



HAL
open science

COROS - Correction du déficit osseux dans la mucoviscidose.

Martial Delion

► **To cite this version:**

Martial Delion. COROS - Correction du déficit osseux dans la mucoviscidose.. Sciences pharmaceutiques. Université de Reims - Champagne Ardenne, 2016. Français. NNT: 2016REIMP203 . tel-01643682

HAL Id: tel-01643682

<https://theses.hal.science/tel-01643682>

Submitted on 21 Nov 2017

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

Discipline : PHARMACIE

Spécialité : Biologie cellulaire

Présentée et soutenue publiquement par

Martial DELION

Le 7 octobre 2016

CORRECTION DU DÉFICIT OSSEUX DANS LA MUCOVISCIDOSE

Thèse dirigée par **Jacky JACQUOT**

JURY

| | | | |
|----------------------------------|---------------|---|---------------------|
| Mme. Sophie GANGLOFF, | , Professeur, | à l'Université Reims Champagne-Ardenne, | , Président |
| Mme. Isabelle SERMET-GAUDELUS, | , Professeur, | à l'Université Paris Descartes, | , Rapporteur |
| Mme. Magali TAULAN-CADARS, | , Docteur, | à l'Université de Montpellier, | , Rapporteur |
| Mme. Marie-Hélène LAFAGE-PROUST, | , Professeur, | à l'Université de Saint-Etienne, | , Examineur |
| M. Jacky JACQUOT, | , Docteur, | à l'Université Reims Champagne-Ardenne, | , Examineur |
| M. Frédéric VELARD, | , Docteur, | à l'Université Reims Champagne-Ardenne, | , Examineur |



REMERCIEMENTS

Je remercie Madame le Professeur **Isabelle SERMET-GAUDELUS** et Madame le Docteur **Magali TAULAN CADARS** qui me font l'honneur d'être les rapporteurs de ce travail de thèse.

Je remercie Madame le Professeur **Marie-Hélène LAFAGE-PROUST** et Madame le Professeur **Sophie GANGLOFF** d'avoir accepté d'être les juges de mon travail.

Madame le Professeur **Sophie GANGLOFF**, je vous remercie également pour m'avoir permis de réaliser mes travaux de thèse au sein de l'EA 4691 « BIOS » et pour m'avoir accompagné durant ces trois années.

Je tiens à remercier Monsieur le Docteur **Jacky JACQUOT** pour avoir dirigé mon travail de thèse. Merci pour votre passion, pour m'avoir toujours encouragé dans mon travail et pour m'avoir donné vos « petits trucs » pour faire de moi un bon chercheur. Merci également de m'avoir permis d'obtenir un post-doctorat et donc de pouvoir envisager sereinement la suite de ma carrière.

Je remercie Monsieur le Docteur **Frédéric VELARD** pour avoir codirigé ce travail. Tout naturellement merci pour ton aide inestimable et le soutien que tu m'as apporté durant ma thèse. Merci pour ta confiance, tes encouragements et pour toutes les connaissances que tu m'as transmises. Merci également de m'avoir toujours poussé à donner le meilleur de moi-même.

Je souhaite remercier Monsieur le Docteur **Philippe KIEFER** de la société Vertex Pharmaceuticals France qui a accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je tiens à adresser des remerciements particuliers à **Christine GUILLAUME**, « kiki ». Merci pour ton aide pendant ces 3 années, tu m'as énormément appris. J'espère seulement pour toi que les prochains thésards délègueront moins! Merci également pour nos nombreuses discussions et pour ta sollicitude quand tu sentais venir mes « coups de mou », cela m'a toujours reboosté.

Merci également à **Beanette**, pour ta bonne humeur inébranlable. Impossible d'avoir le cafard à tes côtés.

Un grand merci à **Jérôme**, étant d'un an ton cadet en tant que thésard tu m'as beaucoup aiguillé, aidé et rassuré durant ces trois années de thèse. Merci aussi pour les soirées et tous les autres moments partagés avec toi. Je te souhaite une bonne continuation à Lyon.

Merci à tous les autres « piou-piou » du laboratoire : **Saad, Monsieur Us, Marie, Léa, Camille, Aurélie, Marie-Laure**. Je vous souhaite à tous une grande réussite dans vos projets. Merci pour les franches rigolades et les nombreux, excellents, moments passés à vos côtés. Camille, merci pour les ELISA !

Bien sûr, je remercie **tous les membres de l'équipe** qui m'ont entouré pendant ces trois années. C'est aussi à vous que je dois le bon déroulement de cette thèse. Il y a toujours eu un moment où chacun d'entre vous a pu m'apporter son aide, me faire profiter de son expérience et m'écouter me plaindre de mes horribles, horribles enfants. Merci pour votre bonne humeur, pour les repas de labo et pour tous ces bons moments passés à vos côtés.

Je tiens aussi à remercier Monsieur le Docteur **Christophe MENSA** et l'ensemble du personnel du service de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique du CHU de Reims pour nous avoir fourni les explants osseux.

Je remercie également les professeurs **Isabelle SERMET-GAUDELUS** et **Françoise LE PIMPEC-BARTHES** ainsi que les équipes de l'hôpital Européen Georges Pompidou pour l'obtention des explants osseux issus de patients ayant la mucoviscidose.

Merci à ma **Maman**. Tu m'as toujours poussé à viser plus haut mais surtout tu m'as encouragé à choisir un métier qui me plaise, c'est chose faite.

Merci à toute **ma famille et mes amis**. Ceux qui sont près comme ceux qui sont loin. Il y aurait trop de chose à énumérer, donc simplement merci à tous, pour tout.

Pour finir, un immense merci à ma femme, **Laureen**. Tu m'as apporté tous ce que je pouvais souhaiter. Merci pour ton aide et ton soutien, autant pour la thèse que depuis nos débuts. Nous avons traversés toutes nos épreuves ensemble et une nouvelle aventure nous attend outre-Atlantique. Merci pour mes deux fils, **Liam** et **Maxence**, qui m'apportent autant de bonheur que de fatigue !

A ma femme, Laureen, et mes deux fils, je vous aime

TABLE DES MATIERES

| | |
|--|-----------|
| LISTE DES ABREVIATIONS | 7 |
| LISTE DES ILLUSTRATIONS | 9 |
| CONTEXTE | 12 |
| INTRODUCTION..... | 14 |
| 1. LE TISSU OSSEUX..... | 14 |
| 1.1. Structure et fonctions | 14 |
| 1.2. Organisation du tissu osseux | 15 |
| 1.2.1. L'os cortical..... | 15 |
| 1.2.2. L'os trabéculaire | 16 |
| 1.2.3. Le périoste et l'endoste..... | 16 |
| 1.3. Histologie du tissu osseux | 17 |
| 1.3.1. Les cellules du tissu osseux | 17 |
| 1.3.2. La matrice extracellulaire osseuse | 21 |
| 1.4. Le remodelage osseux..... | 22 |
| 1.4.1. La résorption osseuse..... | 23 |
| 1.4.2. La phase d'inversion..... | 24 |
| 1.4.3. La formation et la minéralisation osseuse | 25 |
| 1.4.4. Régulation du remodelage osseux | 25 |
| 1.4.5. Les interactions entre les ostéoclastes et les ostéoblastes..... | 31 |
| 1.4.6. Libération de facteurs hormonaux lors de la résorption | 32 |
| 2. LA MUCOVISCIDOSE | 36 |
| 2.1. Généralités..... | 36 |
| 2.2. La protéine <i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i> | 37 |
| 2.3. Physiopathologie..... | 39 |
| 2.4. La pathologie osseuse associée à la mucoviscidose..... | 41 |
| 2.5. Les traitements du déficit osseux | 44 |
| 2.5.1. Les traitements anti-ostéoporotiques | 44 |

| | | |
|--------|--|------------|
| 2.5.2. | Traitement de la pathologie osseuse associée à la mucoviscidose | 45 |
| 2.5.3. | Les traitements de la mucoviscidose | 46 |
| 2.6. | Dysfonction de la protéine CFTR dans les cellules osseuses | 47 |
| 2.6.1. | Etudes <i>in vitro</i> | 48 |
| 2.6.2. | Les modèles animaux | 49 |
| | OBJECTIFS | 50 |
| | RESULTATS | 52 |
| | 1^{ère} partie : | 52 |
| | Mucoviscidose et pathologie osseuse : défaut de maturation des ostéoblastes portant la mutation F508del sur la protéine Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator | 52 |
| | La maladie osseuse de la mucoviscidose : le correcteur de CFTR, le C18, est-il une thérapie envisageable ? | 60 |
| | 2^{ème} partie : | 66 |
| | Surexpression de RANKL par les ostéoblastes F508del-CFTR : un mécanisme possible de susceptibilité à la pathologie osseuse dans la mucoviscidose | 66 |
| | DISCUSSION ET PERSPECTIVES | 84 |
| | REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 92 |
| | BIBLIOGRAPHIE PERSONNELLE | 112 |
| | ANNEXES | 116 |
| | Annexe 1 : | 116 |
| | Bone disease in cystic fibrosis: new pathogenic insights opening novel therapies | 116 |
| | Annexe 2 | 129 |
| | Bone demineralization is improved by ivacaftor in patients with cystic fibrosis carrying the p.Gly551Asp mutation | 129 |

LISTE DES ABREVIATIONS

ABC : *ATP binding cassette*

ADAM : *A disintegrin and metalloproteinase*

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ATP : Adénosine triphosphate

AKT : Protéine kinase B

BMP : *Bone morphogenetic protein*

BSP : *Bone sialoprotein*

CF : *Cystic fibrosis*

CFBD : *Cystic fibrosis-related bone disease*

CFRD : *Cystic fibrosis-related diabetes*

CFTR : *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*

ClC-7 : Canal chlorure 7

COX : Cyclooxygénase

CSF-1R : *Colony stimulating factor 1 receptor*

DKK1 : Dickkopf

DMP1 : *Dental matrix protein 1*

DMO : Densité minérale osseuse

DOM-COM : Départements et communautés d'outre-mer

EN : Elastase du neutrophile

ERK : *Extracellular signal-regulated kinase*

EPxR : *Prostaglandin E2 receptor subtype x*

FEV₁ : *Forced expiratory volume in 1 second*

Gprc6a : *G protein-coupled receptor class C group 6 member A*

HSC : Cellule souche hématopoïétique

IGF-1 : *Insulin like growth factor 1*

IL : Interleukine

IMC : Indice de masse corporelle

InsR : Récepteur à l'insuline

LH : Hormone lutéinisante

LRP : *Low density lipoprotein-related protein*

M-CSF : *Macrophage-Colony stimulating Factor*

MEC : Matrice extracellulaire

MMP : Metalloprotéase de la matrice

MSC : Cellule souche mésenchymateuse

NBD : *Nucleotide binding domain*

NFATc1 : *Nuclear factor of activated T-cells cytoplasmic 1*

NF- κ B : *Nuclear Factor- kappaB*

OCN : Ostéocalcine

OPG : Ostéoprotégérine

PBMC : Cellules mononucléaires du sang périphérique

PCR : *Polymerase chain reaction*

PGE2 : Prostaglandine E2

PPi : Pyrophosphate

PTGS : *Prostaglandin endoperoxide synthase*

PTH : Hormone parathyroïdienne

PTH1R : *Parathyroid hormone 1 receptor*

R : *Regulatory domain*

RANK : *Receptor Activator of NF- κ B*

RANKL : *Receptor Activator of NF- κ B Ligand*

Runx2 : *Runt-related transcription factor 2*

S1P : Sphingosine 1 phosphate

SOST : Sclérostine

SPHK1 : Sphingosine kinase 1

TGF- β : *Transforming growth factor β*

TMD : *Transmembrane domain*

TNF : *Tumor necrosis factor*

TNFRSF11B : *Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11B*

TRAF : *Tumor necrosis factor receptor associated factor*

UTR : *Untranslated region*

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Schémas :

| | |
|---|-----------|
| <i>Schéma 1 : L'os est un tissu dynamique.....</i> | <i>14</i> |
| <i>Schéma 2 : L'os cortical.....</i> | <i>15</i> |
| <i>Schéma 3 : L'os trabéculaire</i> | <i>16</i> |
| <i>Schéma 4 : Le périoste et l'endoste.....</i> | <i>17</i> |
| <i>Schéma 5 : La différenciation ostéoblastique</i> | <i>18</i> |
| <i>Schéma 6 : La différenciation ostéocytaire.....</i> | <i>19</i> |
| <i>Schéma 7 : La différenciation des ostéoclastes.....</i> | <i>21</i> |
| <i>Schéma 8 : Le remodelage osseux.....</i> | <i>23</i> |
| <i>Schéma 9 : La résorption osseuse par l'ostéoclaste</i> | <i>24</i> |
| <i>Schéma 10 : La régulation du remodelage osseux.....</i> | <i>25</i> |
| <i>Schéma 11 : La voie de signalisation RANKL dans les ostéoclastes</i> | <i>26</i> |
| <i>Schéma 12 : La voie de signalisation wnt</i> | <i>27</i> |
| <i>Schéma 13 : La protéine wnt16 dans le remodelage osseux.....</i> | <i>28</i> |
| <i>Schéma 14 : Les interactions entre RANK, RANKL et OPG</i> | <i>28</i> |
| <i>Schéma 15 : L'impact de la PGE2 sur les interactions RANK/RANKL/OPG</i> | <i>29</i> |
| <i>Schéma 16 : L'impact des miRNA dans l'ostéoblastogénèse.....</i> | <i>30</i> |
| <i>Schéma 17 : La régulation du remodelage osseux par la SIP.....</i> | <i>32</i> |
| <i>Schéma 18 : L'impact d'autres organes sur la libération d'ostéocalcine</i> | <i>32</i> |
| <i>Schéma 19 : Le rôle endocrinien du tissu osseux via l'ostéocalcine</i> | <i>33</i> |
| <i>Schéma 20 : L'axe Pancréas-Os-Testicule</i> | <i>35</i> |
| <i>Schéma 21 : Les classes de mutations de CFTR.....</i> | <i>37</i> |
| <i>Schéma 22 : La structure de la protéine CFTR</i> | <i>38</i> |
| <i>Schéma 23 : La modélisation de CFTR et ses différentes formes détectées par western blot .</i> | <i>38</i> |
| <i>Schéma 24 : L'ouverture et la fermeture du canal CFTR.....</i> | <i>39</i> |
| <i>Schéma 25 : Les principaux symptômes de la mucoviscidose</i> | <i>40</i> |
| <i>Schéma 26 : Les fractures aiguës et non-soudées chez un patient mucoviscidosique</i> | <i>42</i> |
| <i>Schéma 27 : La microarchitecture de l'os trabéculaire tibial.....</i> | <i>43</i> |
| <i>Schéma 28 : Les stratégies de traitement de la mucoviscidose.....</i> | <i>47</i> |

Figures du 1^{er} article :

| | |
|--|----|
| <i>Figure 1 : The F508del mutation in CFTR caused no significant difference affected maturation-related genes in F508del osteoblasts compared with healthy osteoblasts</i> | 24 |
| <i>Supplementary Figure 1S : The CFTR-dependant chloride transport is lower in F508del osteoblasts compared to normal osteoblasts</i> | 25 |

Figures du 2^{ème} article :

| | |
|--|----|
| <i>Figure 1 : The CFTR corrector C18 restores CFTR-dependant chlorid transport in F508del osteoblast</i> | 60 |
|--|----|

Figures du 3^{ème} article :

| | |
|--|----|
| <i>Figure 1 : The mutation F508del in CFTR does not impair ultrastructure aspects of primary osteoblasts in long term cultures</i> | 68 |
| <i>Figure 2 : The mutation F508del in CFTR does not impair alkaline phosphatase activity but delays the extracellular bone mineralization</i> | 69 |
| <i>Figure 3 : The mutation F508del in CFTR causes elevated RANKL protein production and greater RANKL localization in CF osteoblasts</i> | 70 |
| <i>Figure 4 : The mutation F508del in CFTR causes lower OPG release in CF osteoblasts and enhanced RANKL-to-OPG ratio</i> | 71 |
| <i>Figure 5 : The pharmacological inhibition of CFTR chloride channel activity causes an enhanced RANKL-to-OPG ratio in non-CF osteoblasts</i> | 72 |
| <i>Figure 6 : The CFTR corrector C18 but not Vx770 with Vx809 combined drugs and the lipid mediator 15d-PGJ2 reduces production of RANKL by CF osteoblasts</i> | 73 |

Figures de l'annexe 1 :

| | |
|---|-----|
| <i>Figure 1 : Physiological mechanisms involved in CFBD</i> | 113 |
| <i>Figure 2 : Miglustat increases vertebral bone volume in F508del mice</i> | 116 |

Figures de l'annexe 2 :

| | |
|--|-----|
| <i>Figure 1 : The CFTR corrector C18 reduces RANKL protein production in absence or presence of the pro-inflammatory cytokine TNF-α in F508del osteoblasts</i> | 126 |
|--|-----|

Tableaux :

Tableaux de l'annexe 1 :

Table 1 : Impact of CFTR dysfunction on bone metabolism.....116

Tableaux de l'annexe 2 :

Table 1 : Clinical data of G551D patients before and after treatment with Ivacaftor126

CONTEXTE

L'espérance de vie des patients atteints de mucoviscidose (*Cystic Fibrosis*, CF) a fortement augmenté au cours de ces 20 dernières années, en partie grâce à l'amélioration de leur état nutritionnel et aux interventions précoces visant à réduire les affections pulmonaires et gastro-intestinales. Avec l'augmentation de leur durée de vie (38 ans en moyenne), d'autres pathologies associées à cette maladie ont émergé comme le diabète et la maladie osseuse, qui sont les deux comorbidités extra-pulmonaires les plus fréquemment rapportées chez le patient CF adulte. Une faible densité osseuse est désormais reconnue comme une complication sévère de la CF et représente un véritable problème de prise en charge du patient, jeune et adulte.

De nombreux symptômes dus à la mucoviscidose, ainsi que certains de leurs traitements, peuvent entraîner une perte osseuse : infections pulmonaires chroniques, déficience en calcium et en vitamine D, retard de la puberté et prise fréquente de glucocorticoïdes peuvent tous avoir un impact sur le métabolisme osseux. Cependant, en dépit d'une meilleure prise en charge des patients, aucune amélioration significative du statut osseux n'a été observée chez les patients CF laissant supposer une origine génétique à ce défaut osseux.

Bien qu'un phénomène de résorption excessif intervienne probablement dans cette pathologie osseuse, l'efficacité modeste des biphosphonates sur l'amélioration de la densité minérale osseuse des patients CF laisse supposer que leur formation osseuse est également dérégulée. Des études cliniques ont montré que le déficit fonctionnel de la protéine CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) en soit pouvait être un facteur de risque d'un défaut de formation osseuse. Cependant, la manière dont la mutation du gène *CFTR* impacte le métabolisme des ostéoblastes, les cellules formant l'os, n'est pas connue.

Durant ce travail de thèse, notre objectif a été d'évaluer l'impact de la mutation F508del de *CFTR* sur le métabolisme des ostéoblastes. Nous nous sommes principalement intéressés au profil de maturation des ostéoblastes, à l'étude des voies de régulation du remodelage osseux et à l'efficacité que pouvaient présenter des correcteurs de CFTR sur ces points d'intérêts. Ce manuscrit s'organise autour d'une introduction bibliographique, d'une partie expérimentale exposant les résultats obtenus sous forme d'articles publiés et d'une discussion générale incluant des perspectives.

L'introduction bibliographique permet une présentation du tissu osseux et de sa structure, en présentant notamment les cellules composant l'os et la communication intercellulaire

permettant le contrôle du remodelage osseux. Elle présente ensuite la mucoviscidose, la pathologie osseuse associée et les moyens de traitement actuels.

La partie résultats de ce manuscrit repose sur trois articles publiés durant cette thèse.

La première partie comprend deux articles. Elle expose dans un premier temps les résultats obtenus sur l'étude de l'expression de gènes de la différenciation et de la maturation ostéoblastique chez des ostéoblastes primaires humains portant la mutation F508del issus de patients. Nos résultats font l'objet d'un article intitulé « *Cystic Fibrosis and Bone Disease: Defective Osteoblast Maturation with the F508del Mutation in Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* » publié dans *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, en 2014.

Dans un second temps sur le même modèle cellulaire, nous présentons les effets d'un correcteur et potentiateur de CFTR, le C18 (Vertex Pharmaceuticals, Boston), sur l'expression de gènes de maturation des ostéoblastes CF. Ces seconds résultats ont fait l'objet d'un article intitulé « *Cystic fibrosis bone disease : is the CFTR corrector C18 an option for therapy* » publié dans *European Respiratory Journal*, en 2015.

La seconde partie présente l'étude de la voie de signalisation RANK/RANKL/OPG et des effets de correcteurs de CFTR sur cette voie. Ces derniers résultats ont fait l'objet d'un article intitulé « *Over-expression of RANKL in osteoblasts: a possible mechanism of susceptibility to bone disease in cystic fibrosis* » publié dans *Journal of Pathology*, en 2016.

Une discussion générale permet ensuite de replacer les résultats obtenus dans le contexte actuel de la pathologie et de les discuter. Elle s'accompagne de perspectives proposées pour poursuivre ce travail.

INTRODUCTION

1. Le tissu osseux

1.1. Structure et fonctions

Le squelette est la structure qui permet le maintien de l'organisme. Il est constitué d'os, un tissu conjonctif minéralisé qui lui confère sa rigidité (1,2). Les os sont classés en cinq variétés anatomiques selon leur forme et leur taille : les os courts parmi lesquels on retrouve les os du poignet, les os longs comme le fémur ou les phalanges, les os plats dont le sternum et les côtes, les os irréguliers à l'instar des vertèbres et du bassin et enfin les os sésamoïdes comme la patella qui sont souvent retrouvés au niveau des tendons.

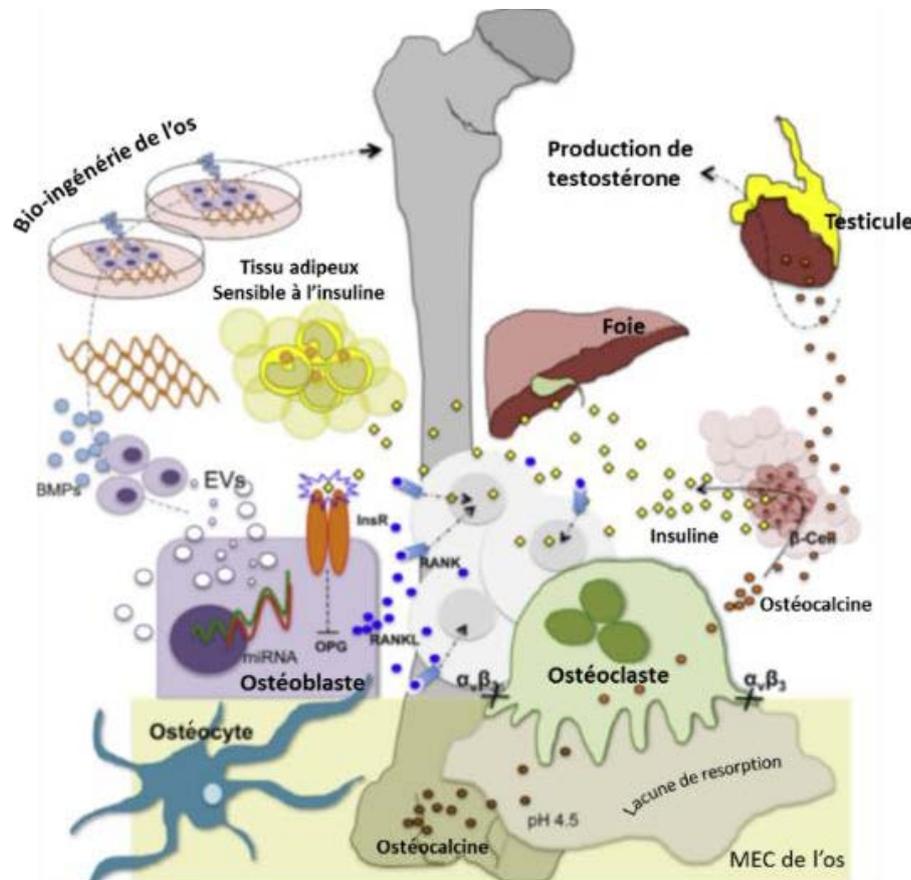


Schéma 1 : L'os est un tissu dynamique (Van der Eerden BC. et al. (7))

Le tissu osseux assure plusieurs fonctions au sein de l'organisme : un rôle de soutien de l'organisme et de protection des organes internes, une fonction mécanique, il participe à l'homéostasie phosphocalcique, assure une fonction métabolique et enfin possède un rôle hématopoïétique (2,3). La rigidité de l'os confère au corps sa capacité de mouvement grâce aux interactions avec d'autres tissus comme les muscles et le cartilage (4). Bien que rigide, l'os est

un tissu dynamique en constant renouvellement. De fait, sa composition va lui conférer un rôle central dans l'homéostasie du calcium et du phosphate en tant que réservoir de sels minéraux qui seront libérés durant le remodelage osseux (5,6). Le renouvellement de l'os va également être à l'origine d'une interaction avec d'autres types cellulaires et organes par le biais de molécules qui sont relarguées durant la résorption osseuse à l'instar de l'ostéocalcine (OCN) (Schéma 1)(7). Enfin, le tissu osseux possède également des rôles dus à la moelle osseuse présente dans l'os. Au sein de l'espace médullaire osseux est présente la moelle osseuse rouge hématopoïétique dans laquelle sont contenues des cellules souches à l'origine de 3 lignées sanguines, les globules rouges, les globules blancs et les plaquettes (8). La moelle osseuse jaune, elle, contient de nombreux adipocytes qui vont participer au métabolisme énergétique notamment *via* la régulation du taux de triglycérides circulants (9).

1.2. Organisation du tissu osseux

La structure du tissu osseux n'est pas uniforme. Parmi les compartiments identifiés la partie externe est appelée os cortical. Elle enveloppe une phase interne poreuse appelée l'os trabéculaire, qui contient notamment la moelle osseuse. Ces deux compartiments sont recouverts de membranes appelées périoste et endoste.

1.2.1. L'os cortical

L'os cortical est dense. Il est également nommé os compact, os lamellaire ou encore os haversien et forme la paroi externe de l'os. Il représente environ 80% de la masse du tissu osseux mais seulement 20% de sa surface. Il est constitué d'ostéons ou systèmes Haversiens (Schéma 2).

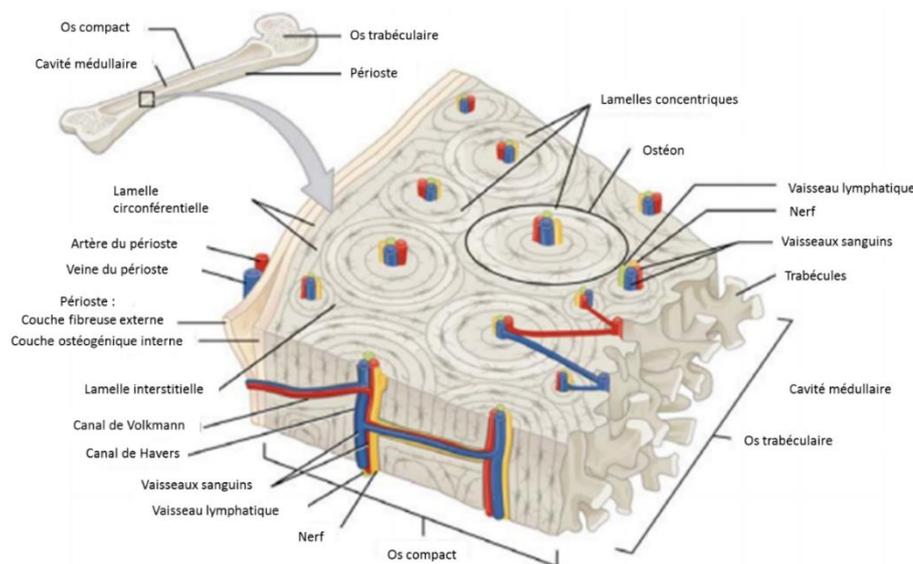


Schéma 2 : L'os cortical (*Anatomy & Physiology* (2))

Un ostéon est composé de lamelles de matrice osseuse disposées de façon concentrique qui délimitent le « canal de Havers ». Entre les lamelles se trouvent des espaces nommés lacunes (ou ostéoplastes) contenant des cellules, les ostéocytes. Ces dernières peuvent communiquer à travers la matrice osseuse *via* des canaux, les canalicules osseux. Les canaux Haversiens contiennent des fibres nerveuses amyéliniques et des vaisseaux sanguins, reliés entre eux mais également avec les vaisseaux sanguins situés sur la surface externe de l'os *via* les canaux de Volkmann (3).

