endochondral bone ossification [18]. Further analyses are needed to determine the exact role of BSP in endochondral ossification and the possible compensatory effects of other SIBLING members.

Nonetheless, newborn BSP<sup>-/-</sup> femurs display thinner growth plates, indicating that the long bone growth kinetics is already altered at that stage, as also witnessed by the slightly smaller size and lighter weight of newborn mutant mice. Bone growth is achieved by proliferation and hypertrophy of chondrocytes, then removal of the cartilage template by osteoclasts and its replacement with woven bone by osteoblasts. The proliferative zone is thinner at 3 weeks in BSP<sup>-/-</sup> than in BSP<sup>+/+</sup> mice, suggesting that chondrocyte proliferation/survival is altered in the mutants presumably through a cross-talk with hypertrophic chondrocytes, the only stage which has been shown to express BSP. The total width of the growth plate is not altered, as the hypertrophic zone is thicker in BSP<sup>-/-</sup> mice. This may result at least in part from the reduced osteoclast numbers and thus activity at this stage in the absence of BSP [7], which could impair the proper resorption of the cartilage template.

We confirmed in this study the lower mineral density of newborn BSP<sup>-/-</sup> bone matrix, extending the observations to developing digits and calvariae (Fig. 2). In this respect, the higher levels of

circulating OPN observed in both growing and mature mice are of great interest. OPN is a major inhibitor of bone mineralization, as appears from the hypermineralised OPN<sup>-/-</sup> mouse bones [19], as well as the rescue of bone hypomineralisation induced by tissue non-specific alkaline phosphatase (*Akp2*) gene knockout when these mice are crossed with the OPN<sup>-/-</sup> [20]. Thus the undermineralised matrix observed in young mice in the absence of BSP might reflect at least in part the action of OPN. Of note, mineralisation levels progressively equalize in aging BSP<sup>+/+</sup> and <sup>-/-</sup> mice [6], which we interpret as a main action of BSP on primary mineralization, in congruence with the higher osteoid surfaces observed in adult long bones (see below). Thus, the permanence of higher OPN levels in aging BSP<sup>-/-</sup> mice (Fig. 6) suggest that its action might not be dominant in this model, or at least not at all stages of skeletal life. Multiple knockouts of SIBLING genes would be helpful to unravel such questions.

Bone growth in rodent is continuous, but its rate decreases with age, along with growth plate activity, which we found to be reduced at 10 weeks of age in the 129/CD1 mice, and nearly arrested at 16 weeks (Fig. 4). As the BSP<sup>-/-</sup> mice grow, an accumulation of trabecular bone is seen as early as 3 weeks after birth, in concert with a reduction of osteoclast numbers and surfaces, suggesting that the increase in trabecular BV/TV after birth results at least in part from defective resorption. Lower OS/BS are observed in 3 week and 10 week old BSP<sup>-/-</sup> mice, likely reflecting lower bone forming activity, as previously shown at the peak of repair bone deposition in cortical defect repair of BSP<sup>-/-</sup> mice [21]. With the reduction of growth rate, the modeling process, in which formation and resorption are uncoupled slows down, and primary woven bone is gradually replaced with lamellar bone, by the process of bone remodeling. While secondary ossification progressively supersedes primary ossification, the overall cellular activity is reduced. As previously shown [6], in the less active, mostly remodeling trabecular bone of 16 week old BSP<sup>-/-</sup> mice, OS/BS values are higher than in wild type, likely reflecting delayed primary mineralization. The thinner cortical

bones observed in mutant mice at 10 and 16 weeks of age reflect lower periosteal and endosteal BFR, as documented elsewhere [22]. The transient thickening of the cortical bone in 3 week old BSP<sup>-/-</sup> mice is intriguing, and may hints at a temporary imbalance of the modeling process during the post-natal crisis period, marked by a drop in osteoclast numbers. Clearly, a closer analysis has to be done of the very early times of BSP<sup>-/-</sup> growth to assess these hypothesis.

In conclusion, we confirmed in this study that BSP plays an important role in long bone growth kinetics, as well as membranous/cortical primary bone formation and mineralization. Endochondral development is however normal in BSP<sup>-/-</sup> mice and the accumulation of trabecular bone observed in the adults develops progressively in the weeks following birth. The effects of the absence of BSP on chondrocyte proliferation, differentiation and activity, the compensatory mechanisms that allow normal endochondral bone development in BSP<sup>-/-</sup> mice as well as the role played by OPN in the absence of BSP still need to be explored.

### ***Aknowledgements***

The authors thank Usha Barghava, Oriane Villard, Marie-Thérèse Linossier and Fiona Louis for excellent technical support.

## Legends of figures

**Figure 1:** Newborn morphology and growth of BSP<sup>+/+</sup> and BSP<sup>-/-</sup> mice. (A) general aspect of BSP<sup>+/+</sup> (+/+) and BSP<sup>-/-</sup> (-/-) newborn mice. (B) Kinetics of weight gain during the growth of BSP<sup>+/+</sup> and BSP<sup>-/-</sup> mice. M, males; F, females. Data are Mean±SEM of N=4 to 31 mice. Note the log scale.