1.2.2. L'os trabéculaire

L'os trabéculaire ou os spongieux, compose la partie interne de l'os et compte pour 20% de la masse de l'os tandis qu'il représente 80% de sa surface. Il est formé de travées (également appelées trabécules) en forme de plaques ou de cordes interconnectées (Schéma 3). La structure des trabécules présente des lamelles disposées de façon concentrique laissant place à des lacunes dans lesquelles sont contenus des ostéocytes. Dans les extrémités des os longs, les métaphyses et épiphyses, ainsi que dans certains os courts et plats l'espace entre les travées peut contenir de la moelle osseuse rouge, à l'origine de la fonction hématopoïétique de l'os (2,3).

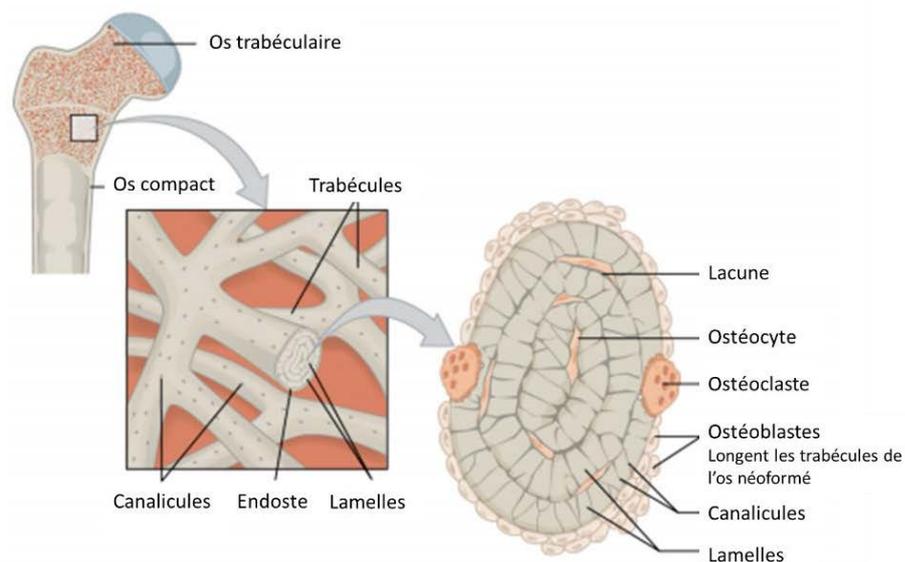


Schéma 3 : L'os trabéculaire (*Anatomy & Physiology* (2))

1.2.3. Le périoste et l'endoste

La surface externe de l'os cortical est recouverte par une membrane, le périoste à l'exception des zones interarticulaires recouvertes de cartilage. Le périoste possède une couche externe fibreuse et une couche interne cellulaire. L'endoste, lui, est un tissu conjonctif qui tapisse les

surfaces internes de l'os compact ainsi que les trabécules de l'os spongieux. Le périoste et l'endoste contiennent des ostéoprogéniteurs mais aussi des ostéoblastes et des ostéoclastes (Schéma 4)(2,3,10).

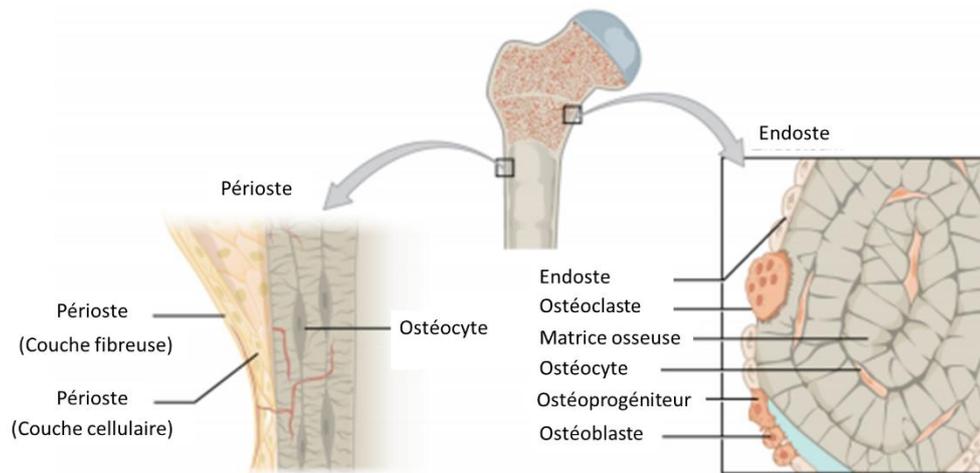


Schéma 4 : Le périoste et l'endoste (Anatomy & Physiology (2))

1.3. Histologie du tissu osseux

Le tissu osseux est un tissu conjonctif ; il est donc composé d'un ensemble de cellules (ostéoblastes, ostéoclastes, ostéocytes, cellules bordantes ainsi que leurs progéniteurs) qui reposent sur une matrice extracellulaire (MEC). L'os a la particularité de posséder une MEC minéralisée qui lui confère sa rigidité. Le tissu osseux est ainsi composé de deux phases majeures : une phase minérale qui représente 50 à 70% du poids sec de l'organe osseux et une phase organique qui en compose 20 à 40% ainsi que d'eau (5 à 10%) et de lipides (moins de 3%) (11).

1.3.1. Les cellules du tissu osseux

Deux origines cellulaires donnent naissance aux 4 types de cellules qui constituent le tissu osseux : les cellules souches mésenchymateuses (MSC) à l'origine des cellules ostéoformatrices (ostéoblastes, ostéocytes et cellules bordantes) et les cellules souches hématopoïétiques (HSC) donnant naissance à la lignée des monocytes/macrophages qui comprend les précurseurs ostéoclastiques qui se différencient en ostéoclastes.

1.3.1.1. Les ostéoblastes

Les ostéoblastes, qui représentent 4 à 6 % des cellules présentes dans l'os, sont des acteurs majeurs du tissu osseux et de sa dynamique. Ils permettent le maintien et le renouvellement de la masse osseuse par la synthèse et la minéralisation de la MEC osseuse et par leurs interactions avec d'autres types cellulaires comme les ostéoclastes et les ostéocytes.

Les ostéoblastes sont issus des MSC, qui, selon les médiateurs perçus et la voie de signalisation mise en jeu, peuvent également être à l'origine d'autres lignées cellulaires dont les fibroblastes, les myoblastes, les chondrocytes ou encore les adipocytes (Schéma 5) (12). La différenciation des ostéoblastes est communément décrite en 3 stades de développement : prolifération, maturation de la MEC et minéralisation (12,13). La signalisation wnt, l'expression de *RUNX2* puis de *SP7* (codant osterix) permettent d'engager les précurseurs ostéoblastiques dans leur voie de différenciation (14). Ces pré-ostéoblastes entament une phase de prolifération durant laquelle différentes protéines marqueurs sont produites comme le collagène de type I, la fibronectine ou l'ostéopontine (13–15). Il s'en suit une maturation de la MEC durant laquelle l'hormone parathyroïdienne (ou parathormone, PTH) induit la production de nombreuses protéines par les ostéoblastes dit immatures, comme le collagène de type I, la phosphatase alcaline ou encore la BSP-II (*Bone sialoprotein II*) (13,16,17) qui marque l'initiation de la minéralisation (17). Les ostéoblastes matures vont alors rentrer dans la phase de minéralisation qui se caractérise par la synthèse de plusieurs protéines spécifiques dont l'ostéocalcine (13,14,18). Après la synthèse et la minéralisation de la matrice osseuse, 50 à 70% des ostéoblastes vont subir une apoptose tandis que le reste va poursuivre sa différenciation en ostéocytes ou en cellules de la lignée bordante (3,13,19).

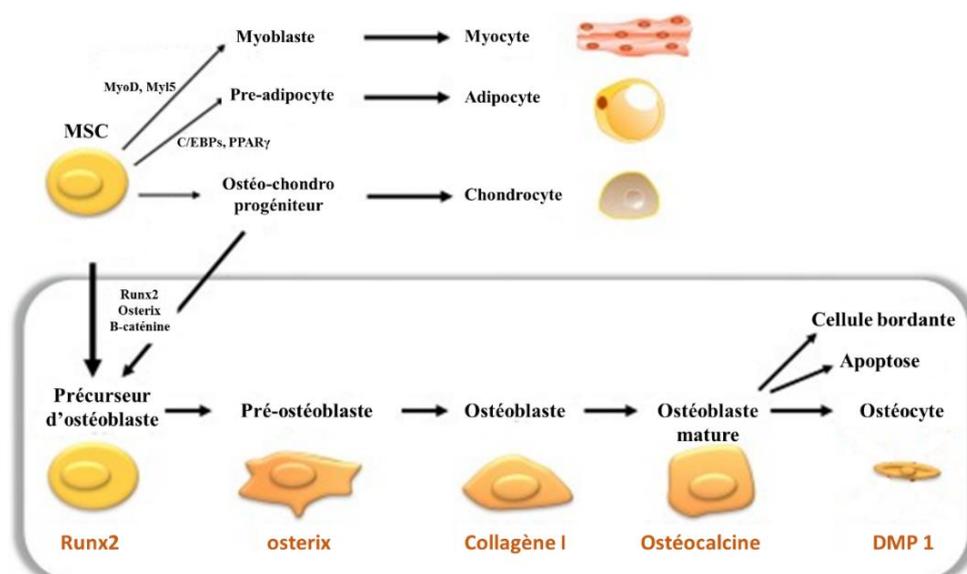


Schéma 5 : La différenciation ostéoblastique (Dirckx N. et al, (12))

En plus de leur capacité de synthèse de l'os, les ostéoblastes sont capables d'interagir avec les ostéoclastes et leurs précurseurs par la synthèse de cytokines impactant leur métabolisme (20).

1.3.1.2. Les ostéocytes

Il a été proposé que la différenciation ostéocytaire puisse être divisée en quatre stades: les ostéocytes ostéoblastiques (pré-ostéocytes de type I), les ostéocytes ostéoïdes (pré-ostéocytes de type II), les pré-ostéocytes de type III et enfin les ostéocytes (Schéma 6)(21,22). Les pré-ostéocytes de type I et II possèdent encore une fonction de synthèse et de sécrétion du collagène importante. Lorsque la minéralisation de l'ostéoïde a lieu, il y a une diminution de la sécrétion de protéines par les cellules qui sont alors définies comme des pré-ostéocytes de type III. A ce moment-là, la matrice n'est pas encore complètement minéralisée. Lorsque c'est le cas, les cellules présentes dans la matrice sont nommées ostéocytes. L'expression de gènes spécifiques des ostéoblastes comme ceux de la phosphatase alcaline, de l'ostéocalcine ou du collagène de type I est diminuée voir absente tandis que d'autres gènes comme *SOST* et *DMP1* sont hautement exprimés (19,21,22).

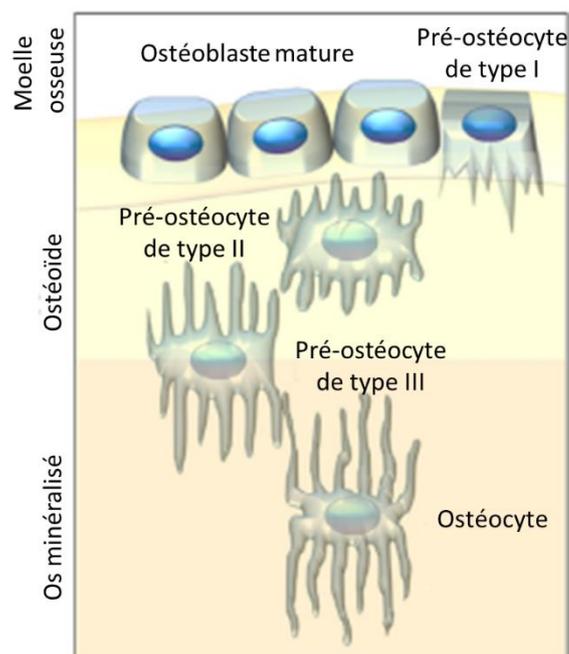


Schéma 6 : La différenciation ostéocytaire (Capulli M. et al, (22))

L'ostéocyte est le type cellulaire le plus représenté dans le tissu osseux avec un taux de 90 à 95% des cellules. Ils sont encloués dans la MEC et présentent de nombreuses ramifications dendritiques qui se développent à travers la MEC *via* les canalicules osseux. Les terminaisons dendritiques des ostéocytes permettent une communication intercellulaire soit entre eux soit

avec d'autres types cellulaires comme les ostéoblastes et les ostéoclastes *via* des jonctions communicantes qui facilitent le transport de petites molécules de signalisation (22–24). La communication intercellulaire est également possible grâce au fluide interstitiel présent dans les canalicules qui permet une signalisation paracrine (25).

Les ostéocytes possèdent un rôle important dans le remodelage osseux. Grâce à leur rôle de mécanosenseur et leur capacité de mécano-transduction ils vont communiquer avec les ostéoblastes et les ostéoclastes *via* la sécrétion de différentes molécules capables de moduler le remodelage osseux (22–24).

1.3.1.2. Les cellules bordantes

Après avoir réalisé la formation et la minéralisation de la MEC, les ostéoblastes peuvent devenir quiescents et sont alors désignés en tant que cellules bordantes (21). Les cellules bordantes sont connectées aux ostéocytes *via* les canalicules et participent à la régulation des flux en ions minéraux dans le fluide extracellulaire osseux. Elles forment ainsi une barrière entre le sang et l'os (3). Les cellules bordantes ont un rôle important dans la régulation du remodelage osseux. Leur présence empêche la résorption osseuse au niveau des sites où elle ne doit pas avoir lieu, puis, elles permettent le recrutement et participent à la différenciation des ostéoclastes (26). De plus les cellules bordantes conservent la capacité à se redifférencier en ostéoblastes sous une exposition à l'hormone parathyroïdienne ou un effet paracrine des ostéocytes sous l'effet de forces mécaniques (3).

1.3.1.3. Les ostéoclastes

Les ostéoclastes sont les seules cellules capables de résorber l'os. Ce sont des cellules plurinucléées hautement spécialisées issues de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques (Schéma 7)(27,28). Le PU.1 est un facteur de transcription qui permet l'engagement des précurseurs myéloïdes dans la voie ostéoclastique (28). La poursuite de la différenciation est principalement due à deux cytokines le *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) et le *receptor activator of NF- κ B ligand* (RANKL) produites par les ostéoblastes (29,30). Dans un premier temps la prolifération des précurseurs ostéoclastiques est possible grâce à la liaison de M-CSF à son récepteur (CSF-1R) ce qui active la voie de signalisation ERK. La liaison de M-CSF à CSF-1R active également la voie Akt qui permet la survie des pré-ostéoclastes. De plus M-CSF stimule également l'expression du récepteur *receptor activator of NF- κ B* (RANK) à la surface des pré-ostéoclastes (31). C'est ensuite la

liaison de RANKL sur son récepteur RANK qui va permettre la différenciation des précurseurs en ostéoclastes (27).

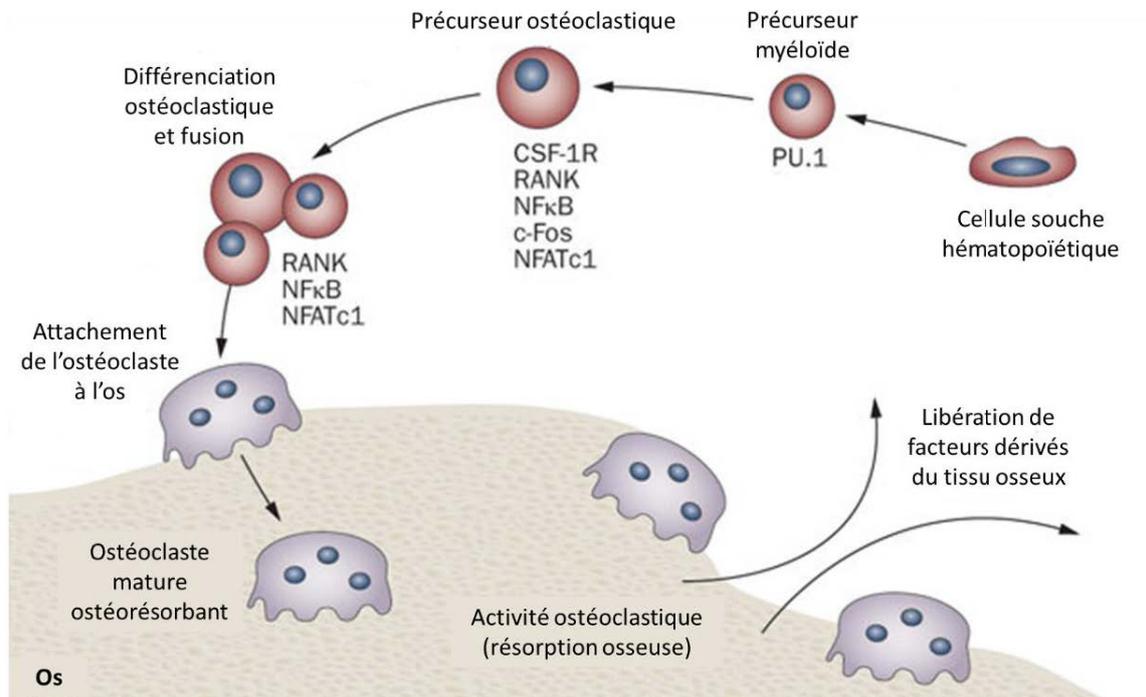


Schéma 7 : La différenciation des ostéoclastes (*Edwards JR. et Mundy GR. (28)*)

1.3.2 La matrice extracellulaire osseuse

Les cellules ostéoformatrices synthétisent et secrètent des protéines, puis réalisent des dépôts de phosphates de calcium qui vont cristalliser et permettre la minéralisation du tissu osseux (3,32), formant ainsi une MEC minéralisée.

1.3.2.1 La phase organique

La protéine majoritairement présente dans la matrice osseuse est le collagène de type I. Il représente 80 à 95% des protéines de ce tissu (11). Le collagène est une molécule formée de polypeptides qui forment une structure en triple hélice qui peut être composée d'homo- ou hétéro-trimères. C'est l'association du collagène à la partie minérale de l'os qui va conférer les propriétés mécaniques ainsi que la rigidité de ce dernier (33). Les 5 à 20% de protéines autres que le collagène qui forment le reste de la matrice organique sont répertoriées sous le nom de protéines non collagéniques et ont un rôle important dans la formation et la qualité de l'os. Elles possèdent en effet un impact sur la formation des fibrilles de collagène et des cristaux d'hydroxyapatite. L'ostéocalcine et l'ostéopontine, dont l'unique producteur dans l'organisme est l'ostéoblaste, sont les deux protéines non collagéniques les plus abondantes. Elles ont été

montrées comme ayant un impact important dans la minéralisation en favorisant le dépôt de minéraux sur le collagène (34). L'ostéocalcine augmente la formation osseuse, notamment en favorisant l'adhésion des ostéoblastes à la ligne cémentante (35,36). D'autres protéines non collagéniques telles que la fibronectine, l'ostéopontine et la sialoprotéine osseuse ont également un impact sur la formation osseuse (35,37). La sialoprotéine osseuse favorise la formation osseuse en initiant la minéralisation (38,39). Au contraire l'ostéopontine, elle, va inhiber la minéralisation (37). Enfin la fibronectine, elle, favorise la fixation des ostéoclastes matures à la MEC et leur activation mais limite leur nombre en inhibant l'ostéoclastogénèse (40).

1.3.2.2. La phase minérale

Au-delà du rôle de rigidification de l'os, la phase minérale est le principal réservoir en ion calcium et phosphate. Elle est principalement composée de cristaux d'hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) qui se fixent au niveau de sites spécifiques des fibres de collagène et peuvent intégrer d'autres espèces chimiques comme les carbonates (41). L'accumulation d'ions minéraux est à l'origine de la nucléation des cristaux d'hydroxyapatite. Ils vont alors former des germes cristallins puis des cristaux d'hydroxyapatite et ainsi permettre la minéralisation du tissu osseux. L'élaboration de la phase minérale de la MEC se fait en deux temps. Une minéralisation primaire et rapide, *via* le dépôt de petits cristaux imparfaits, a d'abord lieu durant laquelle environ 65% de la densité minérale osseuse (DMO) est atteinte. Elle est suivie d'une minéralisation secondaire, beaucoup plus longue qui va permettre une augmentation du nombre et de la taille de cristaux d'hydroxyapatite mais est surtout à l'origine de leur maturation aboutissant à la formation de cristaux parfaits et mieux organisés (42).

1.4. Le remodelage osseux

Le remodelage osseux est un procédé qui assure le renouvellement continu de l'os permettant le maintien de son intégrité, de sa résistance et de sa force. Il est également un acteur important dans l'homéostasie minérale. La disponibilité des ions calcium et phosphate dans le milieu extracellulaire fluctue durant le remodelage osseux et ces ions sont des facteurs importants pour l'homéostasie osseuse. Les ions phosphates ont un rôle important dans la régulation de la fonction des cellules osseuses, notamment les ostéoblastes et les ostéoclastes (3,43). De la même façon la concentration en ions calcium extracellulaire et l'expression de récepteurs extracellulaires sensible au calcium ont un rôle important dans la différenciation, la prolifération et la minéralisation des ostéoblastes (44,45). Le remodelage osseux peut avoir lieu

dans l'os ancien au niveau de sites définis aléatoirement ou au contraire cibler des zones de l'os qui nécessitent d'être réparées comme dans le cas de microfissures ou de fractures (3,26). Dans des conditions physiologiques normales le remodelage est réalisé grâce au couplage coordonné de deux processus distincts, la résorption de l'os ancien dans un premier temps suivi de la synthèse d'une nouvelle matrice protéique qui va ensuite être minéralisée (3,26,46). Ce phénomène se déroule selon un cycle qui est finement régulé et peut se découper en quatre phase : résorption, inversion, formation, puis minéralisation (schéma 8).

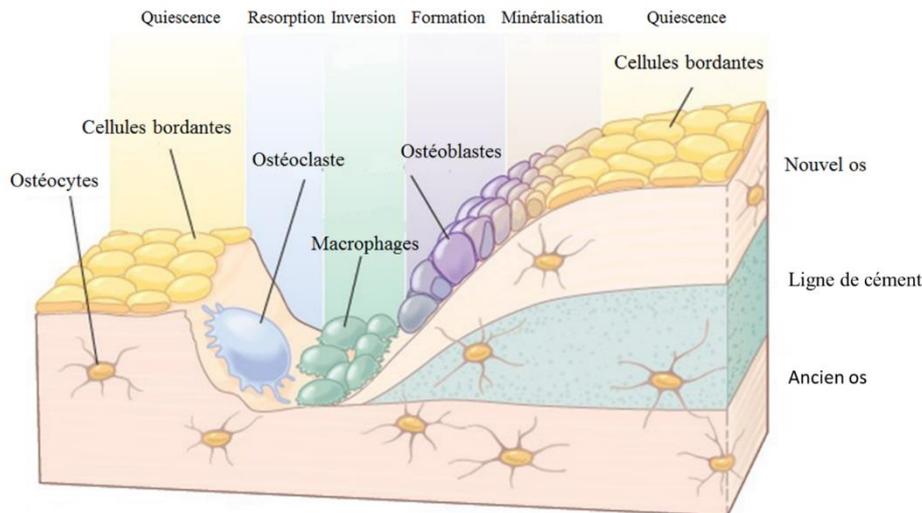


Schéma 8 : Le remodelage osseux (47)

1.4.1. La résorption osseuse

La phase de résorption, qui dure entre 2 et 4 semaines, est initiée par la rétractation des cellules de la lignée bordante au niveau du site où l'os doit être renouvelé. Les précurseurs des ostéoclastes sont alors recrutés et se différencient en ostéoclastes matures qui se fixent à l'os sur ces sites rendus accessibles. Les ostéoclastes activés développent une membrane aux bords repliés présentant des protéines de surface, les intégrines $\alpha_v\beta_3$, qui permettent la fixation de la cellule à des protéines matricielles osseuse. L'ostéoclaste ainsi fortement lié à l'os délimite la zone de scellement par un anneau riche en actine et acquiert une polarisation lui octroyant sa fonction de résorption osseuse (30). Au niveau des circonvolutions de la membrane plissée se développe un appareil lysosomal important. Des pompes à proton vacuolaires et des canaux chlorure (ClC-7) sont intégrés à la membrane au niveau basal. Là, ils vont permettre la libération d'ions du cytoplasme vers l'extérieur, entraînant un changement de son pH. L'acidification qui en résulte va dissoudre la phase minérale de la matrice osseuse exposant la phase organique à l'action de protéases dont les collagénases, les metalloprotéases matricielles

(MMP) et la cathepsine K (Schéma 9)(30,48–50). Il en résulte la formation d'une lacune de résorption aussi appelée lacune de Howship.

Les fragments de collagène qui se retrouvent en concentrations élevées dans la lacune de Howship sont alors endocytés et transportés au sein de l'ostéoclaste dans des vésicules de transport cytotique puis relargués dans le milieu extracellulaire. Une fois la dégradation de l'os effectuée, l'ostéoclaste va entamer une migration. Dans un premier temps il va s'étaler, et le réarrangement de son cytosquelette va permettre de rompre les premières zones de scellement puis d'en créer de nouvelles. Il en résulte une nouvelle polarisation de la cellule qui va alors se contracter et finaliser sa fixation sur une nouvelle zone à résorber (51).

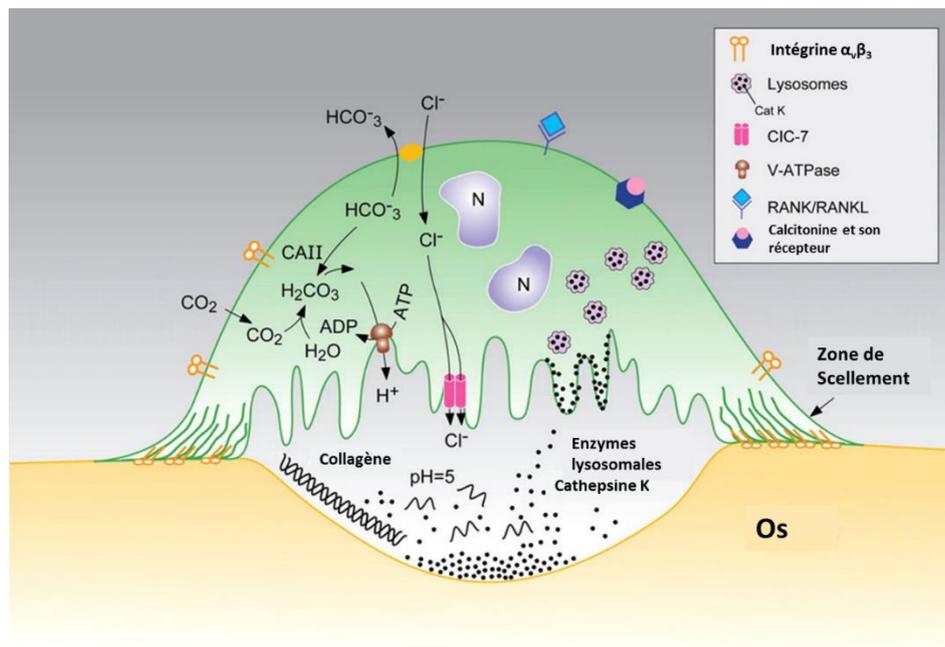


Schéma 9 : La résorption osseuse par l'ostéoclaste (Rodan S. et Duong L. (52))

1.4.2. La phase d'inversion

Entre la résorption et la formation osseuse il y a une période de transition appelée phase d'inversion (ou phase de réversion) durant laquelle les pré-ostéoblastes sont recrutés et se différencient en ostéoblastes matures afin d'assurer la formation d'un os néosynthétisé. Durant cette phase un type de cellules intermédiaires est désigné, les cellules de la phase de réversion (*reversal cells*) (53,54). Ces cellules ont une morphologie qui évolue et passe d'une forme allongée lorsqu'elles sont proches des ostéoclastes à une forme cuboïde lorsqu'elles se retrouvent au voisinage des ostéoblastes. Il a été montré qu'il s'agit de précurseurs des ostéoblastes qui vont à terme se différencier en ostéoblastes. Elles expriment le marqueur ostéoblastique Runx2 et présentent un gradient d'expression d'ostéonectine montrant une évolution vers un profil ostéoblastique (54). Les cellules de la phase d'inversion communiquent à la fois

1.4.4.1. La voie RANK/RANKL/OPG

Le renouvellement osseux est initié par la différenciation des précurseurs ostéoclastiques en ostéoclastes matures qui vont résorber l'os. RANKL, produit par les ostéoblastes, est une cytokine qui appartient à la superfamille des *tumor necrosis factor* et existe sous au moins 3 formes, deux membranaires (RANKL1 et 2) et une soluble (RANKL3) (57). RANKL1 et RANKL2, possèdent un domaine transmembranaire dont la partie active est située sur le domaine extracellulaire et peut être clivée sous l'action de différents ADAM (*A Disintegrin And Metalloproteinase*) et MMP (57). La dernière isoforme RANKL3, soluble, est directement sécrétée dans le milieu extracellulaire (57,59). La possibilité que RANKL soit présent sous forme soluble, que ce soit par l'isoforme RANKL3 ou après clivage des deux autres isoformes, suggère que l'interaction directe entre ostéoblastes et pré-ostéoclastes pourrait ne pas être obligatoire pour la différenciation des ostéoclastes.

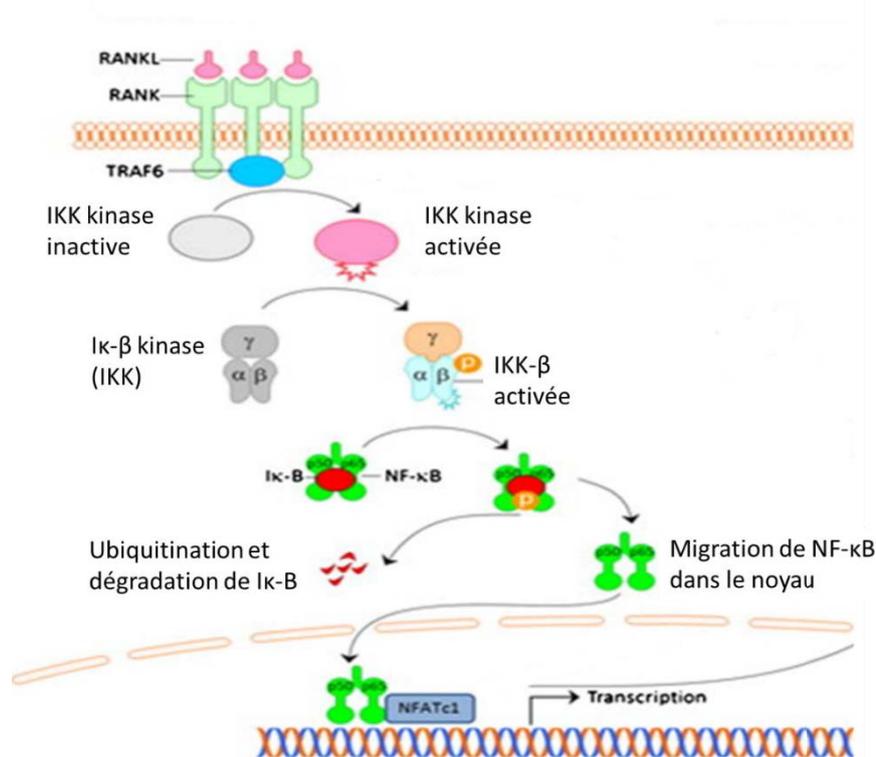


Schéma 11 : La voie de signalisation RANKL dans les ostéoclastes (Kular J. (60))

Il a été montré *in vitro* qu'en présence de M-CSF, l'addition de RANKL soluble dans du milieu de culture était suffisant pour permettre la différenciation et l'activation des ostéoclastes (61). Cependant dans des modèles de cocultures, en l'absence de l'ajout de RANKL exogène, le contact entre les cellules est nécessaire et suffisant pour cette différenciation. Ceci suggère qu'aux concentrations disponibles dans ce modèle la forme soluble de RANKL n'est pas obligatoire pour permettre la différenciation des ostéoclastes bien qu'il ait été montré qu'elle possède la capacité de l'initier (62,63). La stimulation des ostéoclastes et de leurs précurseurs

par M-CSF permet de promouvoir l'expression membranaire de RANK. Ce dernier peut ainsi lier son ligand RANKL ce qui entraîne une cascade de signalisation intracellulaire commençant par la fixation de TRAF6 à la partie intracellulaire du récepteur RANK. Ceci initie la voie NF- κ B permettant la transcription de gènes nécessaires à la différenciation des ostéoclastes, tel NFATc1 (schéma 11) (64,65).

De façon intéressante les ostéoblastes vont également produire un antagoniste à RANKL, l'OPG. La production d'OPG est régulée par la voie de signalisation wnt/ β -caténine (66). C'est la fixation de ligands wnt sur les corécepteurs LRP5 (*Low density lipoprotein receptor-related protein 5*) et Frizzled qui initie la voie de signalisation wnt/ β -caténine. Cela permet la stabilisation et l'accumulation de la β -caténine intracellulaire qui va alors transloquer vers le noyau et permettre la transcription de nombreux gènes dont celui codant l'OPG (Schéma 12)(67).

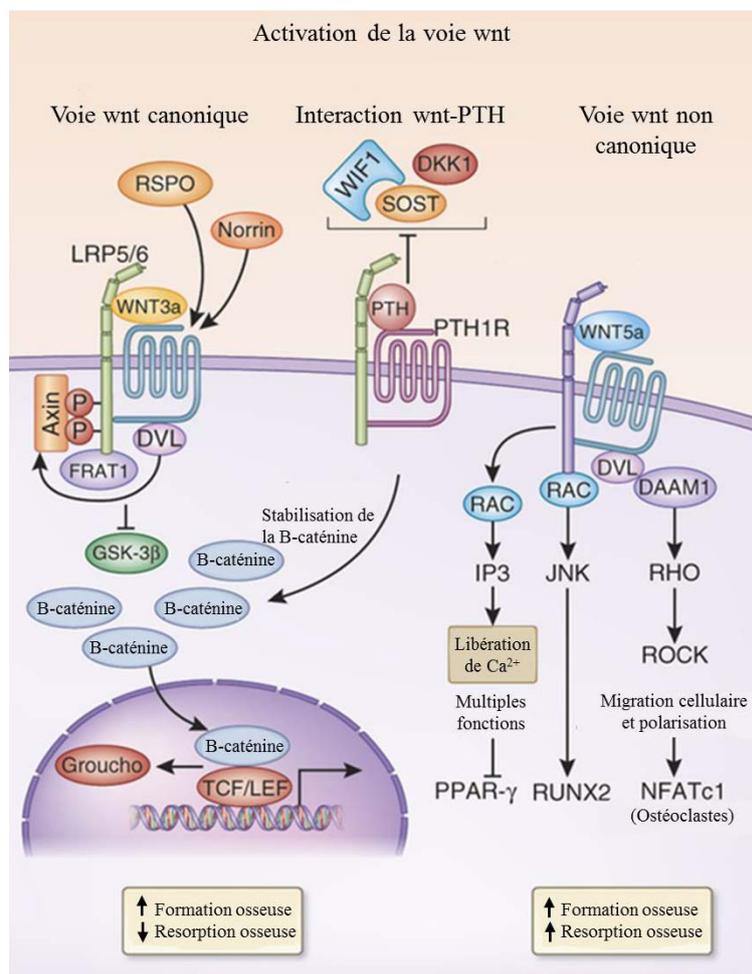


Schéma 12 : La voie de signalisation wnt (*Baron R. et Kneissel M. (67)*)

L'un de ces ligands, wnt16, a été récemment montré comme fortement impliqué dans le contrôle de l'épaisseur de l'os cortical et du risque de fractures non-vertébrales en limitant l'ostéoclastogénèse. Cette protéine produite par les ostéoblastes montre à la fois un effet autocrine en stimulant l'expression d'OPG dans les ostéoblastes et un effet sur la différenciation

des ostéoclastes *via* la signalisation de RANKL en inhibant les premières étapes de la voie de signalisation NF- κ B (Schéma 13) (68).

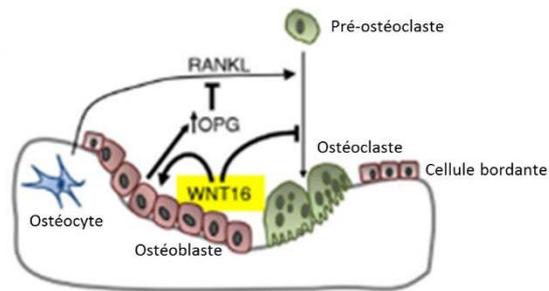


Schéma 13 : La protéine wnt16 dans le remodelage osseux (*Movérare-Skrtic S. et al. (68)*)

L'OPG est une cytokine soluble qui possède 4 domaines récepteurs du TNF qui lui permettent de reconnaître et fixer le ligand RANKL. Ce dernier ne peut alors plus se fixer à son récepteur RANK, ce qui limite la différenciation des ostéoclastes (Schéma 14)(43,46). Du fait de l'implication de RANKL dans l'ostéoclastogénèse et de l'action de l'OPG comme antagoniste, le ratio RANKL/OPG est cliniquement considéré comme un marqueur important de l'homéostasie osseuse, en tant qu'indicateur de l'ostéoclastogénèse et donc de la résorption osseuse. Il peut également être un indicateur de la réparation de fracture (il est alors parfois inversé et l'on parlera du ratio OPG/RANKL) (69–71).

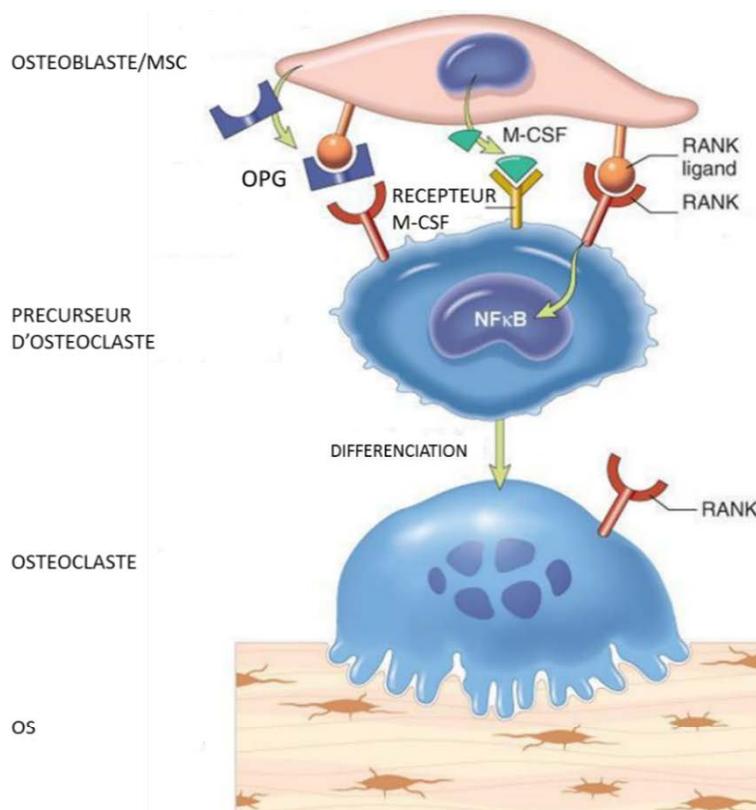


Schéma 14 : Les interactions entre RANK, RANKL et OPG (*Kumar V. et al. (72)*)

D'autres molécules comme les prostaglandines interviennent sur la voie wnt/ β -caténine et impactent la signalisation réalisée par RANKL et RANK.

1.4.4.2. La prostaglandine E2

La prostaglandine E2 (PGE₂) est un lipide abondamment retrouvé dans l'os qui dérive de l'acide arachidonique *via* l'action des prostaglandines G/H synthases 1 et 2, actuellement dénommées cyclooxygénases (COX) du fait de leur fonction première. Le gène *PTGS1* codant la COX-1 est constitutivement exprimé dans les cellules et est peu régulé tandis que le gène *PTGS2* codant la COX-2 est induit de façon rapide et transitoire sous l'action de différents facteurs (73). La PGE₂ est impliquée dans la régulation du remodelage osseux. Elle est connue pour être un facteur favorisant la formation osseuse dans le cas de fractures ou encore *via* le rôle de mécanosenseur des ostéocytes (73). L'action de la PGE₂ sur la formation osseuse est principalement médiée par deux des quatre récepteurs connus pour la PGE₂, EP2R et EP4R. La PGE₂ est capable de promouvoir la formation osseuse *via* la transcription de *RUNX2* et la voie de signalisation wnt/ β -caténine en favorisant la translocation de la β -caténine (74–77). En effet, la PGE₂ entraîne une diminution de production de la sclérostine, un inhibiteur de la formation osseuse qui agit sur la voie wnt/ β -caténine. La PGE₂ est également reconnue pour augmenter la résorption osseuse dans le cadre de l'inflammation (73). Dans ces conditions, la PGE₂ entraîne une diminution de la production d'OPG et une augmentation de l'expression de RANKL (73). De ce fait, l'ostéoclastogénèse est également impactée par l'action de la PGE₂ sur la voie RANK/RANKL/OPG (schéma 15). De façon intéressante, une grande partie des connaissances sur les capacités pro-ostéoclastogènes de la PGE₂ résultent de recherches basées sur des modèles murins. Pourtant chez l'homme il a été décrit que la PGE₂ pouvait être un puissant inhibiteur de la différenciation ostéoclastique et pourrait montrer que la signalisation *via* la PGE₂ est différente chez l'homme et chez la souris (78).

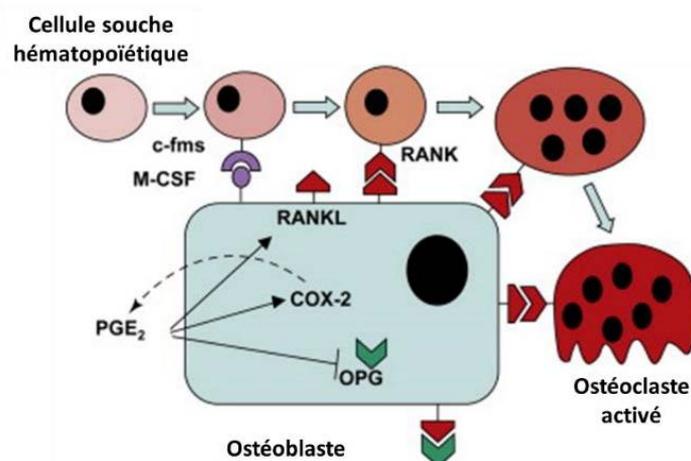


Schéma 15 : L'impact de la PGE₂ sur les interactions RANK/RANKL/OPG (Blackwell KA. *et al.* (73))

La voie des prostaglandines est elle-même soumise à différents moyens de facteurs régulateurs. Ainsi, les micro-ARN, qui ont un rôle important dans le contrôle du remodelage osseux impactent cette voie de signalisation.

1.4.4.3. Les micro-ARN

Les micro-ARN ou miRNA sont des ARN endogènes non codant, d'une taille comprise entre 21 et 23 nucléotides. Ils régulent l'expression post-transcriptionnelle des gènes en se fixant à la partie 3'UTR d'ARN messagers cibles. Il est estimé qu'il existe plus de 2500 miRNA dans le génome humain et qu'ils contrôleraient l'expression de plus de 50% des gènes (79). De nombreux miRNA ont un rôle important dans la régulation du remodelage osseux en ciblant des gènes codant des facteurs de transcription, pouvant ainsi influencer le phénotype osseux. Ils peuvent notamment impacter la différenciation cellulaire des ostéoclastes et ostéoblastes (Schéma 16)(80,81).

Différents miRNA comme le miR-101 et le miR-146a sont notamment impliqués dans la régulation de l'expression de la COX-2 et donc indirectement dans la production de PGE2. La diminution de l'expression de ces miRNA entraîne ainsi une surexpression de la COX-2 et une augmentation du taux de PGE2 (82,83).

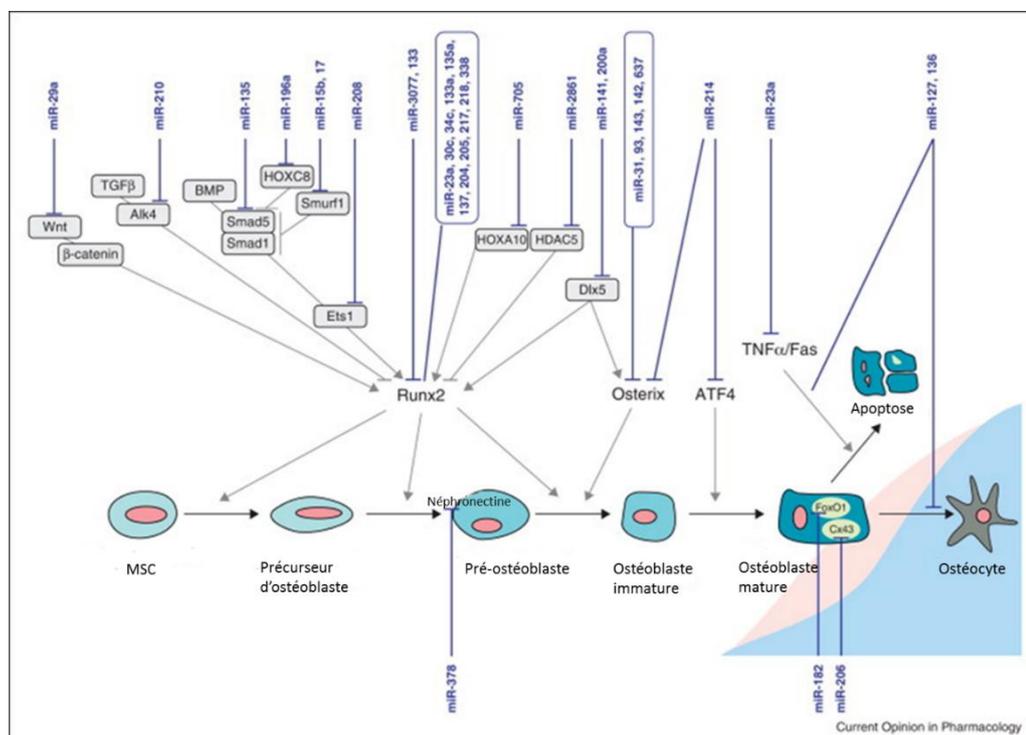


Schéma 16 : L'impact des miRNA dans l'ostéoblastogénèse (Kim KM. et Lim SK. (80))

1.4.4.4. L'hormone parathyroïdienne

La PTH a également un rôle important sur le remodelage osseux. Elle possède à la fois un rôle anabolique en agissant directement sur les ostéoblastes et les ostéocytes et un rôle catabolique en favorisant la résorption osseuse (84). La PTH influence les ostéoblastes en favorisant leur différenciation, leur survie et réactive les cellules de la lignée bordante qui retrouvent un phénotype ostéoblastique (85). L'expression de plusieurs gènes codant des facteurs de la différenciation des ostéoblastes dont Runx2, la phosphatase alcaline ou encore le collagène de type I est stimulée par l'action de la PTH (86,87). La parathormone a une action importante sur la voie wnt. Elle va favoriser son activation en inhibant l'action de la sclérostine (SOST) et de Dickkopf1 (DKK1), mais également en stimulant la production de Smad3 (84,86,88). La PTH entraîne également une augmentation de la résorption osseuse, sans pour autant impacter directement l'activation des ostéoclastes (80). En effet la PTH va moduler l'expression et la synthèse de RANKL et OPG par les ostéoblastes en augmentant le ratio RANKL/OPG et favorisant ainsi l'ostéoclastogénèse et l'activation des ostéoclastes.

1.4.5. Les interactions entre les ostéoclastes et les ostéoblastes

Bien que la résorption osseuse soit la principale action allouée aux ostéoclastes, ces derniers interviennent également dans le processus de formation de l'os en interagissant avec les ostéoblastes. La libération, durant la dégradation de la matrice osseuse, de facteurs de croissance tels que TGF- β et IGF-1, la production par les ostéoclastes de signaux solubles comme BMP-6 (*bone morphogenetic protein*) ou wnt10b (aussi appelés « clastokines ») ou encore les interactions directes entre les ostéoclastes et les pré-ostéoblastes (*via* l'éphrine B2 et son récepteur l'éphrine B4) vont permettre le recrutement et la différenciation des ostéoblastes (89–91). Au contraire la clastokine semaphorine4D inhibe cette différenciation ostéoblastique (92). La sphingosine 1 phosphate (S1P) est également une molécule produite par les ostéoclastes, grâce à l'action de la sphingosine kinase (SPHK1) et permet de stimuler la différenciation et la minéralisation ostéoblastique (93,94). En se fixant sur son récepteur, présent sur les ostéoblastes, la S1P impacte la différenciation des ostéoblastes en activant plusieurs voies de signalisation dont la voie wnt/ β -caténine. Elle agit également sur l'ostéoclastogénèse en favorisant la production de RANKL par les ostéoblastes *via* l'expression de COX-2 et PGE2 (Schéma 17)(93-95).

Toutes ces molécules concourent à réguler la balance ostéoclastes/ostéoblastes au niveau local pour une résorption optimale. Cependant certaines molécules relarguées durant la resorption osseuse peuvent agir beaucoup plus à distance et sur divers organes.

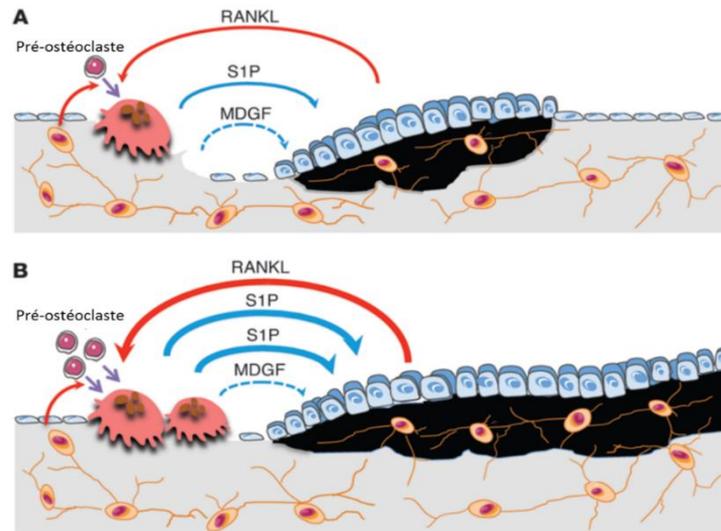


Schéma 17 : La régulation du remodelage osseux par la S1P (Lotinun S. et al. (94))

1.4.6. Libération de facteurs hormonaux lors de la résorption

Bien que considéré comme relativement inerte, l'os a endossé un rôle endocrinien par le biais de l'ostéocalcine (OCN). Cette protéine impacte différents organes, qui en retour ont un impact direct sur le métabolisme osseux *via* la sécrétion de molécules, comme l'insuline par le pancréas. Ils vont, par cette communication, augmenter la résorption osseuse entraînant la libération de l'ostéocalcine. (Schéma 18)(96,97).

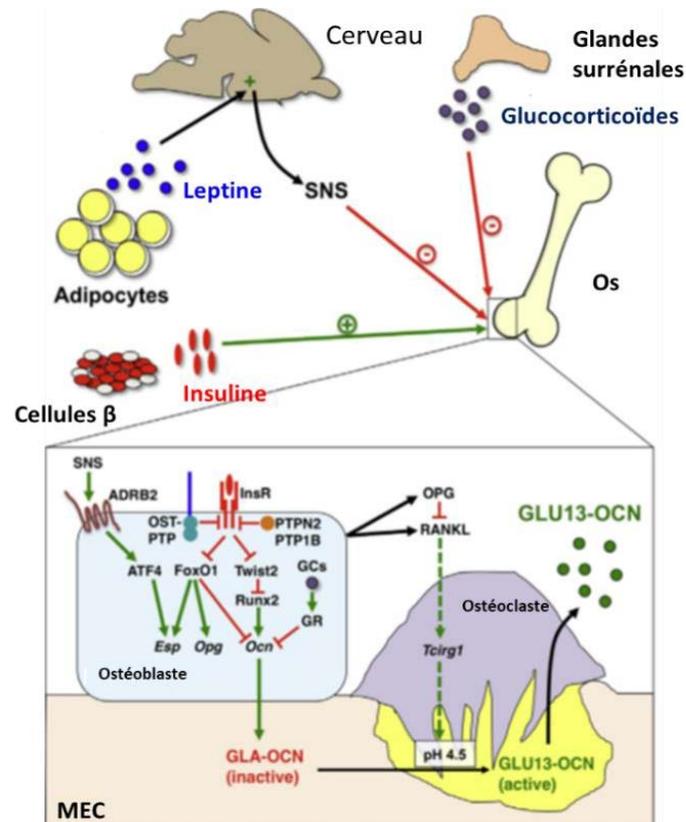


Schéma 18 : L'impact d'autres organes sur la libération d'ostéocalcine (Ferron M. et Lacombe J. (97))

Cette ostéocalcine, protéine spécifiquement sécrétée par les ostéoblastes, est une composante importante de la MEC osseuse. Elle est emprisonnée en son sein sous une forme inactive au moment de la minéralisation. Lors de la résorption osseuse l'ostéocalcine inactive est libérée dans la lacune de résorption où elle subit une décarboxylation sous l'action du pH acide, ce qui lui confère une conformation active. Bien que spécifiquement produite par l'os, l'ostéocalcine est retrouvée dans la circulation générale et devient alors une hormone dérivée des ostéoblastes qui peut se fixer au récepteur Gprc6a présent sur les cellules-β du pancréas (96,98,99). Elle va alors favoriser la prolifération des cellules-β et augmenter l'expression et la sécrétion d'insuline par ces cellules (Schéma 19). En retour, il a été montré chez l'homme et chez la souris qu'un récepteur à l'insuline (InsR) est présent à la surface des ostéoblastes et déclenche une voie de signalisation qui va stimuler la décarboxylation de l'ostéocalcine en favorisant le remodelage osseux, créant ainsi une boucle de régulation entre l'os et le pancréas *via* l'expression de l'ostéocalcine et l'insuline (96,100). De plus chez la souris il a été démontré que la signalisation *via* l'insuline aboutit à une diminution de l'expression du gène *TNFRSF11B* codant l'OPG suggérant une favorisation de l'ostéoclastogénèse, de la résorption osseuse et donc de la libération d'ostéocalcine sous contrôle du pancréas.