**Figure 2 :** Skeletal development and mineralization of newborn BSP<sup>+/+</sup> and BSP<sup>-/-</sup> mice. (A) Skeletal preparation (alcian blue/alizarin red staining) of BSP<sup>+/+</sup> (+/+) and BSP<sup>-/-</sup> (-/-) E19 mice. (B) 3D  $\mu$ CT reconstruction of whole newborn +/+ and -/- mice, showing undermineralized fingers (arrows and black-bordered detailed pictures), and (C) high magnification of the heads showing the widened sutures (arrows).

**Figure 3:** Impact of the lack of BSP on mother's behaviour. (A) Pictures of BSP<sup>+/+</sup> and BSP<sup>-/-</sup> mothers with pups; note the well formed "nest" in the wild type mouse cage as opposed to the untouched and spread out pieces of soft paper in the mutant mouse cage (arrows). Note: the 129sv/CD1 background is outbred, leading to hair color variability. (B) Body length (left) and weight (right) increase in the 30 first days of growing male and female BSP<sup>+/-</sup> mice from BSP<sup>+/+</sup> (N=7 pups) and BSP<sup>-/-</sup> mothers (N=6 pups). (C) Femur and tibia length of 40 days old BSP<sup>+/-</sup> mice from either BSP<sup>+/+</sup> or BSP<sup>-/-</sup> mothers. (D) Femur and tibia length of 40 days old BSP<sup>+/-</sup> (N=6) and BSP<sup>-/-</sup> mice (N=6) from BSP<sup>-/-</sup> mothers crossed with BSP<sup>+/-</sup> males. (E) Body weight and femur length of 40 days old BSP<sup>+/+</sup> (N=7), BSP<sup>-/-</sup> (N=11) and BSP<sup>+/-</sup> mice (N=22) from BSP<sup>+/-</sup> parents. Data are Mean±SEM. \*: p<0.05 vs +/+ and/or +/-, Mann-Whitney U Test or Kuskall-Wallis with post-test (E).

**Figure 4 :** Growth plate kinetics of newborn, 3 week old, 10 and 16 week old BSP+/+ and BSP-/- mice. Data are Mean±SEM of N=7 to 8 newborn and 4 to 6 adult mice. \*:p<0.05; \*\*:p<0.001 vs +/+. Micrographs of the growth plate in the distal femur of BSP+/+ and BSP-/- newborn and 3, 10 and 16 week old mice.

**Figure 5 :** Morphology and morphometry of the long bones in newborn mice. (A) 3D  $\mu$ CT reconstruction and morphometry of newborn whole femurs from BSP+/+ (+/+) and -/- newborn mice. (B) Histomorphometry of trabecular bone in newborn femurs from +/+ and -/- mice. Data are Mean±SEM of N=4 to 10 mice; \*:p<0.05, \*\*:p<0.01 Vs +/+, Mann-Whitney U Test. (C) Micrographs of Goldner's trichrome and Von Kossa staining of BSP+/+ and BSP-/- newborn femur sagittal sections. Yellow polygon: ROI for histomorphometry of the trabecular bone. Bar = 400 $\mu$ m.

**Figure 6 :** ELISA assay of OPN in the serum of 6 day old (N=5 pools) and 12 month old (N=5) male BSP+/+ and BSP-/- mice. Data are Mean±SEM. \*: p<0.05 vs BSP+/+, Mann-Whitney U Test.

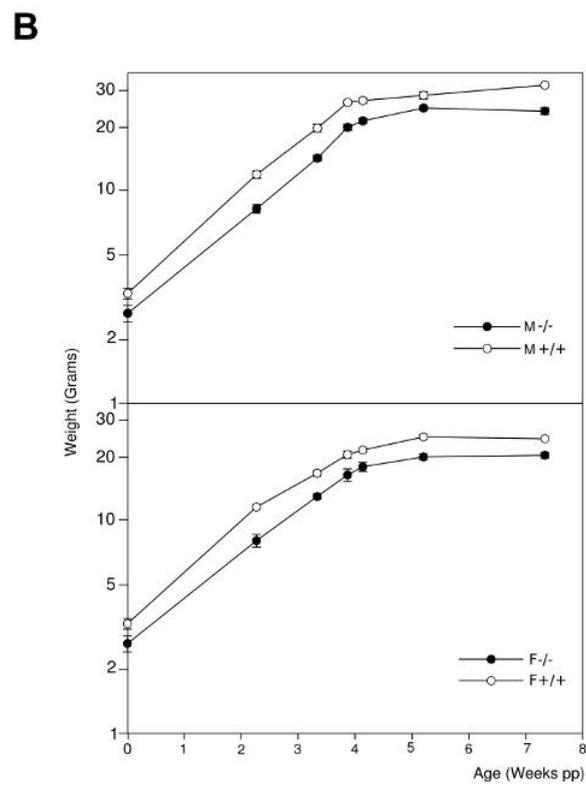
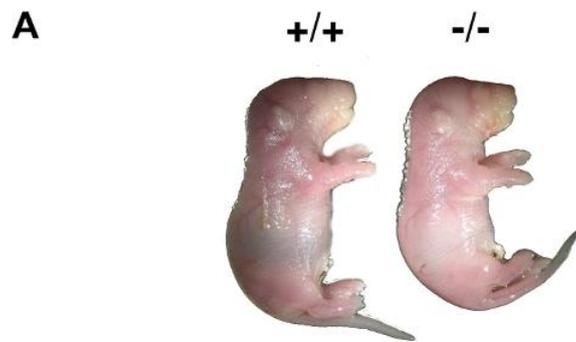
**Figure 7 :** Static histomorphometric parameters and cellular activities in femur bones from 3, 10 and 16 week old BSP+/+ (+/+) and BSP-/- (-/-) mice. Data are Mean±SEM of N=6 to 10 mice. \*:p<0.05, \*\*:p<0.001 vs BSP+/+, Mann-Whitney U Test.

## References

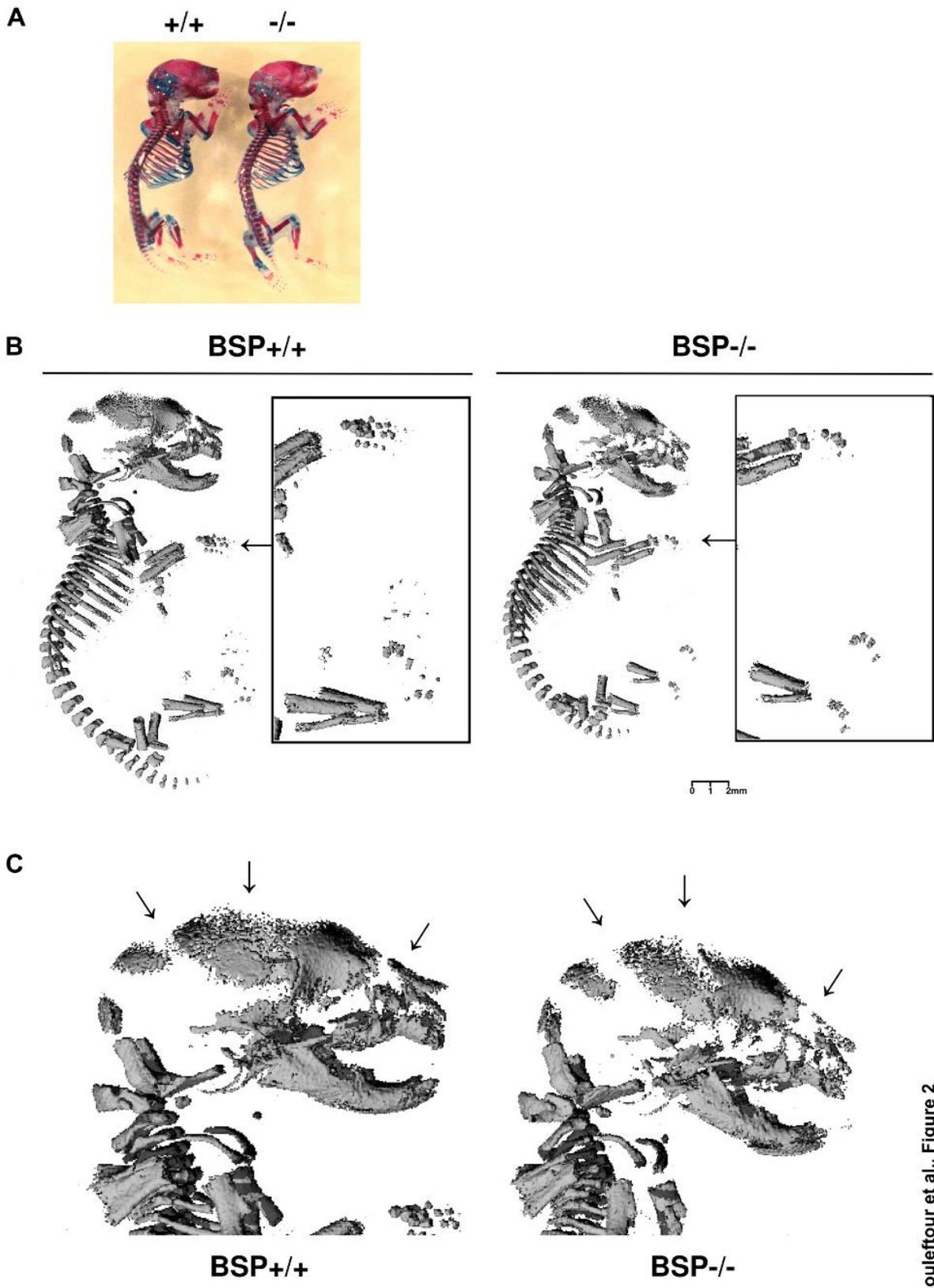
1. Fisher LW, Fedarko NS (2003) Six genes expressed in bones and teeth encode the current members of the SIBLING family of proteins. *Connect Tissue Res* 44 Suppl 1: 33–40.
2. Ganss B, Kim RH, Sodek J (1999) Bone sialoprotein. *Crit Rev Oral Biol Med* 10: 79–98.
3. Sodek J, Ganss B, McKee MD (2000) Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med* 11: 279–303.
4. Gorski JP, Wang A, Lovitch D, Law D, Powell K, et al. (2004) Extracellular bone acidic glycoprotein-75 defines condensed mesenchyme regions to be mineralized and localizes with bone sialoprotein during intramembranous bone formation. *J Biol Chem* 279: 25455–25463.
5. Chen J, Shapiro HS, Sodek J (1992) Developmental expression of bone sialoprotein mRNA in rat mineralized connective tissues. *J Bone Miner Res* 7: 987–997.
6. Malaval L, Wade-Gueye NM, Boudiffa M, Fei J, Zirngibl R, et al. (2008) Bone sialoprotein plays a functional role in bone formation and osteoclastogenesis. *J Exp Med* 205: 1145–1153.
7. Boudiffa M, Wade-Gueye NM, Guignandon A, Vanden-Bossche A, Sabido O, et al. (2010) Bone sialoprotein deficiency impairs osteoclastogenesis and mineral resorption in vitro. *J Bone Min Res* 25: 2393–2403.
8. Nagy A, Rossant J, Nagy R, Abramow-Newerly W, Roder JC (1993) Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 8424–8428.
9. St-Jacques B, Hammerschmidt M, McMahon AP (1999) Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev* 13: 2072–2086. Available: <http://genesdev.cshlp.org/content/13/16/2072.short>. Accessed 22 May 2013.
10. David V, Laroche N, Boudignon B, Lafage-Proust M-H, Alexandre C, et al. (2003) Noninvasive in vivo monitoring of bone architecture alterations in hindlimb-unloaded female rats using novel three-dimensional microcomputed tomography. *J Bone Miner Res* 18: 1622–1631. Available: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1359/jbmr.2003.18.9.1622/full>. Accessed 22 May 2013.
11. Hess SE, Rohr S, Dufour BD, Gaskill BN, Pajor EA, et al. (2008) Home improvement: C57BL/6J mice given more naturalistic nesting materials build better nests. *J Am Assoc Lab Anim Sci JAALAS* 47: 25–31.
12. Lv K, Huang H, Lu Y, Qin C, Li Z, et al. (2010) Circling behavior developed in *Dmp1* null mice is due to bone defects in the vestibular apparatus. *Int J Biol Sci* 6: 537–545.
13. Sauce B, Brito RA de, Peripato AC (2012) Genetic architecture of nest building in mice LG/J × SM/J. *Front Genet Arch* 3: 90. Available: [http://www.frontiersin.org/Genetic\\_Architecture/10.3389/fgene.2012.00090/abstract](http://www.frontiersin.org/Genetic_Architecture/10.3389/fgene.2012.00090/abstract).