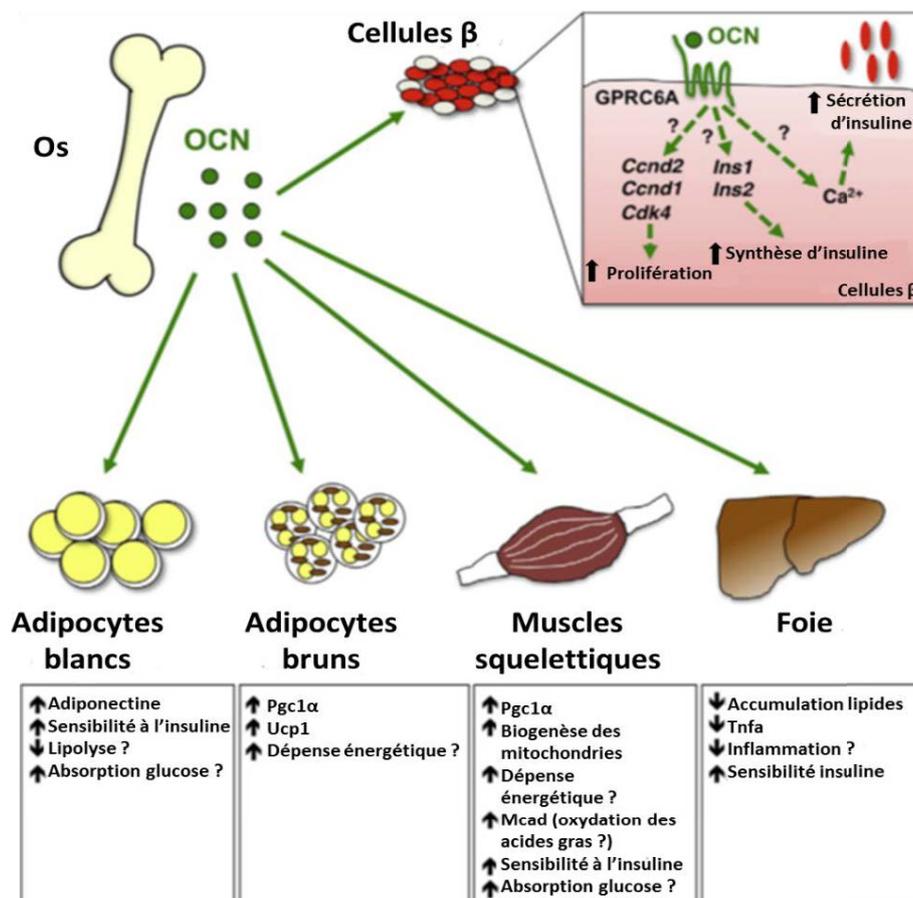


Schéma 19 : Le rôle endocrinien du tissu osseux *via* l'ostéocalcine (Ferron M. et Lacombe J. (97))

Plus récemment une étude *in vitro* sur une lignée de précurseurs ostéoblastiques de souris (les MT3C3-E1) a montré que l'insuline et le glucose, utilisés séparément ou ensemble, augmentaient l'expression du récepteur PTH1R à la PTH, suggérant que ces ostéoblastes deviennent plus sensibles à la PTH et peuvent donc favoriser l'ostéoclastogénèse. Il est notamment décrit qu'un taux élevé de glucose induit une forte production de RANKL (101). De façon intéressante il a été démontré que la voie de signalisation RANKL a un impact sur le développement du diabète sucré de type II en inhibant la prolifération des cellules- β du pancréas (102). Ainsi l'OPG, comme le Dénosumab (un anticorps monoclonal dirigé contre RANKL) vont pouvoir limiter l'action de RANKL et favoriser la prolifération des cellules- β .

L'impact de la signalisation par RANKL sur le diabète a également été observé au niveau hépatique chez la souris. En effet l'inhibition de RANKL entraîne une augmentation de la résistance du foie à l'insuline, impactant ainsi le métabolisme du glucose et prévenant l'apparition du diabète sucré (103).

La boucle de régulation existant entre l'os et le pancréas laisse penser qu'une telle régulation pourrait exister avec d'autres organes dont l'impact sur le métabolisme osseux est connu. L'importance des hormones sexuelles dans le développement osseux est bien documentée et a permis d'envisager l'os comme un candidat probable pour avoir en retour un impact sur la fonctionnalité des organes sexuels. Ainsi dans un modèle de souris déleté pour le gène de l'ostéocalcine, les testicules, vésicules séminales et les épидидymes ont une masse plus faible. Une diminution de 50% dans le compte de spermatozoïdes a également été rapportée (104). De plus il a été montré *ex-vivo* que la production de testostérone par des explants de testicules ou directement par des cellules primaires de Leydig pouvait être modulé par le surnageant de culture d'ostéoblastes. Cependant ce surnageant n'a pas d'impact sur des explants d'ovaire, malgré l'importance des œstrogènes dans la régulation du remodelage osseux (100,105). C'est l'ostéocalcine sous sa forme décarboxylée et qui se retrouve dans la circulation générale qui va stimuler la production de testostérone en se fixant au récepteur Gprc6a.

L'absence de lien entre l'ostéocalcine et la production d'œstrogène laisse penser que la voie hypothalamo-pituitaire classique n'est pas mise en jeu ostéocalcine et testostérone. En effet, l'ostéocalcine n'influence pas la production de l'hormone lutéinisante (LH) mais stimule la production de testostérone en l'absence de LH (90,96,97). Ces observations laissent penser que cette voie de régulation pourrait être indépendante de la voie hypothalamo-pituitaire classique.

Ces données de la littérature semblent dessiner un modèle d'axe de régulation os-pancréas-testicule tel que suggéré par *Oury et al.*, et *Karsenty et Oury* (Schéma 20) (100,104).

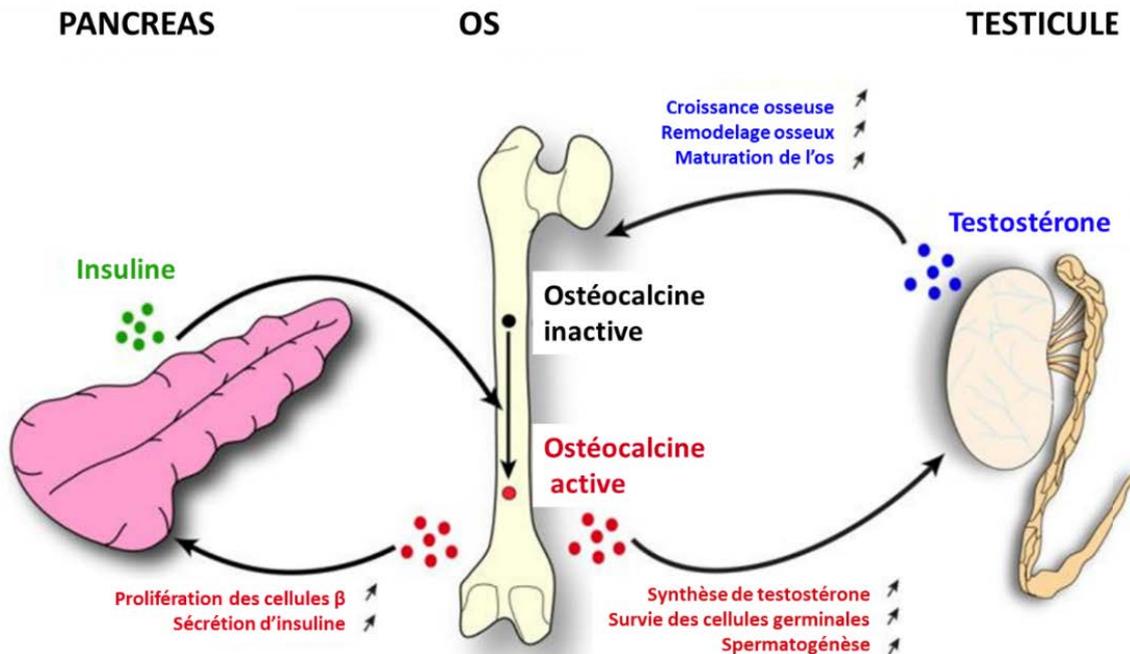


Schéma 20 : L'axe Pancréas-Os-Testicule (Karsenty G. et Oury F. (104))

Bien que l'axe hypothalamo-pituitaire n'ait pas d'impact sur la production d'ostéocalcine, le cerveau est un acteur essentiel pour le maintien de la masse osseuse et de son renouvellement. Il agit soit de façon directe par la sécrétion de neurotransmetteurs qu'il produit, ou indirectement en relayant les signaux reçus par des hormones périphériques, comme la leptine des adipocytes. En retour l'os a également un impact sur le cerveau, et cela dès le stade fœtal. L'ostéocalcine, dans sa forme décarboxylée est capable de passer la barrière hémato-encéphalique et peut se fixer de façon spécifique aux neurones de différentes parties du cerveau dont l'hippocampe (106). L'ostéocalcine va alors entraîner l'expression de gènes nécessaires pour la synthèse de neurotransmetteurs monoamine, tandis qu'elle va inhiber l'expression d'autres comme les gènes codant les enzymes nécessaires à la synthèse de l'acide γ -aminobutyrique (106,107). Le principal effet de la régulation de l'expression de ces neurotransmetteurs concerne les changements d'humeurs, notamment en prévenant l'anxiété et la dépression (106,107). De plus l'ostéocalcine maternelle est importante dans le développement du cerveau du fœtus en diminuant l'apoptose des neurones et favorisant l'apprentissage et la mémorisation chez les nouveau-nés (106). En conséquence il a été montré que des maladies affectant le cerveau pouvaient avoir des effets sur le squelette et inversement.

2. La mucoviscidose

La mucoviscidose (*cystic fibrosis*, CF) est la maladie génétique, récessive héréditaire et létale la plus importante dans les populations caucasiennes. Elle touche environ 70,000 personnes dans le monde (108) dont près de 7000 recensées en France (109). Bien que les principales causes de mortalités soient les déficiences des voies respiratoires et digestives, d'autres systèmes sont impactés dont le système osseux.

2.1. Généralités

Dans de nombreux pays un dépistage néonatal a été mis en place et permet d'identifier entre 95 et 98% des nouveau-nés atteints de mucoviscidose. En France celui-ci a été généralisé sur l'ensemble du territoire (métropole et DOM-COM) en 2002. Il est basé sur le dosage sanguin d'une protéase, la trypsine immuno-réactive, dont la production est anormalement élevée en cas de pathologie pancréatique durant la vie fœtale et les premiers mois après la naissance. Mais ce dosage n'étant pas spécifique de la mucoviscidose il est couplé à une recherche génétique des mutations les plus fréquentes causant la maladie, soit une trentaine d'entre-elles. En cas de dépistage positif le diagnostic est confirmé par le test à la sueur et une évaluation clinique globale.

Le test à la sueur a été décrit pour la première fois en 1959 par les docteurs Gibson et Cook et est basé sur le fait que les patients atteints de mucoviscidose ont une sueur fortement chargée en ion chlorure et sodium. Ce test explique ainsi l'une des premières descriptions historiquement attribuée à la pathologie, datant du moyen-âge, qui rapportait une sueur au goût anormalement salé chez des nouveau-nés. C'est en 1938 que la mucoviscidose est reconnue comme une pathologie à part entière, sur la base d'autopsies révélant des kystes au niveau pancréatique (lui conférant son nom anglais de *Cystic Fibrosis*), une malabsorption des graisses et des protéines ainsi que la présence d'un mucus visqueux et épais à proximité des glandes mucipares lui octroyant le nom alternatif de « *mucoviscidosis* » resté dans la langue française (110).

A ce jour environ 2000 mutations différentes responsables de la mucoviscidose ont été recensées. Elles sont réparties en 6 classes en fonction des conséquences induites sur la synthèse et l'expression d'un canal membranaire anionique : le « *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* » (CFTR) (Schéma 21). Une grande majorité des mutations a une incidence assez faible, les mutations les plus communes représentant environ 96% des patients avec une prévalence variable selon les populations. La mutation la plus fréquente est la mutation

F508del, de classe II, avec environ 85% des patients dans le monde qui porte cette mutation sur au moins un allèle (111).

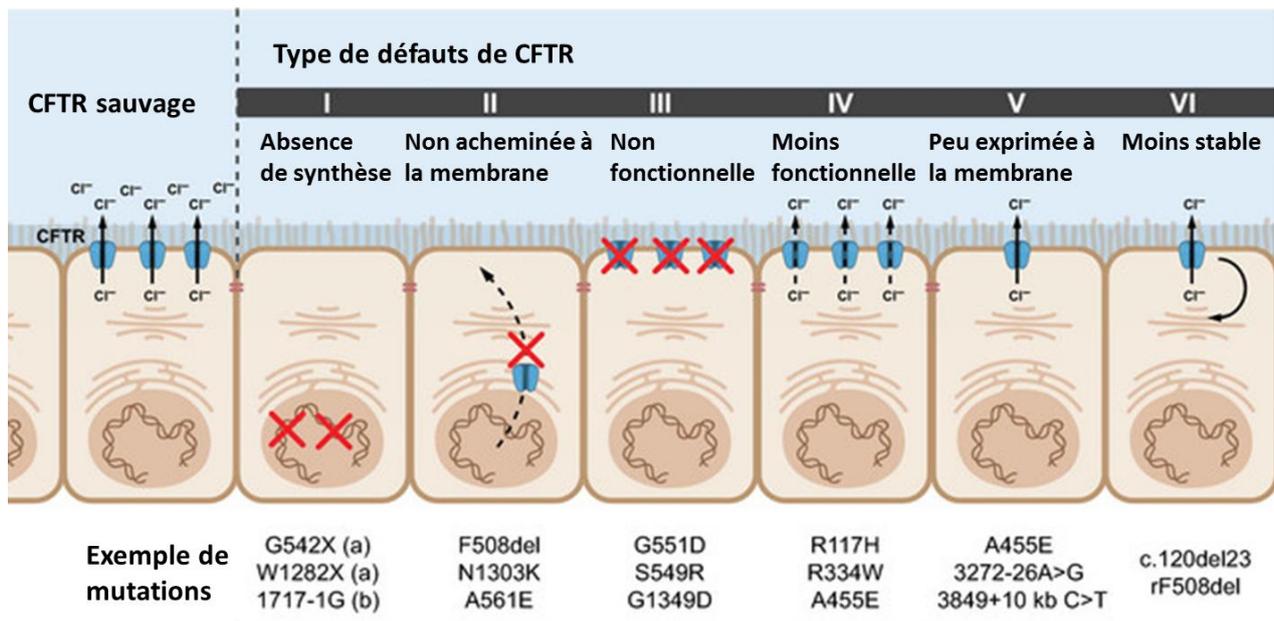


Schéma 21 : Les classes de mutations de CFTR (Amaral MD.111)

2.2. La protéine *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*

La protéine CFTR est exprimée dans de nombreux tissus incluant les poumons, le pancréas, le foie, les intestins, les glandes sudoripares, ou encore le système reproducteur et l'os (112–115). La protéine CFTR appartient à la famille des transporteurs ABC pour *ATP-Binding Cassette*. Bien que la principale fonction décrite de cette protéine soit celle d'un canal chlorure, elle permet également le transport des ions carbonate HCO_3^- et du glutathion (116,117). Ce canal a également été montré comme régulant la fonction d'autres canaux comme celle du canal sodium ENaC (118).

Comme toutes les protéines de la famille des transporteurs ABC, la protéine CFTR possède deux domaines transmembranaires (TMD1 et TMD2), chacun d'eux étant relié à un domaine de fixation de l'ATP (NBD1 et NBD2). Le domaine NBD1 a la particularité d'être relié au domaine TMD2, via un domaine régulateur R, dont la phosphorylation est nécessaire pour l'ouverture du canal (Schéma 22)(119).

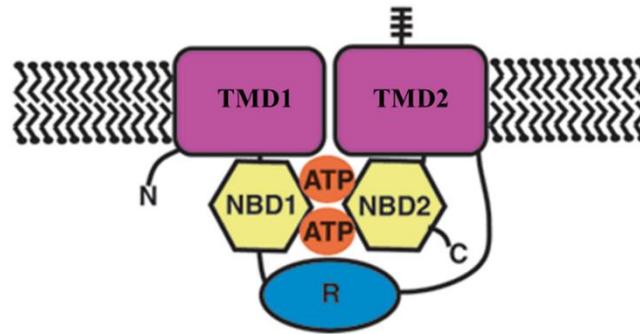


Schéma 22 : La structure de la protéine CFTR (Cyr *DM.* (119))

Trois formes différentes de CFTR ont été identifiées selon leur niveau de glycosylation. La protéine CFTR est initialement synthétisée sous une forme non glycosylée appelée forme A et n'est présente qu'en très faible quantité, ce qui la rend difficilement détectable. La forme B est une forme immature dont la glycosylation est incomplète. Enfin la forme C dite mature correspond à la protéine CFTR dont la glycosylation est totale (120,121). Dans la mucoviscidose, lorsque la protéine porte la mutation F508del, on remarque que la forme C (mature) de la protéine n'est plus détectable et le niveau de forme B est largement diminué (Schéma 23).

En tant que transporteur ABC, le canal CFTR s'ouvre et se referme de façon ATP dépendante. Les deux NBD de CFTR présentent un site de fixation à l'ATP mais des structures et des rôles différents. Contrairement à NBD2, il semble que NBD1 ne soit pas capable d'hydrolyser l'ATP bien que son affinité pour cette molécule soit plus forte.

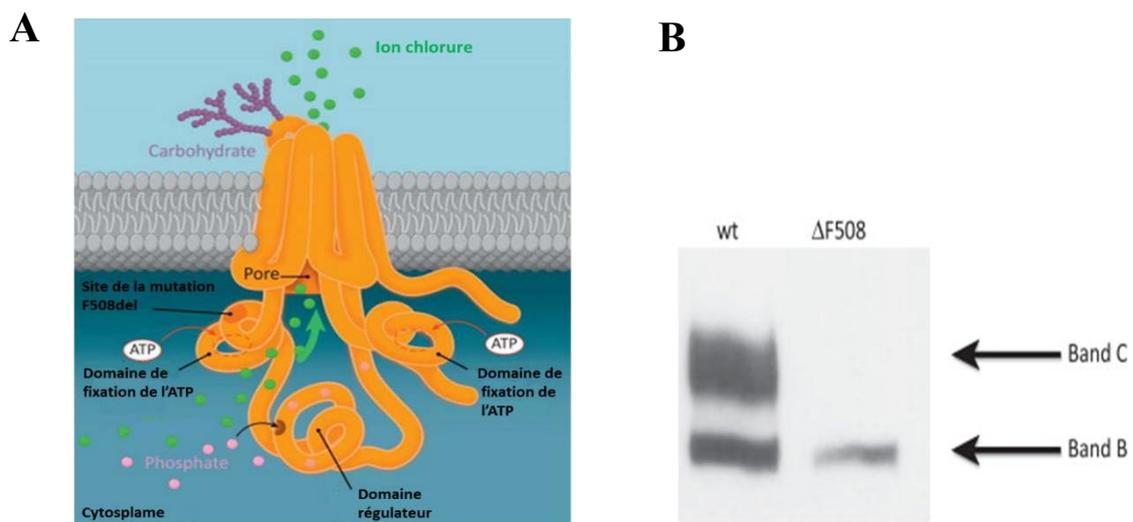


Schéma 23 : La modélisation de CFTR (A) et ses différentes formes détectées par western blot (B) (Hanrahan *JW. et al.* (120))

La fixation d'une molécule d'ATP sur NBD2 entraîne l'ouverture du canal CFTR en initiant la dimérisation des deux NBD. Cette molécule d'ATP est ensuite hydrolysée, entraînant une séparation partielle du dimère NBD, un changement de conformation et donc la fermeture du canal. Il semble que l'ATP fixé au site NBD1 régule le taux de fermeture du canal en stabilisant sa conformation ouverte (Schéma 24)(122–124).

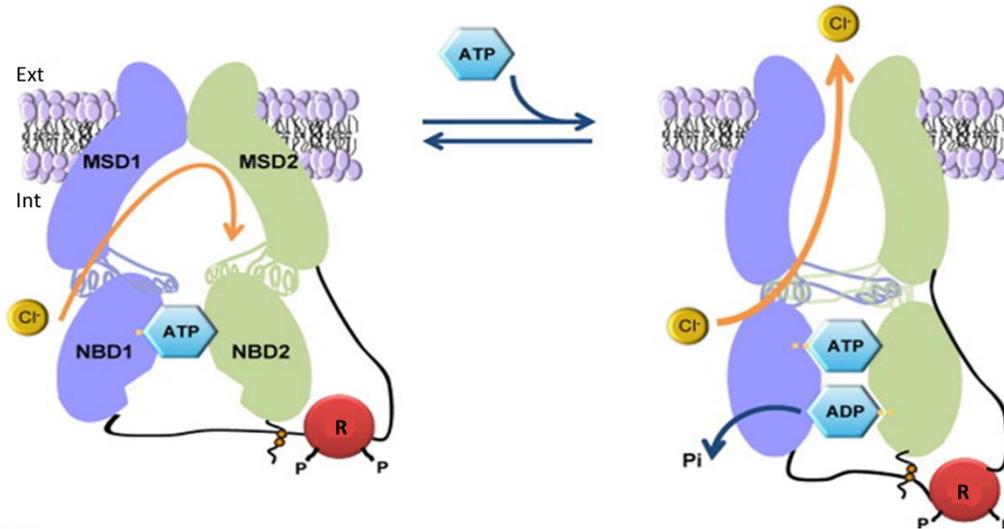


Schéma 24 : L'ouverture et la fermeture du canal CFTR (*Elborn JS. et Vallières E. (123)*)

La mutation F508del résulte en la délétion d'une phénylalanine en position 508 dans le domaine NBD1. Le canal CFTR ainsi muté va être reconnu par la cellule comme mal synthétisé et sera majoritairement retenu dans le réticulum endoplasmique. Une grande partie de CFTR est alors dégradée par le protéasome (124). Une faible fraction de F508del-CFTR est tout de même acheminée à la membrane mais la protéine n'est pas pleinement fonctionnelle et peu stable.

2.3. Physiopathologie

La mucoviscidose est une pathologie qui atteint de nombreux organes. Cependant les atteintes pulmonaires et pancréatiques sont les principaux facteurs de morbidité (Schéma 25).

La mucoviscidose est qualifiée d'exocrinopathie généralisée. L'absence ou la dysfonction de CFTR et les changements ioniques qui en découlent sont en effet responsables de l'acidification et de la déshydratation des fluides sécrétés par l'ensemble des glandes exocrines de l'organisme. Le mucus, originellement première barrière de défense des voies respiratoires, devient épais, stagnant, acide et il favorise les infections récurrentes et le développement d'une inflammation chronique (115,126,127). Cette inflammation, majoritairement à neutrophiles cause des dommages irréversibles au niveau des poumons. En effet l'élastase du neutrophile (EN) libérée par les polynucléaires neutrophiles activés est un important facteur de risques pour le développement de bronchectasies, premier facteur de morbidité de mucoviscidose (128). L'EN

intervient dans la modulation de la réponse inflammatoire, la sécrétion du mucus et l'élimination des bactéries et est également un régulateur de l'activité des canaux CFTR et ENaC (129). L'inflammation chronique des voies respiratoires entraîne l'apparition d'une inflammation systémique par le passage de cytokines pro-inflammatoires des poumons vers la circulation sanguine (130,131).

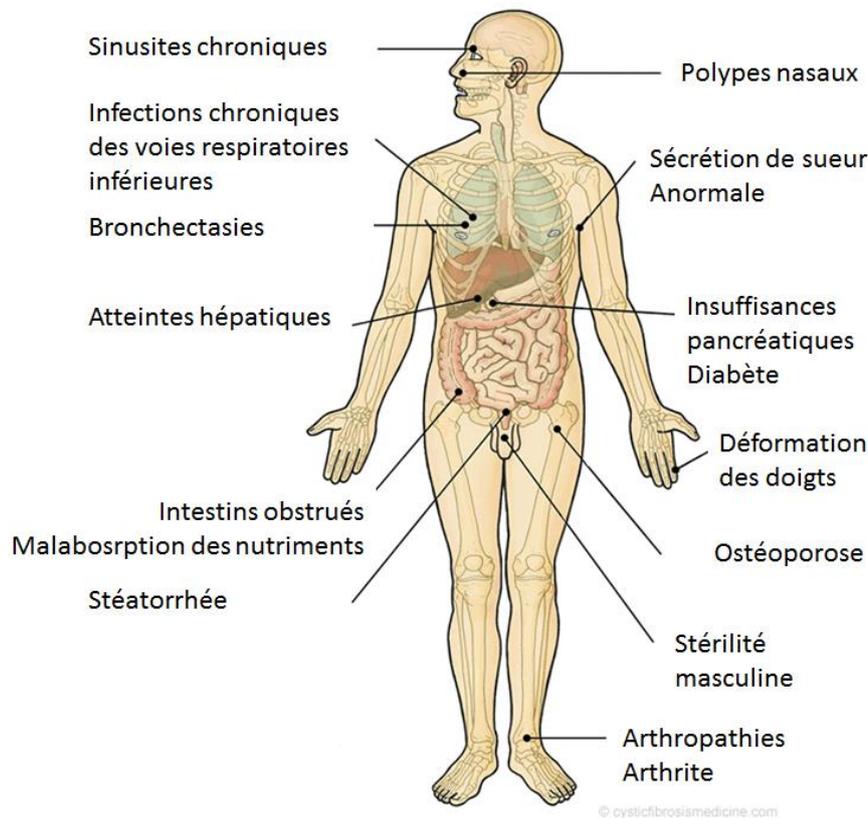


Schéma 25 : Les principaux symptômes de la mucoviscidose (132))

Après les poumons, le pancréas est l'organe le plus touché chez les patients atteints de mucoviscidose. Une grande majorité des patients ont une fonction exocrine pancréatique dysfonctionnelle, voire une insuffisance pancréatique. Les fluides pancréatiques, riches en protéines, vont devenir visqueux et obstruer les conduits en l'absence d'une protéine CFTR fonctionnelle, causant des dommages pancréatiques avec la destruction progressive des cellules β du pancréas. Une déficience de sécrétion de l'insuline et du glucagon induit un diabète chez plus de 50% des patients adultes CF (*CF-related diabetes*, CFRD) (133,134). A noter que ce diabète associé à la mucoviscidose est distinct des diabètes de type I et II bien qu'il partage des caractéristiques avec ceux-ci. C'est l'un des principaux facteurs de comorbidité de la pathologie.

Les intestins sont également touchés par la mutation de CFTR et les symptômes liés apparaissent très tôt dans le développement de la maladie, les obstructions liées à l'accumulation du mucus pouvant déjà être présentes *in utero*. Ainsi l'iléus méconial, corrélé avec la sévérité du génotype du patient, est la manifestation la plus précoce et l'une des plus graves de la pathologie. En effet, cette complication est létale si non traitée (115,135). L'atteinte intestinale entraîne une mauvaise digestion des aliments, une malabsorption des vitamines, des graisses et des nutriments (136,137).

En plus des problèmes respiratoires et digestifs, les patients CF souffrent d'un problème de fertilité, présent chez la grande majorité des hommes atteints de mucoviscidose et près de la moitié des femmes. Chez 99% des patients masculin une azoospermie obstructive est observée, due à l'absence congénitale bilatérale des canaux déférents. Bien que le rôle direct de CFTR dans la fertilité masculine ne soit pas encore bien connu, des études permettent de suggérer qu'au niveau des cellules de Sertoli l'entrée d'ion HCO_3^- médiée par CFTR impacte la spermatogénèse liée à l'hormone folliculo-stimulante par un effet direct sur la capacitation des spermatozoïdes (137,138).

Plus récemment, un autre tissu a été montré pour être directement affecté par la mucoviscidose, l'os. Etant une complication commune de mucoviscidose, il est devenu primordial de comprendre la pathogénie de cette maladie osseuse.

2.4. La pathologie osseuse associée à la mucoviscidose

La mucoviscidose n'est plus aujourd'hui une pathologie qualifiée de pédiatrique, l'espérance de vie des patients ayant largement augmentée lors de ces dernières décennies et plus de la moitié des patients sont des adultes (109,139). Cette amélioration de l'espérance de vie a également révélé l'émergence de nouvelles comorbidités, facteurs importants de mortalité. Parmi celles-ci figure la maladie osseuse associée à la mucoviscidose (*CF-related bone disease*, CFBD) qui est aujourd'hui reconnue comme une complication commune de la pathologie, plus de 50% des patients adultes souffrant d'un phénomène d'ostéopénie ou d'ostéoporose (140,141).