Accessed 26 August 2013.

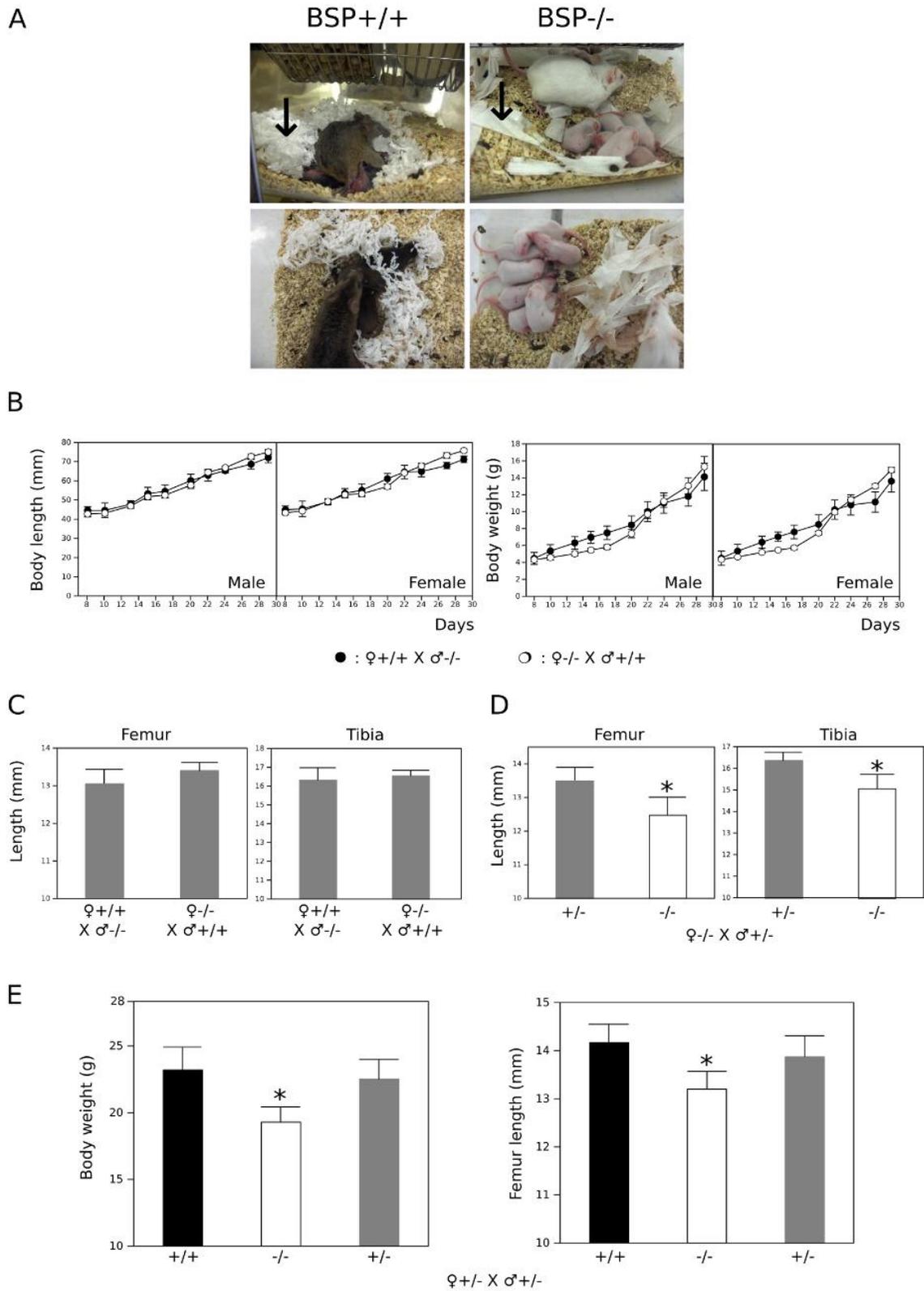
14. Lazic SE, Essioux L (2013) Improving basic and translational science by accounting for litter-to-litter variation in animal models. *BMC Neurosci* 14: 37. doi:10.1186/1471-2202-14-37.
15. Sawae Y, Sahara T, Kawana F, Sasaki T (2002) Effects of enamel matrix derivative on mineralized tissue formation during bone wound healing in rat parietal bone defects. *J Electron Microscop Tokyo* 51: 413–423.
16. Bellahcene A, Bonjean K, Fohr B, Fedarko NS, Robey FA, et al. (2000) Bone sialoprotein mediates human endothelial cell attachment and migration and promotes angiogenesis. *Circ Res* 86: 885–891.
17. Hunter GK, Goldberg HA (1994) Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: role of glutamic acid-rich sequences in the nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Biochem J* 302 ( Pt 1): 175–179.
18. Weizmann S, Tong A, Reich A, Genina O, Yayon A, et al. (2005) FGF upregulates osteopontin in epiphyseal growth plate chondrocytes: implications for endochondral ossification. *Matrix Biol* 24: 520–529. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0945053X05000995>. Accessed 22 May 2013.
19. Boskey AL, Spevak L, Paschalis E, Doty SB, McKee MD (2002) Osteopontin deficiency increases mineral content and mineral crystallinity in mouse bone. *Calcif Tissue Int* 71: 145–154.
20. Harney D, Johnson KA, Zelken J, Camacho NP, Hoylaerts MF, et al. (2006) Elevated skeletal osteopontin levels contribute to the hypophosphatasia phenotype in *Akp2(-/-)* mice. *J Bone Min Res* 21: 1377–1386.
21. Malaval L, Monfoulet L, Fabre T, Pothuaud L, Bareille R, et al. (2009) Absence of bone sialoprotein (BSP) impairs cortical defect repair in mouse long bone. *Bone* 45: 853–861.
22. Wade-Gueye NM, Boudiffa M, Laroche N, Vanden-Bossche A, Fournier C, et al. (2010) Mice lacking bone sialoprotein (BSP) lose bone after ovariectomy and display skeletal site-specific response to intermittent PTH treatment. *Endocrinology* 151: 5103–5113.



Bouleftour et al., Figure 1

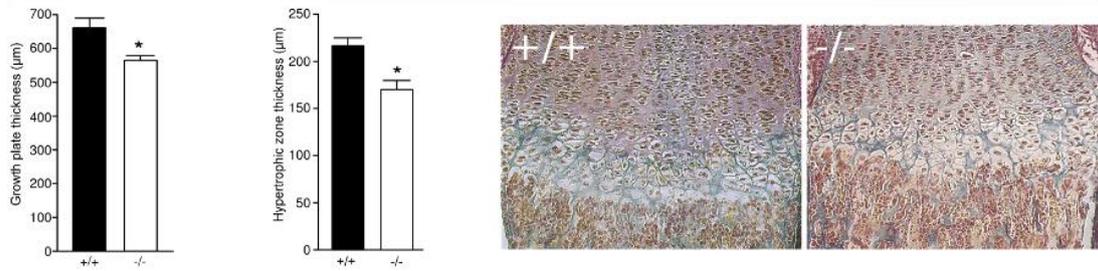


Boulefour et al., Figure 2

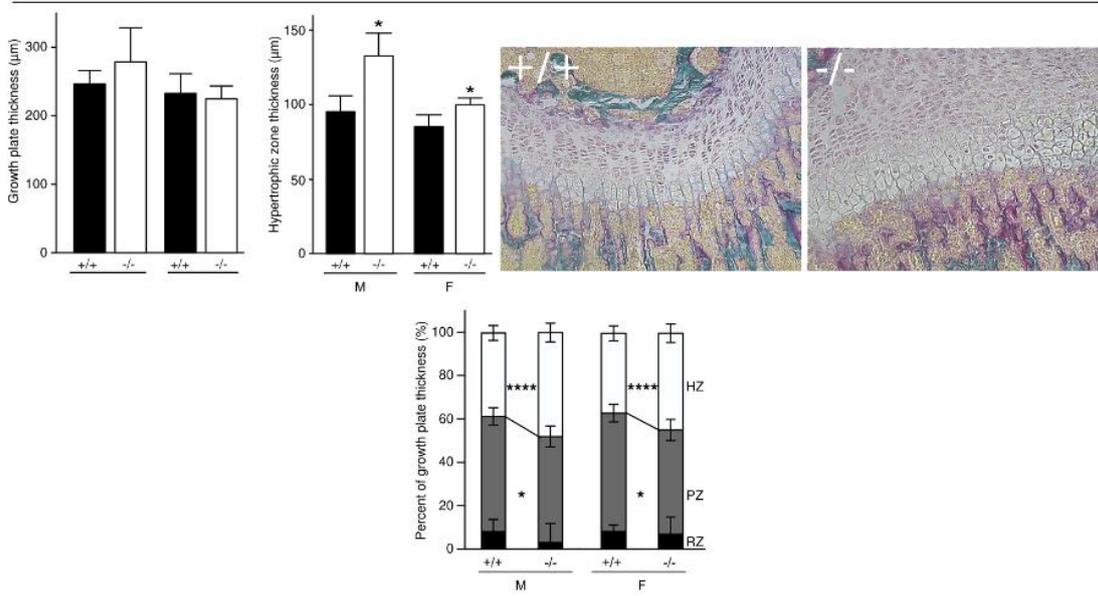


Bouleftour et al., Figure 3

Newborn



3 weeks



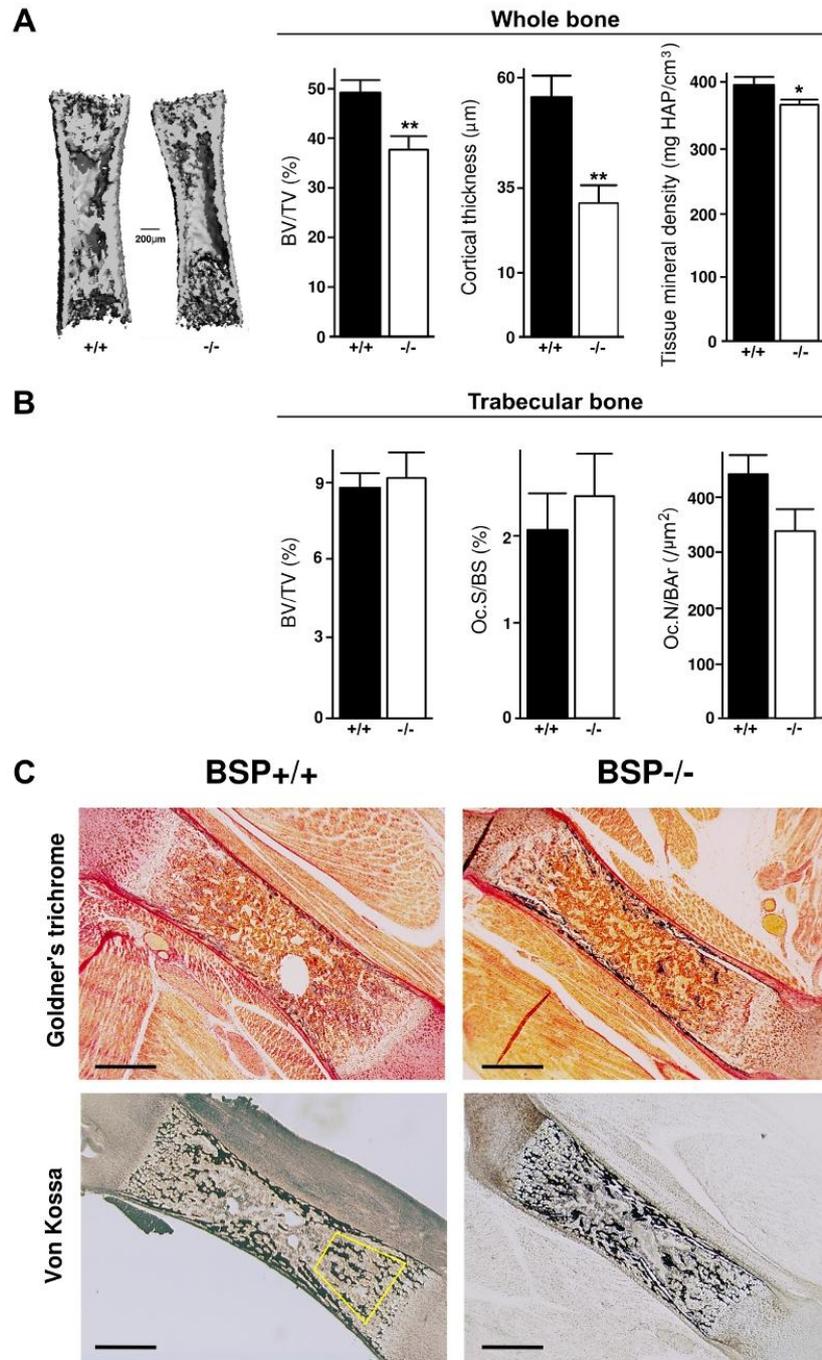
10 weeks



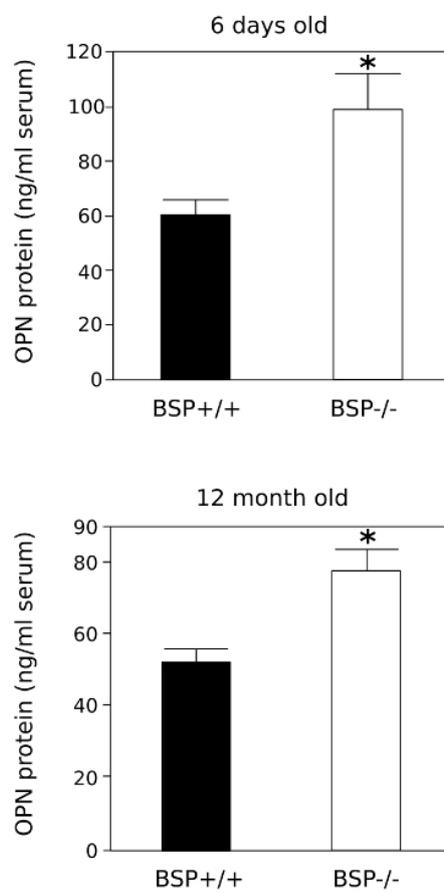
16 weeks



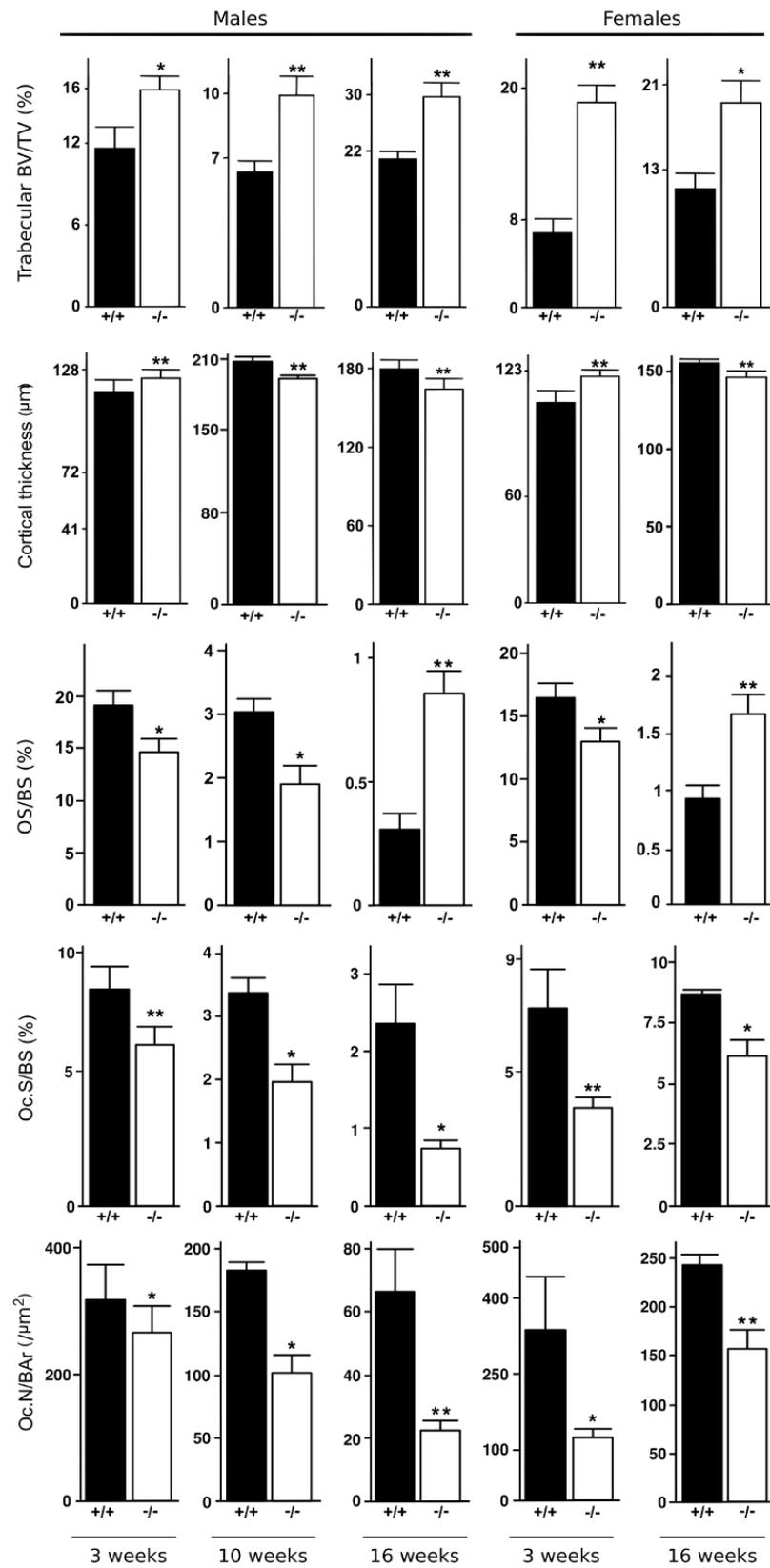
Bouleftour et al., Figure 4



Bouleftour et al., Figure 5



Bouleftour et al., Figure 6



Bouleftour et al., Figure 7

## RESUME

Le bon fonctionnement de l'organe osseux dépend de l'activité intégrée de trois tissus majeurs: le tissu osseux au sens strict, la moelle osseuse et les vaisseaux sanguins. Les facteurs qui coordonnent la mise en place concomitante de l'angiogenèse et de l'ostéogenèse nécessaires à la formation de l'os primaire, c'est-à-dire au développement embryonnaire du squelette ou à la formation des cals de réparation fracturaire, sont encore largement inconnus. Les cellules de l'os et les vaisseaux communiquent en particulier grâce à des molécules d'adhésion telles que les intégrines, qui lient des composantes de la matrice extracellulaire. Parmi ces dernières, les "Small Integrin Binding Ligand N-Linked Glycoproteins" ou SIBLING, constituent un groupe de protéines matricellulaires très fortement impliquées dans la formation