Les principaux signes cliniques d'une atteinte osseuse observés chez les patients adultes ayant la mucoviscidose sont une diminution de la densité minérale osseuse (DMO) et une augmentation des risques de fractures, notamment vertébrales et costales (Schéma 26).



Schéma 26 : Les fractures aiguës et non-soudées chez un patient mucoviscidosique

(Dean CN. et al. (142))

D'abord considérés comme secondaires, liés aux symptômes et traitements de la maladie et non importants d'un point de vue clinique vu la faible espérance de vie des patients, ces phénomènes sont aujourd'hui reconnus comme des facteurs importants de morbidité. Ils peuvent être à l'origine d'une cyphose excessive qui impacte la fonction pulmonaire, rend inefficace la toux et donc la clairance du mucus (143,144). En clinique un indicateur de l'intégrité osseuse est évalué par le T-score et/ou le Z-score qui représentent l'écart standard entre la DMO mesurée chez le patient et celle obtenue chez une population de jeunes adultes dont la densité est sensée être optimale (T-score) ou celle obtenue chez une population du même âge (Z-score). Un T-score est considéré comme normal lorsqu'il est supérieur à -1, s'il est compris entre -1 et -2,5 le T-score révèle une ostéopénie et s'il est inférieur à -2,5 alors il marque un phénomène d'ostéoporose. Chez les patients mucoviscidosiques adultes, la prévalence de l'ostéopénie est de 38% et celle de l'ostéoporose 23,5% (145). D'autres critères cliniques de la maladie tels que le volume expiratoire forcé en 1 seconde (FEV_1), ou l'indice de masse corporelle sont très bien corrélés avec les résultats des Z et T-scores et soulignent l'importance du statut osseux (146,147). Des études récentes portant sur de jeunes patients en insuffisance pancréatique, mais dont les autres signes cliniques, notamment l'atteinte pulmonaire, sont modérés, ont montré que les déficits osseux corticaux et trabéculaires étaient plus marqués chez les filles. Il est également rapporté que cette atteinte osseuse ne peut pas être totalement explicitée par le genre sexuel (148).

Un grand nombre de facteurs liés à la pathologie sont connus pour avoir une influence sur l'intégrité osseuse : l'inflammation chronique, la malabsorption des nutriments et des vitamines, une activité physique faible, l'utilisation fréquente des glucocorticoïdes ou encore le retard observé dans la puberté et donc la sécrétion d'hormones sexuelles indispensable à un bon développement osseux. Longtemps considérés comme à l'origine de la pathologie osseuse des patients CF (141,147,149–151), ces facteurs ne tiennent plus désormais le rôle d'agent causal puisque des études ont montré que la mutation F508del était un facteur de risque indépendant du développement d'une pathologie osseuse (152). Ceci est renforcé par des études cliniques montrant que la pathologie osseuse pouvait apparaître chez de jeunes enfants dont l'âge est inférieur à 6 ans (les plus jeunes ayant à peine 2 ans), avec une atteinte pulmonaire faible donc ni infections ni traitement au long court, et un statut nutritionnel normal. Une ostéopénie est observée chez 28 à 47% des enfants atteints de mucoviscidose et une ostéoporose chez 20 à 34% (153,154). Une étude récente a montré que la microarchitecture de l'os trabéculaire était altérée chez de jeunes patients CF notamment l'organisation en plaques de l'os trabéculaire, avec des plaques moins nombreuses, plus fines et présentant moins d'interconnexions (Schéma 27), attribuant ce défaut à une formation osseuse altérée (155). Cette organisation de l'os trabéculaire est très bien corrélée avec la force et la résistance de l'os, pouvant expliquer pourquoi les patients CF présentent un risque de fracture élevé pour les os riches en os trabéculaire comme les vertèbres et les côtes. Certaines études rapportent un statut osseux normal chez les enfants CF pré-pubères ainsi qu'une fréquence d'apparition de fractures similaire à celle d'une cohorte d'enfants non mucoviscidosiques d'un âge équivalent (156). Ces différences de résultats trouvés entre les études ont plusieurs explications possibles, notamment les techniques utilisées, la pertinence des populations contrôle ou encore la façon dont sont ajustés les résultats, pouvant par exemple prendre en compte la stature, le sexe et le statut pubertaire des patients (153).

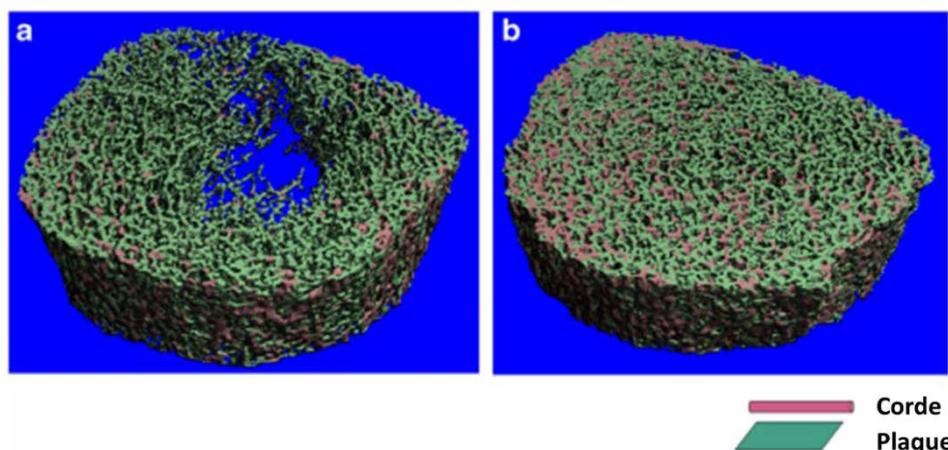


Schéma 27 : La microarchitecture de l'os trabéculaire tibial (*Putman MS. et al. (155)*)

Os trabéculaire de tibia de jeune femme de 28 ans ayant la mucoviscidose (a) ou en bonne santé (b)

Il a été cliniquement établi que la faible DMO observée chez les patients pouvait venir d'un dérèglement du remodelage osseux qui présente une augmentation de la résorption et une diminution de la formation osseuse. De plus il a été montré que ce dérèglement pouvait déjà être présent chez de jeunes enfants, avant l'atteinte de la puberté (69,142,157,158).

2.5. Les traitements du déficit osseux

La prise en charge du déficit osseux des patients CF est devenue essentielle pour leur permettre un développement correct, limiter les douleurs liées à la toux et leur assurer une meilleure qualité de vie.

2.5.1. Les traitements anti-ostéoporotiques

Les traitements les plus utilisés pour lutter contre les phénomènes d'ostéopénie et d'ostéoporose, hors contexte CF, visent à limiter la résorption osseuse en inhibant l'action des ostéoclastes. Les biphosphonates, qui sont des analogues chimiques des pyrophosphates non hydrosolubles, sont ainsi utilisés comme agents anti-résorptifs. Ils agissent sur les ostéoclastes grâce à cette analogie qui leur permet de se fixer à l'hydroxyapatite de la phase minérale osseuse. Selon qu'ils soient de la 1^{ère} ou 2^{nde} génération, ils agissent sur différentes voies de signalisation des ostéoclastes et inhibent leur action, voir mènent à leur apoptose (159). Bien que ces traitements aient montré un effet intéressant sur l'augmentation de la DMO et la qualité de la minéralisation ils sont également montrés pour fortement impacter la formation osseuse (160). En effet l'impact sur les ostéoclastes va avoir un effet indirect sur les ostéoblastes *via* la communication intercellulaire. Le système de contact cellulaire entre ostéoclaste et ostéoblaste est notamment impacté par l'utilisation des biphosphonates et va réduire la différenciation des ostéoblastes (161). De plus, différentes études ont montré que les biphosphonates inhibent l'activité des ostéoblastes (152–164) et limitent l'effet anabolique de la PTH sur le métabolisme osseux (165,166). En plus de cet effet sur la formation osseuse, l'utilisation de biphosphonates a, comme tout traitement, des effets secondaires, mais qui sont considérés comme négligeables aux vues des bénéfices apportés. Néanmoins, dans de rares cas l'utilisation de biphosphonates a été à l'origine d'une ostéonécrose de la mâchoire non réversible (167,168).

Un autre agent anti-résorptif utilisé est le Dénosumab. C'est un anticorps qui va mimer l'action d'OPG et se fixer à RANKL pour inhiber son interaction avec RANK et ainsi limiter la différenciation, l'activation et la survie des ostéoclastes. C'est un anti-résorptif puissant, fréquemment utilisé, et dont les effets indésirables sont moindres par rapport aux

biphosphonates (169). Il induit toutefois des cas d'hypocalcémie et des cas rares d'ostéonécrose de la mâchoire ont également été rapportés suite à son utilisation (170). Enfin comme tout agent anti-résorptif il va également limiter la formation osseuse (171). Plus récemment un autre type de traitement a été autorisé pour le traitement des phénomènes ostéoporotiques et la régulation des fractures, le tériparatide, dont l'action est anabolique (172,173). Il s'agit d'un fragment de la parathormone humaine (acides aminés 1 à 34) correspondant à sa fraction active. Le tériparatide va agir sur les ostéoblastes de la même façon que la PTH en se fixant sur les récepteurs PTH1R et ainsi favoriser leur prolifération, leur activation et leur survie (174). Cependant la PTH possède également un rôle catabolique par sa capacité à augmenter la production de RANKL et inhiber la production d'OPG (84,175). Cet effet semble être retrouvé lors du traitement au tériparatide, deux études cliniques ayant montré que, durant le traitement, les patients présentaient une augmentation du taux de RANKL sérique ainsi qu'une diminution du taux d'OPG. Ces dérégulations seraient responsables de l'accélération du remodelage osseux observé durant ces traitements (176,177).

2.5.2. Traitement de la pathologie osseuse associée à la mucoviscidose

L'utilisation de biphosphonates est possible chez les patients adultes CF. Elle est considérée lors de fractures non traumatiques, si le Z et/ou le T-score est égale ou inférieur à -2 et qu'il y a des signes cliniques évidents de perte osseuse, si le patient est sous traitement aux glucocorticoïdes supérieur à 3 mois ou encore s'il est dans l'attente d'une greffe et présente un Z et/ou T-score inférieur à -1,5. En amont, si ce n'est déjà fait, la déficience en vitamine D doit être corrigée et la prise de calcium optimisée (147,178). Le traitement aux biphosphonates a montré une amélioration de la DMO chez les patients adultes mais n'a pas permis de montrer d'impact sur l'incidence des fractures (179–181). Chez l'enfant et l'adolescent l'utilisation des biphosphonates n'est pas systématique. La décision d'utiliser ce traitement doit être prise en accord avec un pédiatre spécialisé, notamment à cause des risques d'une utilisation à long terme (178). Cependant, l'efficacité et la relative sûreté d'une utilisation à court terme (inférieure à 3 ans) permettent de traiter les enfants dans l'attente d'une greffe présentant une faible DMO et des fractures osseuses peu traumatiques.

Concernant le tériparatide, il n'existe pour l'heure qu'une seule étude rapportant son utilisation chez quatre patients atteints de mucoviscidose. Un traitement de 2 ans a ainsi permis une nette augmentation de la densité minérale osseuse sans voir l'apparition d'effets secondaires chez trois des patients (182). Le dernier patient a dû arrêter son traitement au tériparatide car il a montré des signes d'intolérance.

Le Dénosumab n'est pas encore utilisé chez les patients mucoviscidosiques mais pourrait représenter une alternative aux biphosphonates.

De nouveaux traitements prometteurs visant à directement corriger le défaut de CFTR sont actuellement développés, certains d'entre eux ayant même déjà reçu une utilisation temporaire d'utilisation.

2.5.3. Les traitements de la mucoviscidose

Jusque très récemment, l'intégralité des traitements proposés aux patients atteints de mucoviscidose consistait à prendre en charge le mieux possible les symptômes causés par la mutation du gène *CFTR* pour améliorer leur qualité de vie et retarder le plus possible la dégradation fatale des organes impactés. Aujourd'hui de nouvelles stratégies sont développées et visent directement à corriger le défaut de CFTR avec, comme finalité, l'obtention d'un traitement curatif plutôt que symptomatique. Trois grandes stratégies existent, la première consiste à prendre pour cible puis à corriger le défaut du gène ou de son transcrit. La seconde stratégie vise à stimuler la fonction d'autres canaux ioniques présents à la membrane afin de contrebalancer le défaut d'activité de CFTR. Une dernière stratégie a pour but de corriger le défaut protéique en permettant l'acheminement de la protéine CFTR à la membrane et/ou sa fonctionnalité afin qu'elle retrouve son rôle de canal anionique (Schéma 28)(183–185). Dans le cadre de cette dernière stratégie plusieurs molécules sont développées dans le but de corriger les différents défauts liés aux classes de mutation de CFTR. Ainsi des molécules potentiatrices permettent une restauration de la fonction de CFTR en favorisant sa conformation ouverte et ciblent les mutations de classe III comme la G551D. Des molécules correctrices sont également synthétisées et ont pour objectif de permettre la synthèse et l'acheminement de la protéine CFTR mutée à la membrane plasmique. L'utilisation combinée de ces deux types de molécules vise à corriger des mutations de classe II, notamment la mutation F508del. Actuellement deux traitements développés par la société Vertex Pharmaceuticals ont reçu une autorisation d'utilisation temporaire en France. Kalydeco[®], dont la substance active est l'Ivacaftor, est recommandé pour les patients dont l'âge est supérieur à 6 ans portant la mutation G551D, et Orkambi[®] qui est une combinaison d'un correcteur et d'un potentiateur (Lumacaftor et Ivacaftor) est recommandé pour les patients âgés de plus de 12 ans et portant la mutation F508del (186). L'utilisation d'Ivacaftor chez les patients adultes portant la mutation G551D permet une amélioration de la FEV₁ de l'ordre de 10,5% chez les patients adultes, et une observation similaire a été faite pour l'utilisation chez les enfants âgée de 6 à 11 ans (187,188). De plus l'utilisation d'Ivacaftor a permis un gain de poids d'environ 3 kg de ces patients ainsi qu'une

diminution de 55% du risque d'exacerbations pulmonaires chez les adultes. Pour les patients portant la mutation F508del, le traitement par Orkambi présente des effets bénéfiques mais plus modestes. Le gain en FEV₁ se situe aux alentours de 4%, l'augmentation de l'IMC est d'environ 1% et on observe une diminution de 30% du nombre d'exacerbations pulmonaires (189).

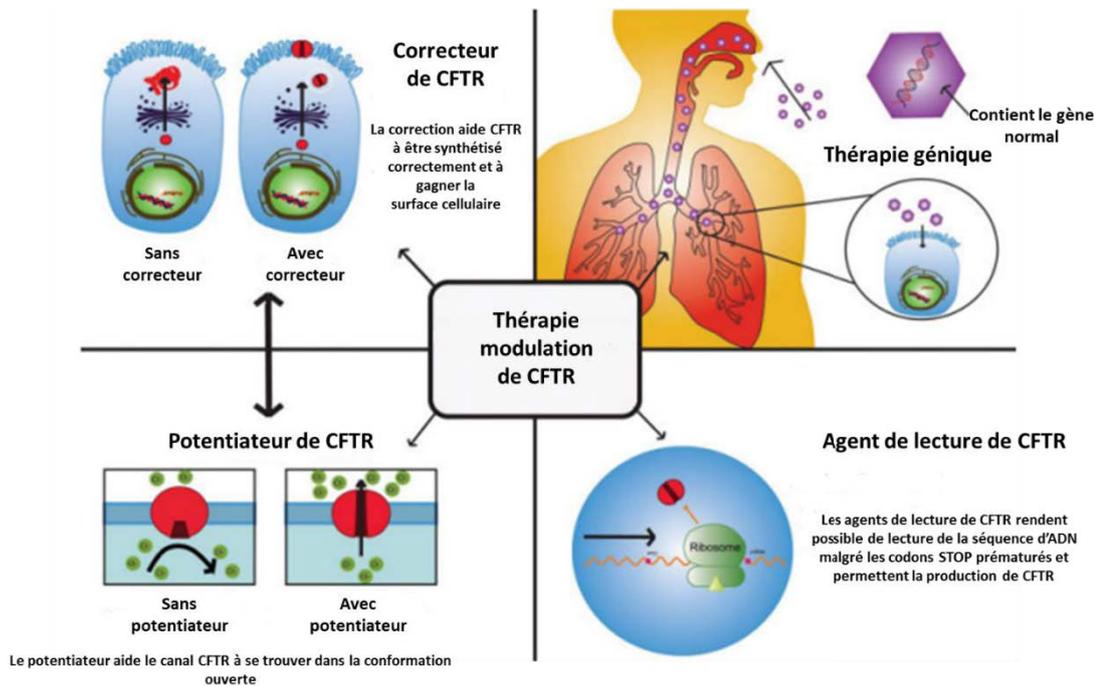


Schéma 28 : Les stratégies de traitement de la mucoviscidose (*Barry PJ. et al. (185)*)

Le défaut osseux dans la mucoviscidose ayant été directement lié à la mutation de CFTR, il semble intéressant d'étudier les effets potentiels que pourraient avoir ces molécules correctrices sur la physiologie osseuse dans le cadre de la pathologie CF.

2.6. Dysfonction de la protéine CFTR dans les cellules osseuses

La fragilité osseuse chez les patients mucoviscidosiques étant un facteur de comorbidité principal, il devient indispensable de pouvoir prendre en charge au mieux cette pathologie. Pour cela il est primordial d'en comprendre les mécanismes afin de développer des stratégies thérapeutiques appropriées. Les premières hypothèses sur cette pathologie, qui se traduit par un phénomène ostéoporotique, étaient qu'elle est étroitement liée à l'inflammation chronique, notamment au moment de phases d'exacerbation durant lesquelles une augmentation du nombre de précurseurs ostéoclastiques est observée dans le sang des patients (158,190). Cependant, la faible présence de marqueurs ostéoclastiques comme dans d'autres pathologies osseuses laisse penser que la perte osseuse associée à la mucoviscidose a une mécanique plus complexe et que

d'autres types cellulaires pourraient être impliqués. L'utilisation de modèle animaux et la réalisation d'études *in vitro* sont donc indispensables pour mieux appréhender cette pathologie.

2.6.1. Etudes *in vitro*

La mise en place de modèles de cultures d'ostéoblastes *in vitro* permet de s'intéresser aux mécanismes cellulaires qui pourraient être dérégulés lorsque le canal CFTR est muté. Dans un premier temps, il a été montré dans les ostéoblastes primaires humains et issus de souris que ces cellules sont bien capables d'exprimer la protéine CFTR. Cependant bien que son expression soit membranaire dans les ostéoblastes matures de souris, l'étude de son expression dans des ostéoblastes primaires humains n'a actuellement permis qu'une mise en évidence cytoplasmique (115,191).

Différentes études se sont focalisées sur l'effet d'une inactivation de CFTR. Soit par délétion du gène, soit par inhibition pharmacologique. Ainsi des ostéoblastes issus de calvaria de souris dont le gène *CFTR* a été déléte ont été isolés et mis en culture. Une diminution de la différenciation de ces ostéoblastes et de la formation osseuse a été observée sur ce modèle cellulaire. Ce même modèle a permis de montrer un ratio RANKL/OPG élevé, notamment dû à une dérégulation de la voie wnt/ β -caténine, ainsi qu'une augmentation de l'ostéoclastogénèse (192). Sur des ostéoblastes primaires humains, l'inhibition pharmacologique de CFTR par un inhibiteur spécifique, CFTR_{inh-172}, montre une diminution importante de la production d'OPG (193).

La mutation F508del-CFTR présente sur les ostéoblastes impacte fortement l'expression de différents gènes spécifiques de la différenciation et la maturation ostéoblastique chez la souris (194). Ainsi une activation importante de la voie NF- κ B et une diminution de la voie de signalisation wnt/ β -caténine ont été montrées dans des ostéoblastes issus de souris F508del (195). Dans un modèle de culture d'ostéoblastes primaires humains issus d'un patient CF hétérozygote et portant les mutations F508del/G542X, il a été montré que l'activité chlorure du canal CFTR était totalement absente et que la production d'OPG était très diminuée en comparaison avec des ostéoblastes primaires normaux, renforçant l'idée d'une dérégulation de la voie wnt/ β -caténine lorsque le canal CFTR est muté (196). Récemment il a été montré que les ostéoblastes, aussi bien humains que murins produisent de la kératine 8, une protéine cytoplasmique rentrant dans la composition des filaments intermédiaires du cytosquelette (197). Dans ce dernier type cellulaire il a été montré que la kératine 8 se fixe de façon préférentielle à la protéine CFTR portant la mutation F508del par rapport à la protéine native. De plus il a été montré qu'en limitant cette interaction, l'acheminement de la protéine F508del-CFTR pouvait

être restauré. La délétion du gène codant la kératine 8 dans des souris sauvages entraîne l'apparition d'un phénomène d'ostéopénie lié à une diminution de plusieurs gènes de la différenciation ostéoblastique. De façon intéressante et opposée, la délétion du gène codant la kératine 8 dans un modèle murin F508del-CFTR homozygote corrige l'expression de gènes d'expression de différenciation, améliore l'activité de formation et limite la perte osseuse. Son effet est lié à une régulation indirecte des voies NF- κ B et wnt/ β -caténine (197).

2.6.2. Les modèles animaux

Le développement de modèles animaux, notamment murins est très intéressant dans l'étude de la CFBD. En effet ces modèles, dont le gène *CFTR* a été invalidé ou a subi la mutation F508del, ne présentent pas certains symptômes cliniques présents chez l'homme tels que l'atteinte pulmonaire et la malnutrition. Cette particularité permet donc d'étudier l'atteinte osseuse en écartant l'impact d'autres complications de la pathologie (198). Ces modèles révèlent une atteinte osseuse importante avec une quantité d'os et une DMO plus faible, se traduisant par des phénomènes d'ostéopénie et d'ostéoporose, tant au niveau de l'os trabéculaire avec des travées plus fines, qu'au niveau de l'os cortical. De plus l'étude des biomarqueurs osseux a montré une réduction de la formation et une augmentation de la résorption osseuse dans ces modèles (198–200). Des études basées sur un modèle de souris homozygote pour la mutation F508del ont montré une diminution de la formation osseuse et du taux de minéralisation, ainsi qu'une altération importante de la microarchitecture osseuse chez ces animaux (194).

Dans un modèle de souris F508del, l'utilisation d'un correcteur de CFTR, le miglustat, qui est déjà autorisé pour le traitement d'autres pathologies comme la maladie de Gaucher, a été testé et a permis une restauration de la masse, la formation et l'architecture osseuse de ces souris (201). Ces résultats nous suggèrent que l'utilisation de potentiateurs et correcteurs de CFTR pourrait être une stratégie thérapeutique envisageable dans le cadre de la pathologie osseuse associée à la mucoviscidose.

OBJECTIFS

Une meilleure prise en charge du statut nutritionnel et le développement de stratégies thérapeutiques pour diminuer les symptômes de la mucoviscidose ont permis une amélioration du statut clinique et une augmentation importante de l'espérance de vie des patients. Parmi ces avancées, l'optimisation de la supplémentation en calcium et en vitamine D, un meilleur traitement des atteintes respiratoires ou encore une amélioration du statut nutritionnel sont autant de directives retrouvées dans les recommandations destinées au traitement des patients atteints de mucoviscidose et qui peuvent avoir un impact sur le métabolisme osseux. Cependant malgré ces évolutions positives, des études ont montré que la DMO des patients ne montre aucune amélioration significative (202).

Bien que la perte osseuse chez les patients soit bien corrélée avec les phases d'inflammation et d'exacerbation pulmonaire, l'observation de la CFBD chez de jeunes enfants, avec une atteinte pulmonaire modérée et un statut nutritionnel correct laisse penser qu'il existe une prédisposition à une fragilité osseuse liée à la mutation de CFTR. Cependant les mécanismes cellulaires impliqués dans le dérèglement du remodelage osseux ne sont pas encore bien connus et nécessitent de plus profondes investigations afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Dans l'objectif de répondre à cette question, nous nous sommes demandés dans quelle mesure la mutation du canal CFTR pouvait avoir une implication dans la pathologie osseuse associée à la mucoviscidose en impactant la fonctionnalité des ostéoblastes.

Ainsi mon travail de thèse a reposé sur deux objectifs principaux :

- 1) Dans un premier temps mon travail a consisté à étudier l'impact de la mutation F508del sur l'expression de gènes dans des ostéoblastes primaires humains issus de patients ayant la mucoviscidose, les études cliniques ayant montré que la formation osseuse était fortement impactée dans la pathologie osseuse. Nous avons alors évalué dans quelle mesure la différenciation, la maturation et la fonction des ostéoblastes étaient impactées par la mutation de CFTR. Nous avons également testé l'efficacité d'un correcteur et potentiateur de CFTR, C18 (encore appelé VRT534), qui est un analogue de Vx-809 et vise à corriger la mutation F508del de CFTR, sur la restauration de l'expression de gènes ostéoblastiques.

- 2) Nous avons poursuivi nos investigations en évaluant la synthèse de protéines appartenant à des voies de signalisation ostéoblastiques. Nous nous sommes particulièrement intéressés à la production des cytokines RANKL et OPG et à leur ratio, facteur clé du remodelage osseux. Nous avons complété cette approche en étudiant l'impact que peuvent avoir des correcteurs et potentiateurs de CFTR dans la restauration de la synthèse de ces protéines. Les correcteurs Vx-770 et Vx-809, connus sous les noms d'Ivacftor et Lumacaftor respectivement ont reçu une autorisation de commercialisation de la Food and Drug Administration aux Etats-Unis et une autorisation temporaire d'utilisation en France sous une formulation combinée (Orkambi[®]) pour les patients porteurs de la mutation F508del. Nous avons donc testé leur efficacité *in vitro* sur la restauration de la fonctionnalité des ostéoblastes mutés.

RESULTATS

1^{ère} partie :

Mucoviscidose et pathologie osseuse : défaut de maturation des ostéoblastes portant la mutation F508del sur la protéine Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator

Une faible densité minérale osseuse et un risque de fractures élevé sont communément observés chez les patients atteints de mucoviscidose et peuvent affecter de très jeunes enfants. Les fractures des côtes et des vertèbres thoraciques peuvent aggraver la détérioration des voies respiratoires en impactant la clairance du mucus. Le mécanisme de la perte osseuse précoce chez les patients mucoviscidosique est multifactoriel. Les déficiences en vitamine D et calcium, les infections pulmonaires chroniques, le retard de puberté et l'utilisation fréquente de glucocorticoïdes chez les patients atteints de mucoviscidose peuvent tous compromettre la santé osseuse. Cependant les mécanismes responsables de la maladie osseuse associée à la mucoviscidose sont toujours inconnus. Le phénomène d'ostéoporose observé chez les patients a surtout été attribué à un excès de résorption osseuse dû aux infections et inflammations chroniques du patient. Cependant l'hypothèse que les ostéoclastes soient les seules cellules impliquées dans ce phénomène est controversée, et l'efficacité modeste d'inhibiteurs de la résorption osseuse comme les biphosphonates suggère que d'autres types cellulaires comme les ostéoblastes peuvent être impactés par la mutation de *CFTR*.

Dans la mucoviscidose, la mutation F508del est celle la plus fréquemment retrouvée sur la protéine *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) avec environ 85% des patients qui portent cette mutation sur au moins un allèle. Des études cliniques et portant sur des modèles murins de la mucoviscidose ont montré que la mutation F508del de *CFTR* avait un impact sur la formation osseuse. Cependant l'implication du défaut de CFTR sur l'ostéoblastogénèse reste inconnue.