et la minéralisation osseuse, et qui inclut la Sialoprotéine Osseuse (BSP) et l'Ostéopontine (OPN), une protéine fortement angiogénique et qui est un puissant inhibiteur de la minéralisation. BSP et OPN sont coexprimées par les ostéoblastes et les ostéoclastes, et nous avons tenté d'analyser dans ce travail les synergies et les régulations croisées entre ces deux facteurs et leur impact sur la biologie osseuse.

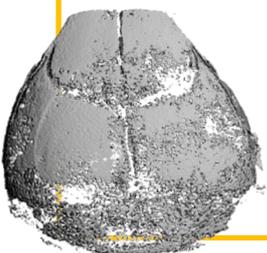
Notre laboratoire a déjà bien caractérisé le phénotype de souris présentant une extinction génique de la BSP (BSP<sup>-/-</sup>). Celles-ci ont un squelette hypominéralisé, et sont dès la naissance plus petites que les souris sauvages, avec des os longs plus courts à l'âge adulte. L'analyse de leur développement s'est trouvée compliquée par un trouble comportemental des femelles BSP<sup>-/-</sup>, qui ne forment pas de nid après la mise bas. Afin d'établir si le retard de croissance des souris BSP<sup>-/-</sup> résulte du comportement des mères mutantes, nous avons d'abord réalisé des séries de croisements entre souris <sup>-/-</sup>, <sup>+/+</sup> et <sup>+/-</sup> qui ont établi que le phénotype osseux des souris déficientes en BSP est d'origine purement génétique. L'analyse des souris dans les jours suivant la naissance a montré une altération de la plaque de croissance. Les souris BSP<sup>-/-</sup> montrent aussi un taux circulant d'OPN plus élevé, qui pourrait expliquer l'hypominéralisation observé chez les souris BSP<sup>-/-</sup>, et qui suggère une compensation de l'absence de la BSP par l'OPN.

Pour tester cette hypothèse, nous avons développé un modèle d'injection de PTH 1-84 sur la moitié droite de l'os pariétal. La PTH induit localement une forte augmentation des paramètres histologiques, microtomographiques et moléculaires de formation osseuse dans les deux génotypes, et en particulier une expression accrue de l'OPN. L'injection *in vivo* de siARN antisens bloquant l'expression d'OPN ne change pas l'effet anabolique de la PTH chez les souris sauvages. Au contraire, la PTH n'a plus d'effet anabolique sur les calvaria de souris BSP<sup>-/-</sup> lorsqu'elle est co-injectée avec le siARN bloquant l'OPN. Ces résultats suggèrent que l'OPN pourrait remplacer la BSP dans certaines de ses fonctions, et que l'absence ou la réduction simultanée de ces deux SIBLING bloque la réponse osseuse à la PTH.

Sachant que l'OPN est surexprimée en l'absence de BSP et qu'elle est fortement angiogénique, nous avons utilisé un modèle d'ablation médullaire, qui permet d'analyser sur un temps très court la revascularisation