Le but de cette étude a été d'évaluer dans quelle mesure la mutation F508del présente dans des ostéoblastes pouvaient influencer l'expression de gènes spécifiques de ces cellules au niveau de la différenciation et de la maturation cellulaire. Pour cela nous avons cultivé des ostéoblastes primaires humains normaux et des ostéoblastes humains porteurs de la mutation F508del et nous avons évalué l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la différenciation et la maturation des ostéoblastes par PCR quantitative.

Ces résultats ont été publiés dans *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* en 2014.

CORRESPONDENCE

**Cystic Fibrosis and Bone Disease:
Defective Osteoblast Maturation with
the F508del Mutation in Cystic Fibrosis
Transmembrane Conductance Regulator**



To the Editor:

Low bone density is commonly seen in patients with cystic fibrosis (CF), and begins at a young age (1, 2). Rib and thoracic vertebral fractures can have adverse effects on lung health, as the resulting pain and debilitation can impair airway clearance and kyphosis can worsen lung restriction in patients with CF (3). The mechanism for early bone loss in patients with CF is multifactorial, and, although vitamin D and calcium deficiencies, chronic pulmonary infection, delayed puberty, and frequent use of glucocorticoid drugs can all jeopardize bone health in patients with CF, the pathogenesis of CF-related low bone density is still unknown (4). Osteoporosis has been related to increased bone resorption due to chronic inflammation and infection; however, evidence for the only involvement of osteoclasts (bone-resorptive cells) in CF bone disease is weak. Indeed, serum resorption markers are not consistently elevated, serum osteoclast precursors seem to be increased only in the context of infective exacerbations (5), and that potent inhibitors of bone resorption, as oral bisphosphonates have modest effects in amelioration of bone mass in CF (6). This suggests that other cell types beyond osteoclast lineage, such as the osteoblast (cells that form bone), might be affected.

In CF disease, F508del is the most common CF transmembrane conductance regulator (CFTR) mutation, with more than 90% of patients carrying it on at least one allele. Clinical and CF model studies have reported that F508del mutation in *Cftr* impacts bone formation in humans (7) and mice (8); however, the underlying

molecular defect in CFTR caused by the F508del-CFTR mutation in osteoblastogenesis (i.e., on the osteoblastic bone formation) is unknown. We therefore investigated whether the F508del mutation could affect the expression level of osteoblast genes relative to differentiation (e.g., collagen type 1, osteocalcin, osteopontin, alkaline phosphatase, Runt-related transcription factor 2, osterix) and maturation (bone morphogenetic protein 2, the receptor-activated proteins involved in TGF- β signaling [SMAD1/2], osteoprotegerin [OPG], receptor activator of Nf- κ B ligand [RANKL], cyclooxygenase [COX]-2) in human osteoblasts. F508del osteoblasts were obtained from trabecular bone explants prepared from rib fragments harvested during lung transplantation in three young patients (two females [13 and 15 yr old] and one 14-yr-old male) homozygous for the F508del-CFTR mutation and a young patient (a 14-yr-old male) with the heterozygous F508del/G542X mutation in CFTR. Normal osteoblasts, used as control, were obtained from freshly trabecular bone explants of healthy young adults who underwent trauma surgery. All primary cultures of CF and normal osteoblasts were used at the second–third passage weeks, as we previously described (9). Bone samples were obtained with informed consent of the patient.

Fluorescence data showed the evidence of CFTR-dependent functional chloride conductance in primary normal osteoblasts, which was reduced in F508del osteoblasts, as reported in Figure E1 in the online supplement. Compared with healthy osteoblasts, real-time PCR data showed no significant difference in osteoblast gene expression related to differentiation (collagen type 1, osteocalcin, osteopontin, alkaline phosphatase, Runt-related transcription factor 2, osterix) in F508del osteoblasts. By contrast, a severe, defective maturation of F508del osteoblasts was found in bone explants of the four patients with CF (Figures 1A and 1B). F508del osteoblasts exhibited a diminished expression of SMAD2, COX-2, and, to a lesser extent, OPG mRNA levels, but elevated RANKL mRNA levels compared with normal osteoblasts. Thus, we noted a significant increase in RANKL:OPG expression ratio in F508del osteoblasts, as recently reported in murine calvarial osteoblasts with the *Cftr*-null (10). Furthermore, we found that the basal production of OPG protein and COX-2 metabolite, prostaglandin (PG) E₂, a potent immunomodulatory mediator, was greatly reduced by F508del osteoblasts (Figure 1C).

The OPG expression is mediated through the Wnt/ β -catenin signaling cascade (11), and was found to be involved in the regulation of bone density (12). COX-2 is an enzyme that converts arachidonic acid to PG, such as PGE₂, which is required to mediate the full effects of Wnt/ β -catenin signaling (13). COX-2 activity and PGE₂ have been identified as key mediators in the initial step of osteogenesis and the latter step of osteoblast maturation, supporting the role for COX-2 and PGE₂ in the regulation of skeletal growth and efficient bone fracture healing (14, 15). Both lower PGE₂ and OPG production by F508del osteoblasts support a possible defect in the activation of Wnt/ β -catenin signaling pathway.

Our findings suggest that early bone loss in patients with the F508del mutation may be caused by a reduction in osteoblastic bone formation arising from a diminished OPG and COX-2/PGE₂ expression and production. To date, the main treatment aiming to restore bone formation in patients with CF involves growth hormone, but is highly restricted due to its side effects, and is not studied in postpubertal patients. New treatments that target the F508del mutation through the use of correctors and

Supported in part by French Cystic Fibrosis Association "Vaincre la Mucoviscidose" research grants RF20110600482 and RF20120600625 (J.J.).

Author Contributions: The manuscript was written by F.V. and J.J. The project was designed and supervised by J.J., S.G., and I.S.-G. The collection of bone fragments from patients with cystic fibrosis was supervised by F.B. and I.S.-G. Primary cultures of osteoblasts and biochemical experiments were conducted by F.V., M.D., C.L.H., C.G., and L.T. Iodide efflux assays were performed by O.T. All authors discussed the results and commented on the manuscript. M.D. is a Ph.D. scholarship recipient from the Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche, Paris, France.

This letter has an online supplement, which is accessible from this issue's table of contents at www.atsjournals.org

CORRESPONDENCE

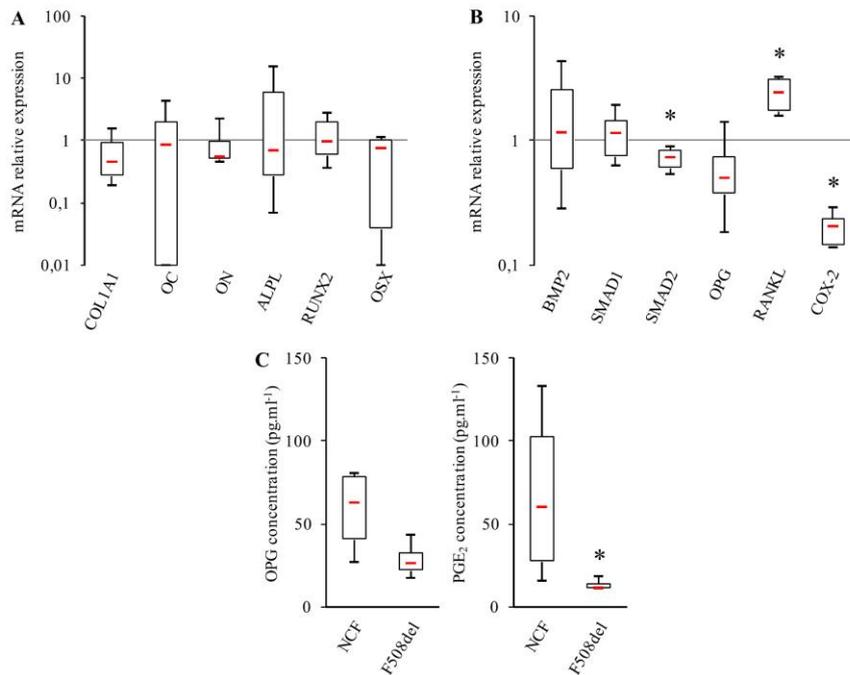


Figure 1. The F508del mutation in cystic fibrosis (CF) transmembrane conductance regulator (*Cfr*) caused no significant difference in differentiation-related genes, but affected maturation-related genes in F508del osteoblasts compared with healthy osteoblasts (non-cystic fibrosis [NCF]). (A) Boxes represent the mRNA relative expression of differentiation-related genes in F508del CFTR osteoblasts compared with NCF osteoblasts. (B) Boxes represent the mRNA relative expression of maturation-mediated genes in F508del CFTR osteoblasts compared with NCF osteoblasts. Real-time PCR data were calculated following the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. (C) Basal production of osteoprotegerin (OPG) protein and cyclooxygenase (COX)-2 metabolite, prostaglandin E₂ (PGE₂), assessed by ELISA in 48-hour supernatants after a 14-day culture confluent period of F508del and NCF osteoblasts ($n = 4$ CF, patients with the F508del mutation in *Cfr*; $n = 4$ NCF, healthy donors). Red bar shows the median value; lower and upper limits of each box show first and third quartile, respectively; and the lower and upper black bars represents first and ninth deciles, respectively. * $P < 0.05$ versus normal osteoblasts. ALPL = alkaline phosphatase; BMP2 = bone morphogenic protein 2; COL1A1 = collagen 1A1; Oc = osteocalcin; ON = osteopontin; OSX = osterix; RANKL = receptor activator of NF- κ B ligand; RUNX2 = Runt-related transcription factor 2; SMAD = receptor-activated protein involved in TGF- β signaling.

potentiators of chloride channels are being developed in the care of CF-related lung pathology (16). The effect of such drugs on both the chloride channels and maturation-related genes of F508del osteoblast, and consequently their effects on new bone formation in patients with CF, needs to be investigated for treatment of CF bone disease. ■

Olivier Tabary, Ph.D.
Inserm U938, Hospital St-Antoine, Bâtiment Kourilsky
Paris, France

Lhoussaine Touqui, Ph.D.
Inserm U874, Unité de Défense Innée et Inflammation, Institut Pasteur
Paris, France

Françoise Barthes, M.D., Ph.D.
Hôpital Européen Georges Pompidou
Paris, France

Isabelle Sermet-Gaudelus, M.D., Ph.D.
Inserm U845, Pôle de Pédiatrie Multidisciplinaire, Hôpital Necker, Université
René Descartes
Paris, France

Author disclosures are available with the text of this letter at www.atsjournals.org.

Acknowledgment: The authors thank all the children who participated in this study. Special thanks go to V. Pezzela, M.D., for her support in the collection of bone explants from patients with CF.

Frédéric Velard, Ph.D.
Martial Delion, Ph.D.
Carole Le Henaff, Ph.D.
Christine Guillaume, Ph.D.
Sophie Gangloff, Pharm.D, Ph.D.
Jacky Jacquot, Ph.D.
EA 4691, BIOS, SFR CAP-Santé (FED 4231), Université Reims Champagne
Ardenne
Reims, France

References

- Sermet-Gaudelus I, Bianchi ML, Garabédian M, Aris RM, Morton A, Hardin DS, Elkin SL, Compston JE, Conway SP, Castanet M, et al. European cystic fibrosis bone mineralisation guidelines. *J Cyst Fibros* 2011;10:S16–S23.

2. Sermet-Gaudelus I, Souberbielle JC, Ruiz JC, Vrielynck S, Heuillon B, Azhar I, Cazenave A, Lawson-Body E, Chedeveergne F, Lenoir G. Low bone mineral density in young children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:951–957.
3. Aris RM, Merkel PA, Bachrach LK, Borowitz DS, Boyle MP, Elkin SL, Guise TA, Hardin DS, Haworth CS, Holick MF, *et al*. Guide to bone health and disease in cystic fibrosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:1888–1896.
4. Haworth CS. Impact of cystic fibrosis on bone health. *Curr Opin Pulm Med* 2010;16:616–622.
5. Shead EF, Haworth CS, Gunn E, Bilton D, Scott MA, Compston JE. Osteoclastogenesis during infective exacerbations in patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:306–311.
6. Conwell LS, Chang AB. Bisphosphonates for osteoporosis in people with cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;4: CD002010.
7. King SJ, Topliss DJ, Kotsimbos T, Nyulasi IB, Bailey M, Ebeling PR, Wilson JW. Reduced bone density in cystic fibrosis: deltaF508 mutation is an independent risk factor. *Eur Respir J* 2005;25:54–61.
8. Le Henaff C, Gimenez A, Haÿ E, Marty C, Marie P, Jacquot J. The F508del mutation in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene impacts bone formation. *Am J Pathol* 2012;180: 2068–2075.
9. Gimenez-Maitre A, Le Henaff C, Norez C, Guillaume C, Ravoninjatovo B, Laurent-Maquin D, Becq F, Jacquot J. Deficit of osteoprotegerin release by osteoblasts from a patient with cystic fibrosis. *Eur Respir J* 2012;39:780–781.
10. Stalvey MS, Clines KL, Havasi V, McKibbin CR, Dunn LK, Chung WJ, Clines GA. Osteoblast CFTR inactivation reduces differentiation and osteoprotegerin expression in a mouse model of cystic fibrosis-related bone disease. *PLoS ONE* 2013;8:e80098.
11. Baron R, Kneissel M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat Med* 2013;19:179–192.
12. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, *et al*. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997;89:309–319.
13. Goessling W, North TE, Loewer S, Lord AM, Lee S, Stoick-Cooper CL, Weidinger G, Puder M, Daley GQ, Moon RT, *et al*. Genetic interaction of PGE2 and Wnt signaling regulates developmental specification of stem cells and regeneration. *Cell* 2009;136: 1136–1147.
14. Blackwell KA, Raisz LG, Pilbeam CC. Prostaglandins in bone: bad cop, good cop? *Trends Endocrinol Metab* 2010;21:294–301.
15. Xie C, Liang B, Xue M, Lin AS, Loisel A, Schwarz EM, Gulberg RE, O'Keefe RJ, Zhang X. Rescue of impaired fracture healing in COX-2^{-/-} mice via activation of prostaglandin E2 receptor subtype 4. *Am J Pathol* 2009;175:772–785.
16. Clancy JP, Jain M. Personalized medicine in cystic fibrosis: dawning of a new era. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;186:593–597.

Copyright © 2014 by the American Thoracic Society

Cystic fibrosis and bone disease: Defective osteoblast maturation with the F508del mutation in *Cftr***FRÉDÉRIC VELARD, MARTIAL DELION, CAROLE LE HENAFF, OLIVIER TABARY, CHRISTINE GUILLAUME, FRANÇOISE BARTHES, LHOUSSEINE TOUQUI, SOPHIE GANGLOFF, ISABELLE SERMET-GAUDELUS AND JACKY JACQUOT.****Online Data Supplement****Figure Legend:**

Figure 1S: The CFTR-dependent chloride transport is lower in (CF) F508del osteoblasts compared to (NCF) normal osteoblasts. (A) Representative traces and (B) quantification of CFTR channel activity assessed with iodide efflux in osteoblasts. The CFTR-dependent chloride transport was assessed in osteoblasts by I-quenching of halide-sensitive YFP-H148Q/I152L protein (Life Technologies). The probe was transfected into the cells and, after 48 h of culturing, conductance was stimulated for CFTR channel activity with a mixture composed of forskolin, 3-isobutyl-1-methylxanthine and apigenin (each component at a concentration of 10 μ M). I⁻ solution (140 mM) was then added, and fluorescence was recorded continuously into a plate reader (400 msec/point, Ft) for a 250 sec-period (base line, F0), as previously described (15). The decrease in the percentage of Ft/F0 represents the increase of CFTR chloride conductance. The specific CFTR inhibitor, CFTR_{inh-172} (10 μ M Inh172, 48 hours) was used to verify that the signal observed was CFTR-mediated. In the presence of Inh172, no decrease of fluorescence level was found in NCF+Inh172 osteoblasts. The initial I⁻ influx rate following the addition of each solution was computed from changes in YFP fluorescence data using non-linear regression and represent the representative traces. (B) For quantitative analysis, slope for fluorescence quenching were performed using a linear regression and correlate to the level of the chloride conductance (I⁻ uptake). The rate of change (Delta fluorescence/time, a.u.) in F508del (n=4, CF) and normal osteoblasts (n=4, NCF) is used for bar graph representation. Results are the mean \pm S.E.M of three independent experiments from primary cultures of each CF patient and healthy subject (***) $p < 0.001$.

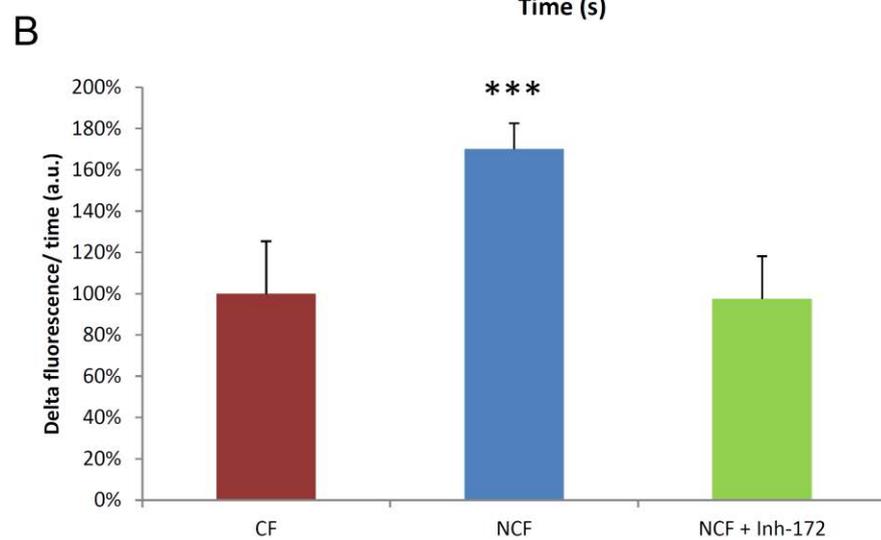
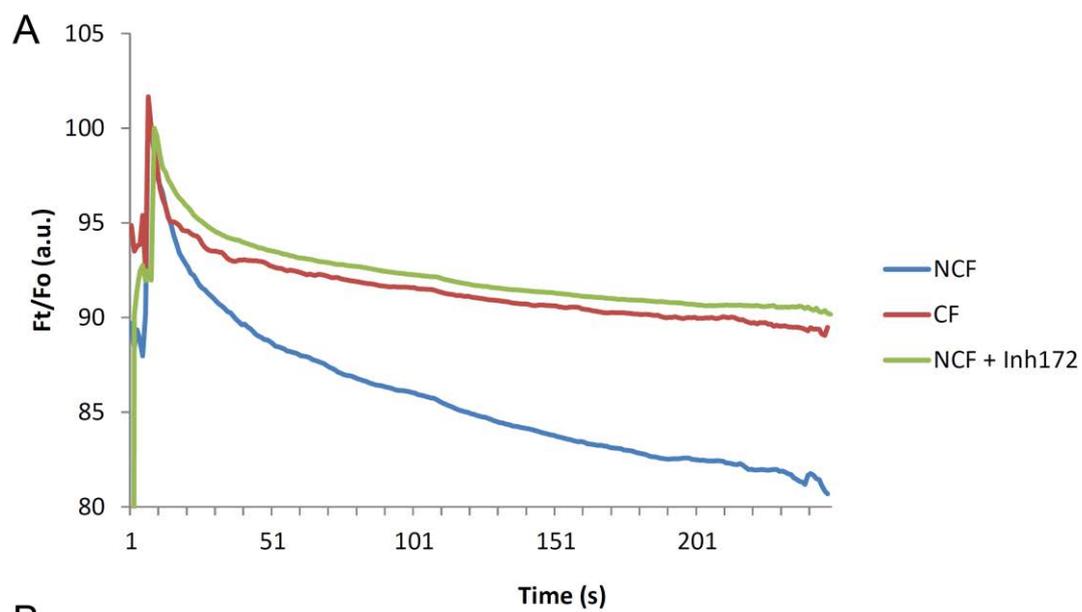


Figure 1S

Les principaux résultats obtenus durant cette étude sont les suivants :

- Les ostéoblastes portant la mutation F508del-CFTR expriment des gènes spécifiques de la différenciation ostéoblastique de façon identique à des cellules non mutées cultivées *in vitro* dans les mêmes conditions.
- La mutation F508del-CFTR entraîne une dérégulation de l'expression de plusieurs gènes de maturation des ostéoblastes, notamment une diminution de l'expression des gènes codants la COX-2 et l'OPG ainsi qu'une augmentation de l'expression du gène codant RANKL.
- Dans les ostéoblastes F508del-CFTR primaires, la production d'OPG et le taux de PGE2, métabolite de la COX-2, sont diminués en comparaison avec des ostéoblastes non mutés.
- L'activité du canal chlorure F508del-CFTR est diminuée en comparaison de l'activité du canal CFTR d'ostéoblastes non mutés.

Les résultats obtenus lors de cette étude montrent que les cellules primaires humaines de la lignée ostéoblastique dont le gène *CFTR* porte la mutation F508del expriment de façon normale plusieurs gènes spécifiques de la différenciation ostéoblastique tandis que l'expression de gènes de maturation est fortement impactée. La dérégulation de l'expression de deux de ces gènes codant pour l'OPG et la COX-2 a pu être confirmée par l'observation de la diminution de la production de la protéine OPG et du métabolite résultant de l'action de l'enzyme COX-2, la PGE2.

La production de l'OPG est médiée par la voie de signalisation wnt/ β -caténine et est fortement impliquée dans la formation osseuse. La COX-2 est une enzyme qui permet la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandines dont fait partie la PGE2. De façon intéressante cette dernière a été montrée comme participant la signalisation *via* la voie wnt/ β -caténine et possède un rôle dans la formation osseuse et la réparation de fractures.

Nos résultats suggèrent ainsi que la perte osseuse précoce des patients atteints de mucoviscidose pourrait être due à une réduction de la formation osseuse par les ostéoblastes portant la F508del sur le canal chlorure CFTR découlant d'une dérégulation de la voie de signalisation de la voie wnt/ β -caténine et se traduisant par une diminution de la production d'OPG et de PGE2.

L'utilisation de correcteurs et potentiateurs de CFTR qui ont été montrés comme efficaces en clinique au niveau pulmonaire pourrait être une stratégie thérapeutique intéressante à évaluer au niveau du métabolisme osseux.

1^{ère} partie :**La maladie osseuse de la mucoviscidose : le correcteur de CFTR, le C18, est-il une thérapie envisageable ?**

Bien que les atteintes respiratoires et hépatiques soient les principaux facteurs de mortalité de la mucoviscidose, l'ostéoporose et le risque de fractures vertébrales et costales liés à la mucoviscidose sont devenus des facteurs de comorbidités importants avec l'augmentation de l'espérance de vie des patients. L'étiologie de la faible densité minérale osseuse est multifactorielle et résulte probablement à la fois d'un défaut de gain osseux durant la puberté et d'une perte osseuse plus importante à l'âge adulte. Cependant de récentes études laissent supposer que le défaut génétique de CFTR, notamment la mutation F508del présente chez près de 80% des patients, pourrait être directement impliqué dans la perte osseuse précoce des patients.

A partir d'explants osseux de côtes de patients portant la mutation F508del nous avons précédemment montré que la mutation F508del présente dans les ostéoblastes conduit à une dérégulation du ratio des ARNm RANKL/OPG et une diminution importante de l'expression de la COX-2 ainsi que de la production d'un de ses métabolites, la PGE2, fortement impliqué dans le remodelage osseux. Par ailleurs une étude clinique a rapporté que le ratio sérique de RANKL/OPG était particulièrement élevé chez des enfants et adolescents atteints de mucoviscidose. De nouveaux traitements qui ciblent la mutation F508del *via* l'utilisation de correcteurs et potentiateurs de CFTR sont développés pour traiter l'atteinte pulmonaire dans la mucoviscidose. Certaines molécules possédant à la fois les activités correctrices et potentiatrices ont montré qu'elles pouvaient partiellement corriger *in vitro* l'expression et l'activité du canal F508del-CFTR à la membrane d'épithélia respiratoires dérivés de patients. Une de ces molécules, le C18 (Vertex Pharmaceuticals, Boston) est capable de se fixer à la protéine F508del-CFTR et favorise sa conformation active après avoir permis sa synthèse (203,204).

Dans cette étude, nous avons étudié l'efficacité que pouvait présenter cette molécule C18 sur la fonctionnalité d'ostéoblastes primaires dérivés de patients atteints de mucoviscidose et portant la mutation F508del. Dans un premier temps nous avons évalué l'effet de cette molécule sur la restauration de l'activité canal chlorure de la protéine F508del-CFTR. Nous avons ensuite analysé si l'addition de C18 pouvait corriger les défauts d'expression de gènes clés du remodelage osseux observés dans des ostéoblastes F508del.

Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une publication dans *European Respiratory Journal* en 2015.

Cystic fibrosis bone disease: is the CFTR corrector C18 an option for therapy?

To the Editor:

Mutations in the gene encoding the chloride ion channel CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) result in cystic fibrosis (CF), the most common lethal autosomal recessive genetic disease, which causes a number of long-term health problems, such as bone disease. Osteoporosis and increased vertebral fracture risk associated with CF disease are becoming more important as the life expectancy of patients continues to improve. The aetiology of low bone density is multifactorial, and is most probably a combination of inadequate peak bone mass during puberty and increased bone loss in adults [1]. Body mass index, male sex, advanced pulmonary disease, malnutrition and chronic therapies are established additional risk factors for CF-related bone disease. In multiple studies with a large cohort of adolescent and adult CF patients, the incidence of osteopenia and osteoporosis ranges from 34% to 79% [1, 2]. This further translated to a 100-fold greater risk of vertebral compression, which can decrease lung function, thus accelerating the course of the disease and decreasing the patient's quality of life.

Emerging data suggest a direct genetic component to the development of CF-related bone disease. F508del is the most common *CFTR* mutation, with >80% of patients being at least heterozygous [3]. We recently

845

discovered a defective CFTR-mediated chloride channel activity and severe deficit of the release of osteoprotegerin (OPG) in primary osteoblasts (cells that form bone) obtained from a 25-year-old CF male with F508del/G542X mutation in *CFTR* [4]. Recent evidence from clinical and CF model studies suggests that loss of functional CFTR not only causes osteoblast dysfunction in bones [5, 6] but also in airway cartilage, which may be important for airway development and dysfunction. Reports have shown that CF mice and pigs, but not epithelial sodium channel-overexpressing mice with CF-like lung disease, show abnormalities in tracheal cartilage development with early airflow obstruction [7–10], suggesting a critical role of CFTR dysfunction independent of deficient ion transport/airway surface liquid depletion. From rib explants harvested during lung transplantation in adolescents with CF, we validated the genetic

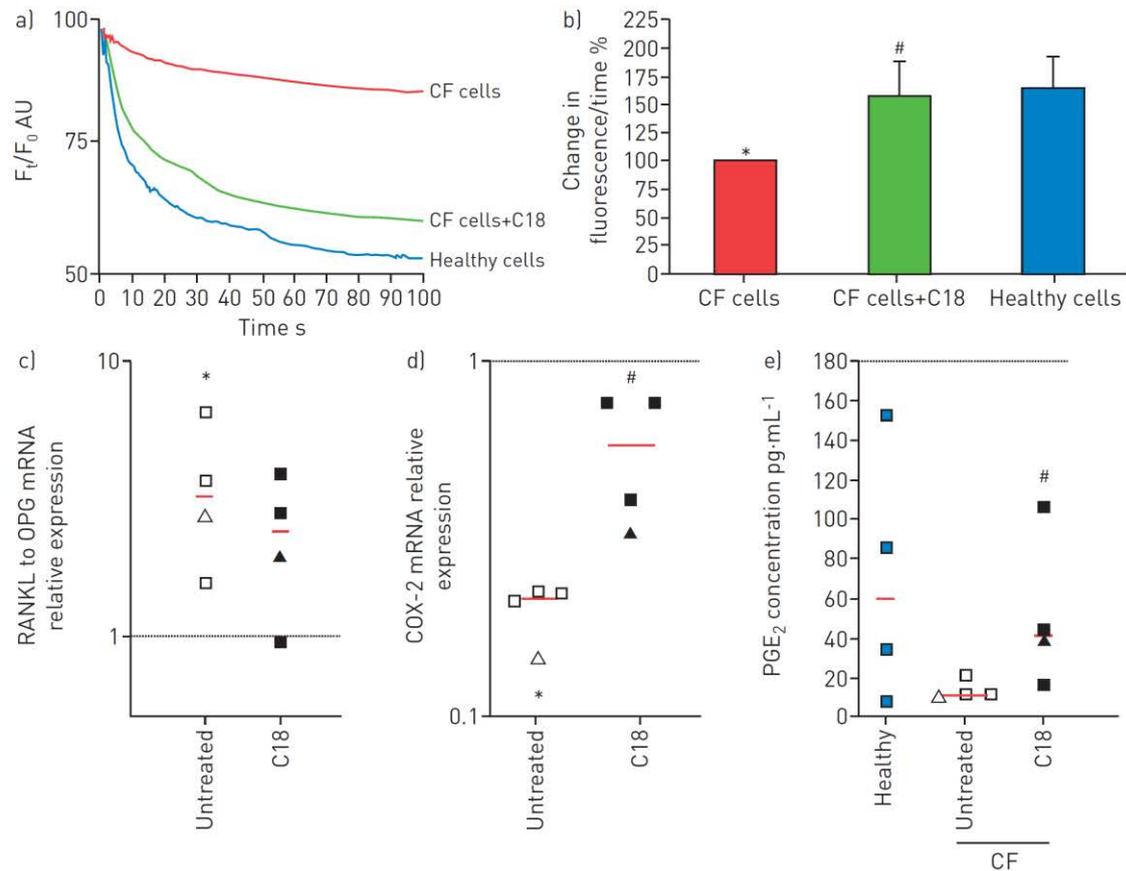


FIGURE 1 The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) corrector C18 restores CFTR-dependent chloride transport in F508del osteoblasts. a) Representative traces and b) quantification of F508del-CFTR channel activity assessed with iodide efflux in F508del osteoblasts (cystic fibrosis (CF) cells pretreated with either 10 μ M C18 or dimethylsulfoxide (DMSO) for 24 h). CFTR-dependent chloride transport was assessed in osteoblasts by iodine quenching of halide-sensitive yellow fluorescent protein (YFP)-H148Q/I152 L protein (Life Technologies, Saint Aubin, France). The probe was transfected into the cells and, after 48 h culture, conductance was stimulated for CFTR channel activity with a mixture composed of forskolin, 3-isobutyl-1-methylxanthine and apigenin (each component at a concentration of 10 μ M). Iodine solution (140 mM) was then added and fluorescence was recorded continuously using a plate reader (400 ms per point; F_t) for a 250-s period (baseline; F_0). The decrease in the percentage of F_t/F_0 represents the increase of CFTR chloride conductance. The specific CFTR inhibitor CFTR_{inh-172} (10 μ M for 24 h) was used to verify that the signal observed was CFTR-mediated in healthy osteoblasts (non-CF), as we previously showed [11]. In the presence of CFTR_{inh-172}, no decrease in fluorescence level was found in healthy osteoblasts+ CFTR_{inh-172} (data not shown) [11]. The initial iodine influx rate following the addition of each solution was computed from changes in YFP fluorescence using nonlinear regression. For quantitative analysis, the slope of fluorescence quenching was calculated using a linear regression and correlated to the level of the chloride conductance (iodine uptake). The rate of change in fluorescence over time in F508del osteoblasts (n=4 CF cells pretreated with either 10 μ M C18 or DMSO for 24 h) is presented in the bar graph. The CFTR corrector C18 ameliorates the RANKL/osteoprotegerin (OPG) mRNA ratio and increases both the cyclo-oxygenase (COX)-2 mRNA expression and prostaglandin (PGE)₂ production in F508del osteoblasts. c) RANKL/OPG mRNA relative expression in F508del osteoblasts compared with healthy osteoblasts, treated or not with C18. d) Relative expression of COX-2 mRNA in F508del osteoblasts compared to healthy osteoblasts, treated or not with C18. e) Basal production of COX-2 metabolite PGE₂ assessed by enzyme immunosorbent assay in 24-h supernatants. All experiments were carried out after a 14-day culture-confluent period in healthy and CF osteoblasts (n=4 healthy donors, n=3 CF patients homozygous for the F508del mutation; n=1 CF patient heterozygous for the F508del mutation in CFTR), treated or not with C18 (10 μ M for 24 h). Real-time PCR data were calculated following the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Each square or triangle represents one donor value; the red bar represents the median value. *: p<0.05 versus healthy osteoblasts; #: p<0.05 versus untreated F508del osteoblasts.

contribution by which F508del mutation in *CFTR* resulted in a severe, defective osteoblast maturation arising from an increased RANKL (RANKL)/OPG mRNA ratio and a drastic reduction in production of the cyclo-oxygenase (COX)-2 metabolite prostaglandin (PGE)₂, a key regulator of bone turnover [11]. Another report also showed an elevated RANKL/OPG ratio in the serum of children and adolescents with CF compared with that observed in healthy controls [2].

New treatments that target the F508del mutation through the use of potentiators and correctors of chloride channels are being developed in the care of CF-related lung pathology. Certain small molecules defined as “dual-acting potentiator–correctors” with both activities have been shown to partially rescue the functional expression of F508del-*CFTR* on the membrane of epithelia in patient-derived airway cultures, providing the rationale for clinical trials of the best compounds, including VX-809 [12, 13]. Recent *in vitro* studies have shed considerable light on the potential mechanism of action of the structurally related compounds VX-809 and C18 (also known as VRT-534), showing these correctors bind to full-length F508del-*CFTR* and enhance the channel-active form of the metastable F508del-*CFTR* protein after its biosynthetic rescue [12]. We therefore tested the effect of the corrector C18 on *CFTR* channel activity, the expression level of RANKL/OPG mRNA ratio and COX-2/PGE₂ expression and production in osteoblasts with the F508del mutation. F508del osteoblasts were obtained from trabecular bone explants prepared from rib fragments harvested during lung transplantation, as previously described [11]. Normal osteoblasts, used as controls, were obtained from fresh trabecular bone explants of healthy young adults who underwent trauma surgery. The bone samples were obtained with informed patient consent after approval by the local research ethics committee.

First, we examined the efficacy of C18 in enhancing F508del-*CFTR* chloride function in primary osteoblast cell cultures obtained from four different adolescents with CF (three young patients: two 13- and 15-year-old females and a 14-year-old male homozygous for the F508del *CFTR* mutation, and a 14-year-old male with the heterozygous F508del/G542X mutation in *CFTR*). C18 was found to greatly enhance F508del-*CFTR* channel function in all F508del osteoblast cultures. The extent of functional rescue caused by C18 treatment was ~85% of the mean *CFTR* function measured in healthy osteoblasts as reported in figure 1a and b. We found a similar functional rescue in F508del osteoblasts when treated with the small molecule VX-809, a structurally related corrector compound in clinical trials (data not shown).

Secondly, real-time PCR showed that F508del osteoblasts treated with C18 have a 34% reduction of RANKL/OPG mRNA ratio compared with untreated F508del osteoblasts in which RANKL/OPG ratio was higher as compared with that found in normal osteoblasts (fig. 1c). Interestingly, we also found that treatment with C18 resulted in a significant increase of COX-2 expression and PGE₂ production in F508del osteoblasts (fig. 1d and e). Prior reports have shown that COX-2 activity and PGE₂ production are required for a full activation of Wnt/β-catenin signalling pathway in osteoblasts that is critically involved in the regulation of skeletal growth and efficient bone fracture healing. Moreover, osteoblast differentiation and maturation of bone marrow stem cells is deficient in the absence of COX-2, and this can be compensated for by the addition of PGE₂ [14].

Clinical trials are underway with the goal of finding new potential treatments that might prevent the development of CF-related bone disease, including antiresorptive agents such as oral bisphosphonates, and anabolic agents such as human recombinant growth hormones and parathyroid hormone [1]. A recent clinical study provides convincing evidence that the oral bisphosphonate alendronate is effective, well tolerated and safe for young patients with CF [15]. However, the use of bisphosphonates in children with CF is controversial because of potential long-term safety concerns including oversuppression of bone formation. The European CF bone mineralisation guidelines recently highlighted controversial issues, such as the use of bisphosphonates and vitamin D supplementation regimens in children and adolescents, indicating the need for other therapeutic trials for treating CF-related skeletal deficits [1]. Thus, there is an urgent need for an efficient and safe antiosteopenic treatment to ameliorate osteoblast activity and, thus, favour the bone formation in patients with CF.

Therefore, the discovery of *CFTR* modulators acting as a “dual” F508del-*CFTR* correctors and potentiators, such as C18, leading to an increase of COX-2/PGE₂ expression and production, and counteracting an elevated RANKL/OPG ratio in osteoblasts with the F508del mutation, represents a step forward in the development of potential new therapies to treat bone disease in patients with CF bearing the F508del mutation.

Frédéric Velard¹, Martial Delion¹, Flora Lemaire¹, Olivier Tabary², Christine Guillaume¹, Françoise Le Pimpec Barthès³, Lhousseine Touqui⁴, Sophie Gangloff¹, Isabelle Sermet-Gaudelus⁵ and Jacky Jacquot¹

¹EA 4691 «Biomatériaux et Inflammation en site osseux», SFR CAP-Santé (FED 4231), Université Reims Champagne-Ardenne, Reims, France. ²Inserm U938, Hospital St-Antoine, Paris, France. ³Département de Chirurgie Thoracique, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France. ⁴Inserm U874, Unité de Défense Innée et Inflammation, Institut Pasteur, Paris, France. ⁵Unité de Pneumo-Pédiatrie Allergologie, Hôpital Necker, Inserm U1551, Université Paris Sorbonne, Paris, France.

Correspondence: Jacky Jacquot, EA 4691, BIOS, SFR CAP-Santé (FED 4231), Université Reims Champagne Ardenne, 1, Avenue du Maréchal Juin, 51095, Reims, France. E-mail: jacky.jacquot@inserm.fr

Received: June 26 2014 | Accepted after revision: Oct 27 2014 | First published online: Nov 27 2014

Support statement: This study was supported, in part, by funds from the French Cystic Fibrosis Association Vaincre la Mucoviscidose (grant RF20120600625 to J. Jacquot). M. Delion is a PhD scholarship recipient from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, Paris, France. C18 was provided by Vertex Pharmaceuticals.

Conflict of interest: None declared.

Acknowledgements: The authors thank all children who participated in this study. We also acknowledge the provision of CFTR corrector VRT-534/C18 by Vertex Pharmaceuticals (Boston, MA, USA).

References

- 1 Sermet-Gaudelus I, Bianchi ML, Garabedian M, *et al.* European cystic fibrosis bone mineralisation guidelines. *J Cyst Fibros* 2011; 10: Suppl. 2, S16–S23.
- 2 Ambroszkiewicz J, Sands D, Gajewska J, *et al.* Bone turnover markers, osteoprotegerin and RANKL cytokines in children with cystic fibrosis. *Adv Med Sci* 2013; 58: 338–343.
- 3 Castellani C, Cuppens H, Macek M Jr, *et al.* Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros* 2008; 7: 179–196.
- 4 Gimenez-Maitre A, Le Henaff C, Norez C, *et al.* Deficit of osteoprotegerin release by osteoblasts from a patient with cystic fibrosis. *Eur Respir J* 2012; 39: 780–781.
- 5 King SJ, Topliss DJ, Kotsimbos T, *et al.* Reduced bone density in cystic fibrosis: ΔF508 mutation is an independent risk factor. *Eur Respir J* 2005; 25: 54–61.
- 6 Le Henaff C, Hay E, Velard F, *et al.* Enhanced F508del-CFTR channel activity ameliorates bone pathology in murine cystic fibrosis. *Am J Pathol* 2014; 184: 1132–1141.
- 7 Bonora M, Riffault L, Marie S, *et al.* Morphological analysis of the trachea and pattern of breathing in βENaC-Tg mice. *Respir Physiol Neurobiol* 2011; 178: 346–348.
- 8 Bonvin E, Le Rouzic P, Bernaudin JF, *et al.* Congenital tracheal malformation in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-deficient mice. *J Physiol* 2008; 586: 3231–3243.
- 9 Meyerholz DK, Stoltz DA, Namati E, *et al.* Loss of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function produces abnormalities in tracheal development in neonatal pigs and young children. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 182: 1251–1261.
- 10 Adam RJ, Michalski AS, Bauer C, *et al.* Air trapping and airflow obstruction in newborn cystic fibrosis piglets. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; 188: 1434–1441.
- 11 Velard F, Delion M, Le Henaff C, *et al.* Cystic fibrosis and bone disease: defective osteoblast maturation with the F508del mutation in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Am J Respir Crit Care Med* 2014; 189: 746–748.
- 12 Eckford PD, Ramjeesingh M, Molinski S, *et al.* VX-809 and related corrector compounds exhibit secondary activity stabilizing active F508del-CFTR after its partial rescue to the cell surface. *Chem Biol* 2014; 21: 666–678.
- 13 Van Goor F, Hadida S, Grootenhuys PD, *et al.* Correction of the F508del-CFTR protein processing defect in vitro by the investigational drug VX-809. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 18843–18848.
- 14 Blackwell KA, Raisz LG, Pilbeam CC. Prostaglandins in bone: bad cop, good cop? *Trends Endocrinol Metab* 2010; 21: 294–301.
- 15 Bianchi ML, Colombo C, Assael BM, *et al.* Treatment of low bone density in young people with cystic fibrosis: a multicentre, prospective, open-label observational study of calcium and calcifediol followed by a randomised placebo-controlled trial of alendronate. *Lancet Respir Med* 2013; 1: 377–385.

Les principaux résultats obtenus dans cette seconde étude sont les suivants :

- L'ajout du correcteur et potentiateur C18 dans le milieu de culture des ostéoblastes F508del permet de retrouver une fonctionnalité de canal chlorure importante, correspondant à environ 85% de l'activité d'ostéoblastes non mutés. Une correction similaire a été trouvée avec le correcteur Vx809 (non montré dans l'article).
- La correction de l'activité du canal CFTR dans des ostéoblastes F508del permet de diminuer le ratio des ARNm RANKL/OPG qui est augmenté dans ces cellules.
- La correction de la protéine F508del-CFTR permet également de corriger le défaut d'expression de COX-2 observé dans les ostéoblastes portant la mutation F508del. Cette restauration de l'expression de COX-2 est accompagnée par une amélioration de la production de PGE2 qui est un de ces métabolites.

L'ensemble des résultats obtenus permettent de montrer que la molécule C18, dont l'activité correctrice et potentiatrice de F508del-CFTR a déjà été montrée dans d'autres modèles cellulaires respiratoires est également efficace *in vitro* sur des ostéoblastes primaires humains. Une incubation pendant 48h d'ostéoblastes primaires humains porteurs de la mutation F508del en présence de C18 permet de retrouver une activité de canal chlorure similaire à des ostéoblastes non mutés. De plus, cette activité correctrice s'accompagne d'une régulation de l'expression de gènes important du remodelage osseux, qui avaient précédemment été montrés comme fortement impactés dans ces cellules : OPG, RANKL et COX-2. Ces résultats suggèrent donc que des molécules avec une activité correctrice et potentiatrice, à l'instar de C18, peuvent être considérées comme des stratégies thérapeutiques envisageables pour la maladie osseuse de mucoviscidose.

2^{ème} partie :

Surexpression de RANKL par les ostéoblastes F508del-CFTR : un mécanisme possible de susceptibilité à la pathologie osseuse dans la mucoviscidose

La maladie osseuse chez des patients mucoviscidosiques est un facteur de comorbidité important de cette pathologie. Les seuls traitements existants aujourd'hui pour pallier à la perte osseuse visent à limiter le phénomène de résorption osseuse en inhibant l'action des ostéoclastes, mais n'ont montré qu'une efficacité relative. Il est donc nécessaire de comprendre les mécanismes physiopathologiques de la perte osseuse associée à la mucoviscidose afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Des études cliniques ont mis en évidence chez des patients mucoviscidosiques que, malgré le nombre important de précurseurs d'ostéoclastes dans la circulation sanguine durant les phases d'exacerbations pulmonaires, la perte osseuse observée chez les patients semble également résulter d'un manque de formation osseuse par les ostéoblastes. Dans quelle mesure la mutation F508del peut-elle altérer la fonctionnalité des ostéoblastes ? Cette question n'est, aujourd'hui encore, pas tranchée

L'expression de CFTR par les ostéoblastes a été montrée aussi bien dans des modèles murins que chez l'homme, mais sa fonction dans le tissu n'est pas encore bien connue. Notre équipe a précédemment montré que des ostéoblastes primaires humains portant la mutation F508del présentent une perte importante de fonctionnalité du canal CFTR, et que plusieurs gènes clés du remodelage osseux dont les gènes codant RANKL et OPG ont une expression altérée. De façon intéressante l'utilisation de molécules pharmaceutiques ayant pour but de corriger le défaut de CFTR conduit d'une part, à un regain d'activité de ce canal et, d'autre part, normalise l'expression des gènes impactés par la mutation.

Les objectifs de cette étude sont triples :

- Tout d'abord évaluer l'impact de la mutation F508del sur la voie de signalisation RANK/RANKL/OPG, l'expression des gènes étant altérée dans les ostéoblastes primaires F508del-CFTR.
- Dans un second temps, nous voulons évaluer l'impact d'un environnement pro-inflammatoire sur l'activité des ostéoblastes. Pour cela les expérimentations sont réalisées dans 3 conditions différentes, une condition dite contrôle sans stimulation qui permet une

comparaison entre cellules non mutées et les ostéoblastes F508del-CFTR o avec l'ajout au milieu de culture des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α ou IL-17) qui sont souvent présentes en concentrations élevées dans le sérum de patients CF.

- Nous avons évalué l'impact de différents correcteurs et potentiateurs de CFTR destiné à traiter les patients portant la mutation F508del, à savoir le couple Vx770 et Vx809 (possédant une autorisation temporaire d'utilisation en France sous le nom Orkambi[®]) et un correcteur et potentiateur de CFTR, le C18.

Les résultats obtenus lors de cette étude ont été publiés dans *Journal of Pathology* en 2016.

Overexpression of RANKL in osteoblasts: a possible mechanism of susceptibility to bone disease in cystic fibrosis

Martial Delion,¹ Julien Braux,¹ Marie-Laure Jourdain,¹ Christine Guillaume,¹ Camille Bour,¹ Sophie Gangloff,¹ Françoise Le Pimpec-Barthes,² Isabelle Sermet-Gaudelus,³ Jacky Jacquot^{1*} and Frédéric Velard^{1*}

¹ EA 4691, Biomatériaux et Inflammation en Site Osseux, SFR CAP-Santé (FED 4231), Université Reims Champagne-Ardenne, 1 Avenue du Maréchal Juin, Reims, France

² Département de Chirurgie Thoracique, Hôpital Européen Georges Pompidou, 20-40 Rue Leblanc, Paris, France

³ Unité de Pneumo-Pédiatrie Allergologie, Hôpital Necker, Inserm U1551, Université Paris Sorbonne, Paris, France

*Correspondence to: J Jacquot or F Velard, EA 4691, Biomatériaux et Inflammation en Site Osseux (BIOS), SFR CAP-Santé (FED 4231), Université Reims Champagne-Ardenne, 1 Avenue du Maréchal Juin, 51095, Reims, France. E-mail: jackyjacquot@inserm.fr or frederic.velard@univ-reims.fr

Abstract

Bone fragility and loss are a significant cause of morbidity in patients with cystic fibrosis (CF), and the lack of effective therapeutic options means that treatment is more often palliative rather than curative. A deeper understanding of the pathogenesis of CF-related bone disease (CFBD) is necessary to develop new therapies. Defective CF transmembrane conductance regulator (CFTR) protein and chronic inflammation in bone are important components of the CFBD development. The receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) drive the regulation of bone turnover. To investigate their roles in CFBD, we evaluated the involvement of defective CFTR in their production level in CF primary human osteoblasts with and without inflammatory stimulation, in the presence or not of pharmacological correctors of the CFTR. No major difference in cell ultrastructure was noted between cultured CF and non-CF osteoblasts, but a delayed bone matrix mineralization was observed in CF osteoblasts. Strikingly, resting CF osteoblasts exhibited strong production of RANKL protein, which was highly localized at the cell membrane and was enhanced in TNF (TNF- α) or IL-17-stimulated conditions. Under TNF stimulation, a defective response in OPG production was observed in CF osteoblasts in contrast to the elevated OPG production of non-CF osteoblasts, leading to an elevated RANKL-to-OPG protein ratio in CF osteoblasts. Pharmacological inhibition of CFTR chloride channel conductance in non-CF osteoblasts replicated both the decreased OPG production and the enhanced RANKL-to-OPG ratio. Interestingly, using CFTR correctors such as C18, we significantly reduced the production of RANKL by CF osteoblasts, in both resting and TNF-stimulated conditions. In conclusion, the overexpression of RANKL and high membranous RANKL localization in osteoblasts are related to defective CFTR, and may worsen bone resorption, leading to bone loss in patients with CF. Targeting osteoblasts with CFTR correctors may represent an effective strategy to treat CFBD.

Copyright © 2016 Pathological Society of Great Britain and Ireland. Published by John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: cystic fibrosis; bone disease; osteoblasts; RANKL; OPG; F508del-CFTR; CFTR correctors

Received 7 April 2016; Revised 9 May 2016; Accepted 18 May 2016

No conflicts of interest were declared.

Introduction

Cystic fibrosis (CF), which is caused by mutations of the CF transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene, is characterized by multi-organ deficiencies that begin early in life [1,2]. In CF disease, the deletion F508 is the most common *CFTR* mutation, with more than 80% of patients carrying it on at least one allele [3,4]. With the increasing life expectancy due to improvements in the treatment of pulmonary and gastrointestinal disorders of the disease, other complications and comorbidities of CF have become more prevalent, such CF-related bone disease (CFBD), with 55–65% of patients older than 45 years affected [5–7]. Individuals with CF have been documented to have a low bone mineral density [8] and

an increased fracture rate as early as adolescence [9], leading to excessive kyphosis which compromises the thoracic skeletal architecture, with the consequence of an accelerated decline in lung function and ineffective cough and airway clearance [10–12].

The mechanism for early bone loss in CF patients is multifactorial, and although vitamin D and calcium deficiencies, chronic pulmonary infection, delayed puberty, and frequent use of glucocorticoid drugs can all jeopardize bone health in CF patients, the pathogenesis of CFBD is still unknown [8,13–18]. Putman *et al* recently showed, using high-resolution peripheral quantitative computed tomography (HR-pqCT), that young adults with CF have compromised plate-trabecular microstructure, altered axial alignment of trabeculae, and reduced connectivity between trabeculae that may

contribute to the reduced bone strength and increased fracture risk in trabecular-rich bones, such as ribs and vertebrae [7,19]. We previously observed lower bone mineral density gains in children with CF as early as 6 years of age with mild disease and normal nutritional status, suggesting that CFBD may in part be due to a primary defect in bone metabolism [20]. Thus, the osteoblasts (bone-forming cells) may play a key role in the pathogenesis of CFBD, yet surprisingly little is known regarding the mechanisms underlying their functional defect in CF. The expression of CFTR protein has been identified in osteoblasts [21,22], but its functional importance in the bone tissue is as yet unclear. In a CF mouse model, we have shown that the F508del mutation in *Cftr* impacts osteoblast activity, leading to impaired bone formation, independently of other aetiological factors, suggesting a link between this F508del mutation and bone formation in this disease [23]. Furthermore, pharmacological correction of the CFTR-dependent chloride conductance led to an improved bone formation rate, bone mass, and microarchitecture in F508del mice, suggesting a potential therapy strategy to reduce bone loss in CF disease [24].

Osteoblasts can control osteoclastogenesis by two critical signalling proteins: namely, the receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) and its soluble decoy receptor osteoprotegerin (OPG) [25,26]. RANKL, a member of the TNF superfamily, is a membrane-bound homotrimer protein found on the surface of mesenchymal cells of osteoblast lineage and exerts its effects by recognizing its receptor, RANK, on marrow macrophages, activating them to assume the osteoclast phenotype [27]. The production of RANKL is enhanced by pro-inflammatory cytokines such as TNF [28] and could be released from the cell membrane as a result of proteolytic cleavage [29]. OPG is a potent antagonist of osteoclast (bone-resorbing cell) formation by binding and inactivating RANKL [30]. Thus, the ratio of RANKL-to-OPG determines the osteoclast formation potential, and subsequent bone resorption. In clinical studies, levels of serum OPG were found to be lower and RANKL higher in children and adult patients with CF compared with those of normal controls [31,32]. From rib explants harvested from young patients with CF, we confirmed the genetic contribution by which the F508del mutation in *CFTR* resulted in severely compromised maturation of osteoblasts associated with an elevated *RANKL-to-OPG* mRNA ratio, reduced *COX-2 (PTGS2)* mRNA expression, and a drastic reduction in prostaglandin E2 (PGE2) production [13], the latter being identified as a key mediator in the regulation of skeletal growth and efficient bone fracture healing [33,34].

A major task that remains to be achieved towards understanding CFBD is a better characterization of specific biochemical changes of osteoblasts occurring in CF patients, in as much as the development of osteoclasts is regulated at least in part by the activity of osteoblasts and by interactions between the TNF, COX-2/PGE2/15-desoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin

J₂ (15d-PGJ2) and IL-17 systems [35–38] and the OPG/RANK/RANKL triad [29,39], which are well recognized as the most critical pathways for osteoclastogenesis [25]. Thus, understanding the initial defects in the osteoblast activity of patients with CF, under inflammatory conditions, could suggest new preventions and treatments as well as the means to assess the bone status and the efficacy of therapeutic agents.

Here, using non-CF and CF primary human osteoblasts, we show that the F508del mutation in *Cftr* causes RANKL protein overproduction and high membranous localization of RANKL in CF osteoblasts, both in basal and in TNF- α or IL-17-stimulated conditions, and thus enhancing the RANKL-to-OPG protein ratio; this might play a key role in driving the bone loss in patients with CF. Moreover, CFTR correctors such as C18 can reverse the elevated RANKL production by CF osteoblasts, even under inflammatory conditions. Thus, CFTR correctors could be of benefit in the treatment of CFBD.

Materials and methods

Details may be found in the Supplementary materials and methods.

Primary osteoblast cultures

Trabecular bone explants prepared from rib fragments were collected during lung transplantation from nine CF patients bearing the F508del mutation in *CFTR* [median age 18 (range 13–37) years; eight genotypes F508del/F508del, one F508del/G542X] and from trabecular bone explants of the femoral head or tibial tray of 14 non-CF subjects (used as controls) who underwent trauma surgery [median age 60 (range 28–78) years]. The bone samples were obtained after written informed consent of patients and approval by our local research ethics committee. All CF and non-CF primary osteoblasts were obtained by migration from trabecular bone fragments placed in *in vitro* culture (see Figure 1A), as described previously [21]. Further details for cell cultures and different treatments of CF and non-CF osteoblasts may be found in the Supplementary materials and methods.

Immunofluorescence

Immunofluorescent staining for CFTR and membranous RANKL was conducted on cultured CF and non-CF osteoblasts. Further details may be found in the Supplementary materials and methods.

Transmission electron microscopy

Observations of CF and non-CF osteoblast ultrastructure were made using transmission electron microscopy. Further details may be found in the Supplementary materials and methods.