et la recolonisation hématopoïétique du conduit osseux. Trois jours après l'ablation (J3), l'os des souris BSP<sup>-/-</sup> présentait une densité vasculaire considérablement plus élevée que les BSP<sup>+/+</sup>, qui n'était rejointe chez ces derniers qu'à J8. La recolonisation hématopoïétique était également plus rapide chez les mutants. La QRT-PCR a montré en particulier une expression plus élevée d'OPN et de VEGF-A dans les os ablatés de souris BSP<sup>-/-</sup>, suggérant l'intervention de l'un ou de ces deux facteurs dans la stimulation de l'angiogenèse.

En conclusion, la BSP est un facteur clé dans le développement osseux, dont l'absence affecte l'interaction entre l'ostéogenèse, l'angiogenèse et l'hématopoïèse. L'effet anabolique de la PTH nécessite, au moins dans le modèle d'injection sur les calvaria, la coexpression de l'OPN et la BSP. Ces résultats suggèrent que l'OPN compense fonctionnellement l'absence de BSP en réponse à ce défi hormonal. Un tel effet de « vicariance » contribue au phénotype des souris BSP<sup>-/-</sup>, et nos travaux constituent donc un début d'analyse des interactions fonctionnelles existant entre ces deux protéines.

**Mots clés : Sialoprotéine Osseuse, Ostéopontine, Angiogenèse, Parathormone**



**Wafa Bouleftour**

**16 Décembre 2013**