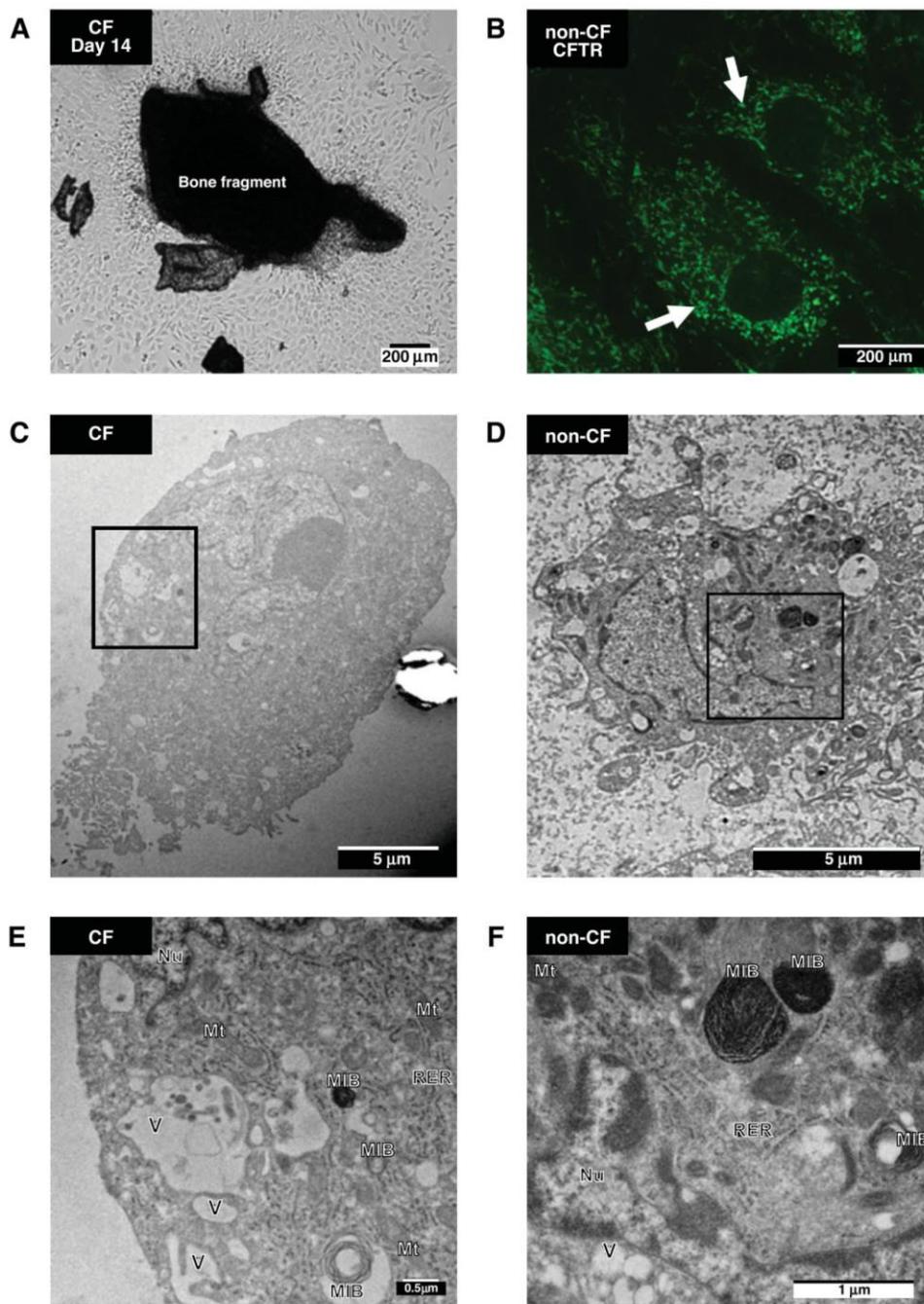


Figure 1. The mutation F508del in CFTR does not impair ultrastructural aspects of primary osteoblasts in long-term cultures. (A) Optical microscopy observation of CF primary osteoblasts migrating from trabecular bone fragments (day 14). (B) Non-CF primary osteoblasts were cultured during four passages and then cultured on collagen-coated glass slides. CFTR protein in osteoblasts was identified by immunofluorescence using the mouse IgG2A anti-human CFTR monoclonal antibody (clone 24-1). (C, D) Transmission electron micrographs of CF and non-CF primary osteoblasts in long-term cultures, respectively. (E) Magnification of area identified in C. (F) Magnification of area identified in D. Nu = nucleus; Mt = mitochondria; MIB = multilamellar body; RER = rough endoplasmic reticulum; V = exocytosis vesicles.

ALP activity and bone mineralization

ALP activity and extracellular matrix mineralization, used as markers of osteoblast differentiation and maturation, were determined at days 7, 14, and 21 after seeding. Further details may be found in the Supplementary materials and methods.

RANKL and OPG protein levels

Total and membranous RANKL production and OPG levels in cell culture supernatants were measured using Duoset ELISA kits (R&D Systems, Lille, France). Further details may be found in the Supplementary materials and methods.

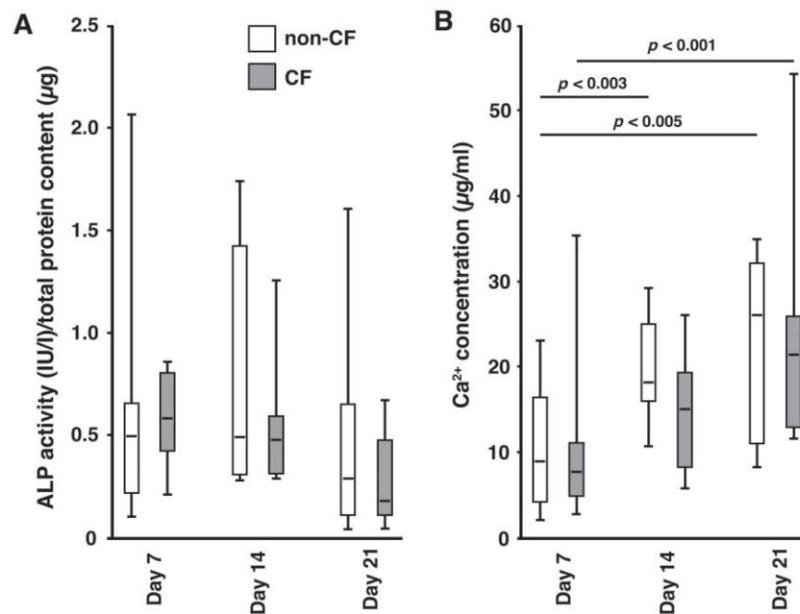


Figure 2. The mutation F508del in CFTR does not impair alkaline phosphatase (ALP) activity levels but delays the extracellular bone mineralization. (A) ALP activity measurements using the *p*-nitrophenyl-phosphate method. (B) Calcium (Ca²⁺) concentrations were evaluated using the Alizarin red-S staining method followed by extraction of the stain for quantification. White boxes represent data collected from non-CF osteoblasts and grey boxes data from CF osteoblasts. *n* = 6 independent donors in both CF and non-CF conditions. All experiments were performed in duplicate. Black bar represents median value. Black bars represent the first and ninth deciles and the limits of rectangles represent the first and third quartiles.

Results

Morphological and ultrastructural aspects of *in vitro* CF and non-CF primary human osteoblasts

We used a model of primary human osteoblast culture previously established in our laboratory from freshly harvested trabecular bone fragments (Figure 1A) [21]. CF and non-CF primary osteoblast cultures, used at the fourth to fifth passage, were validated according to the expression of differentiation-related genes of osteoblastic phenotype: *BGLAP*, *ALPL*, *SPP1*, *SP7*, *RUNX2*, and *COL1A1*, as reported previously [13]. As depicted in Figure 1B, immunofluorescence of non-CF osteoblasts revealed predominantly punctate intracellular staining for CFTR, as recently shown in cultured murine calvarial osteoblasts [40]. Similar ultrastructural aspects were observed between CF and non-CF osteoblasts in long-term cultures, showing a large nucleus, well-developed rough endoplasmic reticulum, mitochondria, exocytosis vesicles and multilamellar bodies (Figures 1C–1F).

CF osteoblasts exhibit a normal level of ALP activity but delayed extracellular matrix mineralization compared with non-CF osteoblasts

To analyse the *in vitro* functional activity of CF and non-CF osteoblasts in long-term cultures (up to 21 days), we first investigated the ALP activity, a marker of differentiation, and the extracellular matrix

mineralization through the levels of Ca²⁺ deposition. As shown in Figure 2A, no significant difference was observed in the ALP activity between CF and non-CF osteoblasts after 7-, 14-, and 21-day culture periods, but a 20% reduction of Ca²⁺ deposition was observed in CF osteoblasts (Figure 2B). Collectively, these data show that the F508del mutation in *CFTR* did not impair osteoblastic differentiation but slightly delayed extracellular matrix mineralization.

CF osteoblasts exhibit elevated production of RANKL protein and more membranous RANKL localization

The effects of defective CFTR on the production and localization of RANKL in osteoblasts were examined to uncover the mechanisms of enhanced bone resorption in CF patients. We decided to analyse osteoblast RANKL production following stimulation by two major pro-inflammatory cytokines, TNF and IL-17, which are linked to CF disease and in particular to pulmonary exacerbations [41]. Moreover, IL-17, a primary product of immune cells, has recently been implicated in the pathogenesis of bone diseases such as rheumatoid arthritis, osteoarthritis [42,43], and post-menopausal osteoporosis through an alteration in the RANKL-to-OPG system in osteoblasts [38]. First, we found that resting CF osteoblasts produced more RANKL protein than resting non-CF osteoblasts (*p* < 0.007) and that the level of RANKL was strongly enhanced after stimulation with TNF at 20 ng/ml

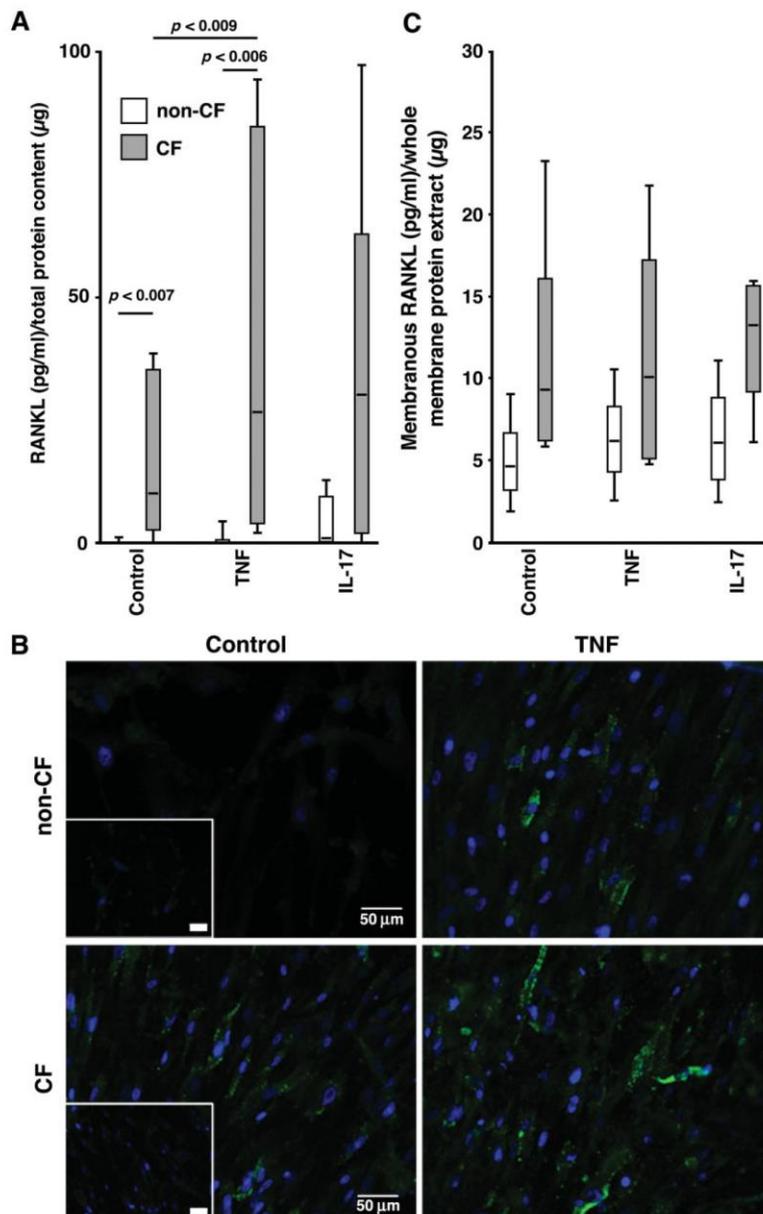


Figure 3. The mutation F508del in CFTR causes elevated RANKL protein production and greater RANKL membranous localization in CF osteoblasts. (A) Total RANKL protein levels measured by the ELISA method. $n = 5$ independent donors in both CF and non-CF osteoblast conditions. All experiments were performed in duplicate in both resting conditions and after 24 h treatment with 20 ng/ml TNF and IL-17. White boxes represent data collected from non-CF osteoblasts and grey boxes data from CF ones. Black bar represents median value. Black bars represent the first and ninth deciles and limits of rectangles represent the first and third quartiles. (B) Representative immunofluorescent staining for membranous RANKL (green) on osteoblasts counterstained with DAPI (nuclei) (Zeiss Axiovert 200 M, objective $\times 20$). Insets highlight the absence of non-specific staining in negative controls. Bars = 50 μm . (C) Membranous RANKL protein levels measured by ELISA. $n = 5$ independent donors in both CF and non-CF osteoblast conditions. All experiments were performed in duplicate in both resting conditions and after 24 h treatment with 20 ng/ml TNF and IL-17. White boxes represent data collected from non-CF osteoblasts and grey boxes data from CF ones. Black bar represents median value. Black bars represent the first and ninth deciles and limits of rectangles represent the first and third quartiles.

(2.5-fold increase, $p < 0.006$). However, stimulation with IL-17 (20 ng/ml) did not significantly increase the production of RANKL (Figure 3A). Surprisingly, no significant changes in RANKL production were observed in non-CF osteoblasts after either TNF or IL-17 stimulation (Figure 3A).

Next, we investigated the localization of RANKL protein in non-permeabilized CF and non-CF cell cultures by immunostaining cells with and without TNF stimulation. Immunofluorescence of resting CF osteoblasts revealed abundant membranous RANKL staining compared with resting non-CF osteoblasts. TNF stimulation

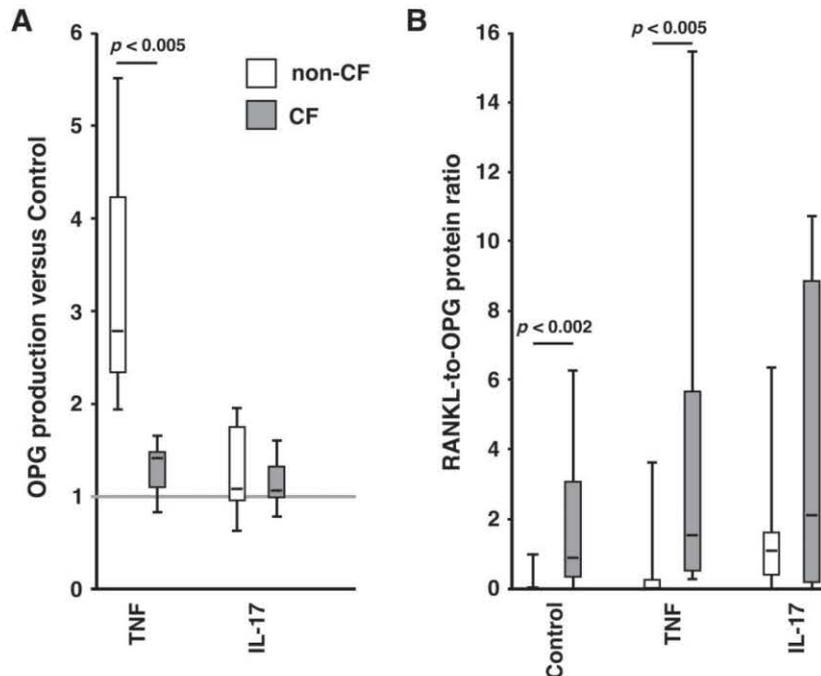


Figure 4. The mutation F508del in CFTR causes a lower OPG release in CF osteoblasts and enhances the RANKL-to-OPG protein ratio. (A) OPG amounts in culture supernatants evaluated by the ELISA method. $n = 4$ independent donors in both CF and non-CF osteoblast conditions. All experiments were performed in duplicate in both resting conditions and after 24 h treatment with 20 ng/ml TNF and IL-17. White boxes represent data collected from non-CF osteoblasts and grey boxes data from CF ones. Black bar represents median value. Black bars represent the first and ninth deciles and limits of rectangles represent the first and third quartiles.

caused a slight increase of membranous RANKL in non-CF osteoblasts, which was more pronounced in CF osteoblasts (Figure 3B). Our data in Figure 3C show that CF osteoblasts had higher levels of membranous RANKL protein after stimulation with either TNF (20 ng/ml) or IL-17 (20 ng/ml) compared with non-CF osteoblasts. However, this increase did not reach statistical significance. These data suggest that the increased osteoclastic bone resorption described in patients with CF may be due to enhanced osteoblast-mediated osteoclastogenesis through overexpression of osteoblast membranous RANKL.

A defective response in OPG production following inflammatory stimulation leads to an elevated RANKL-to-OPG ratio in CF osteoblasts

We demonstrated a defective response of OPG production in CF osteoblasts following TNF (20 ng/ml) stimulation, in contrast to the elevated OPG production of non-CF osteoblasts (Figure 4A). The lower production of OPG both in basal and in TNF-stimulated CF osteoblasts led to an elevated RANKL-to-OPG protein ratio in CF osteoblasts compared with non-CF osteoblasts ($p < 0.002$ and $p < 0.005$, respectively) (Figure 4B). However, following IL-17 stimulation, no significant change in the RANKL-to-OPG protein ratio was observed in CF osteoblasts. These data suggest that mutated CFTR contributes to the elevated RANKL-to-OPG ratio, leading to uncoupled

bone turnover, particularly in inflammatory situations, characteristic in CF disease.

Pharmacological inhibition of CFTR in non-CF osteoblasts is sufficient to enhance both RANKL protein production and the RANKL-to-OPG ratio

To obtain evidence for a role of CFTR chloride channel activity in changes of osteoblast physiology, we incubated non-CF osteoblasts with 10 μM CFTR_{inh} 172, a selective inhibitor of CFTR chloride channel conductance, for 72 h [44] and then analysed the levels of RANKL production and OPG release in supernatants of basal and stimulated (TNF and IL-17, 20 ng/ml) non-CF osteoblasts compared with non-CF osteoblasts. Inhibition of CFTR activity led to a moderate increase of RANKL production that was significantly enhanced (1.7-fold) under IL-17 stimulation (Figure 5A). In contrast, a non-significant decrease of OPG release was observed following treatment with CFTR_{inh} 172, which was accentuated under IL-17 stimulation (Figure 5B). Consequently, the RANKL-to-OPG protein ratio was significantly increased following inhibition of CFTR activity and was markedly enhanced (6-fold) under IL-17 stimulation (Figure 5C). Thus, these data suggest that CFTR functional activity acts as a negative regulator of RANKL production and, consequently, of the elevated RANKL-to-OPG ratio in osteoblasts, in both resting and inflammatory conditions.

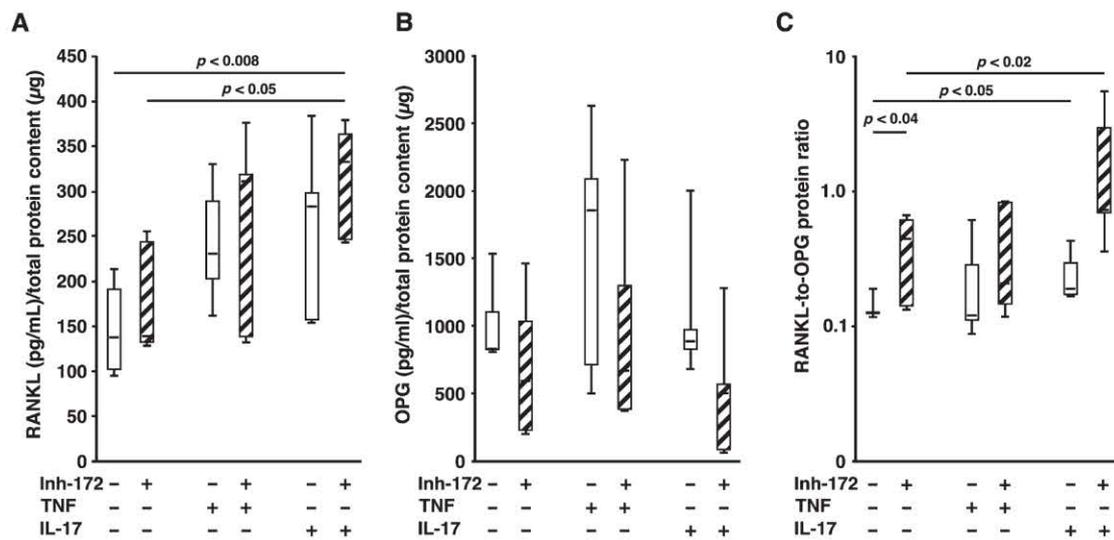


Figure 5. Pharmacological inhibition of CFTR chloride channel activity causes an enhanced RANKL-to-OPG ratio in non-CF osteoblasts. (A) Total RANKL production. (B) OPG amounts released in culture supernatants. (C) RANKL-to-OPG protein ratio levels. Total RANKL production and the amount of OPG released were evaluated by ELISA following 72 h treatment with the specific inhibitor of CFTR, CFTR_{inh-172} at 10 µM, with and without 24 h treatment of IL-17 at 20 ng/ml. n = 5 independent donors. All experiments were performed in duplicate. Black bar represents median value. Black bars represent the first and ninth deciles and limits of rectangles represent the first and third quartiles.

The CFTR corrector C18 reduces RANKL production in CF osteoblasts

Small molecules that either increase the number or the opening time of CFTR channels have been identified and successfully trialled in patients with CF. The combination of ivacaftor (VX-770), a CFTR potentiator that increases chloride transport, and lumacaftor (VX-809), a CFTR corrector that suppresses misfolding of F508del-CFTR, produced improvements in lung function and weight gain and reduced pulmonary exacerbations in CF patients [45,46]. Here, we investigated the production of RANKL by CF osteoblasts with or without TNF-α (20 ng/ml) stimulation and with a combination of VX-770 and VX-809 molecules (10 µM of each) (Figure 6). After 48 h in the presence of both molecules in combination, a tendency to decreased RANKL production of TNF-α-stimulated CF osteoblasts was observed, although without statistical significance (Figure 6A). In contrast, using the CFTR corrector C18 (20 µM), a dual F508del-CFTR corrector and potentiator known for enhancing the metastable channel-active form of F508del-CFTR protein after its biosynthetic rescue [47], for the same 48 h period, we observed a statistically significant decrease (p < 0.009) in the production of RANKL in both basal (a 15% reduction) and TNF-stimulated CF osteoblasts (a 44% reduction) (Figure 6B). Surprisingly, we noted that the effects of the tested CFTR correctors on the reduction of RANKL production were more pronounced in the situation of TNF-stimulated CF osteoblasts. It is tempting to hypothesize that TNF behaves as do CFTR correctors, or that TNF and CFTR corrector actions could act in parallel to lead to the maturation of F508del-CFTR and induced CFTR chloride currents in osteoblasts, as

recently reported in CF human bronchial cells when stimulated with TNF [48]. Therefore, our data suggest that CFTR correctors and potentiators such as C18 do indeed protect from bone resorption in CF patients through a reduction of osteoblast RANKL production, even in inflammatory conditions.

In *in vivo* and *in vitro* bone models, recent data have shown that 15d-PGJ2, a principal COX-2 product formed during the inflammatory process and favouring osteoblast activity when used at low concentrations (2 µM), acts as a potent therapeutic agent to fight against the inflammation-related bone loss [35,36]. We had reported that defective CFTR activity resulted in a marked reduction of 15d-PGJ2 production in lung cells associated with increased inflammatory mediators [49]. We decided, therefore, to test the effects of exogenous 15d-PGJ2 (2 µM) on the production of RANKL by CF osteoblasts with or without TNF-α (20 ng/ml) stimulation (Figure 6C). After a 48 h period in the presence of 2 µM 15d-PGJ2, a slight decrease of RANKL production of CF osteoblasts with and without TNF-α stimulation was observed; however, this decrease did not reach statistical significance (Figure 6C).

Discussion

We provide here the first evidence that mutated CFTR results in overexpression of RANKL protein with increased RANKL membranous localization associated with an enhanced RANKL-to-OPG protein ratio in CF human osteoblasts that was more pronounced under inflammatory stimulation. We also confirmed the importance of CFTR-dependent chloride

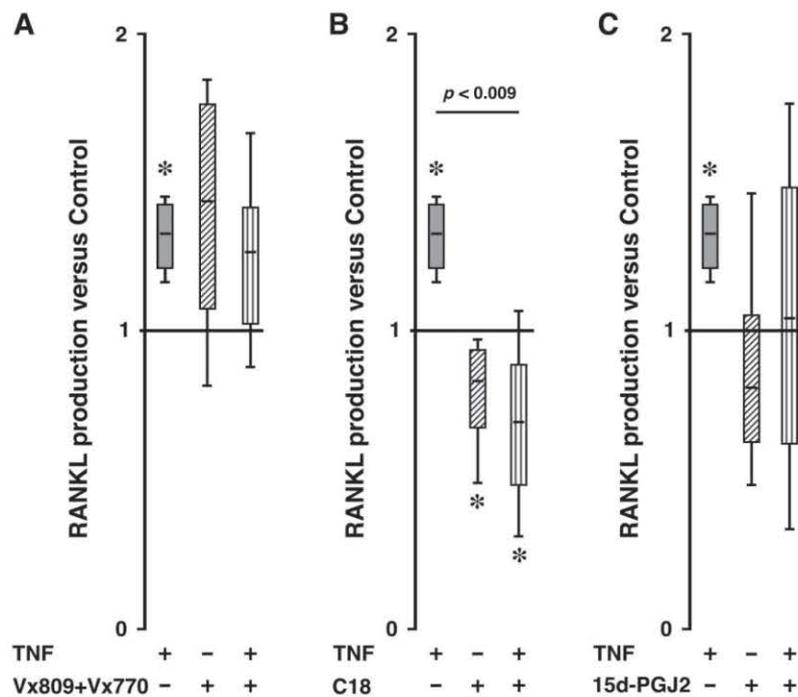


Figure 6. The CFTR corrector C18, but not VX-770 with VX-809 combined drugs or the lipid mediator 15d-PGJ2, reduces the production of RANKL by CF osteoblasts. (A) RANKL production by CF osteoblasts after their exposure to the CFTR corrector and potentiator VX-809 and VX-770 (10 μ M each) for 48 h with and without subsequent 24 h treatment of 20 ng/ml TNF. (B) RANKL production in CF osteoblasts after their exposure to the CFTR corrector C18 (20 μ M) for 48 h with and without subsequent 24 h treatment with 20 ng/ml TNF. (C) RANKL production in CF osteoblasts after their exposure to the lipid mediator 15d-PGJ2 (2 μ M) for 48 h with and without 24 h treatment with 20 ng/ml TNF. $n=6$ independent donors. All experiments were performed in duplicate. Black bar represents median value. Black bars represent the first and ninth deciles and limits of rectangles represent the first and third quartiles. *Mean $p < 0.01$ versus control condition.

conductance in regulation of the RANKL-to-OPG protein ratio. CFTR chloride channel deficiency in non-CF osteoblasts, resulting from pharmacological inhibition, led to both decreased OPG production and an enhanced RANKL-to-OPG ratio that was more pronounced under inflammatory conditions. Furthermore, we showed that the CFTR corrector C18 can reduce the production of RANKL, even in inflammatory situations, and enhance the release of OPG by CF osteoblasts, and consequently diminish the RANKL-to-OPG ratio. All of these results are consistent with our previous data [13,50] and suggest that overproduction of RANKL in CF osteoblasts with a high level of RANKL membranous localization may be mainly due to defective CFTR chloride conductance function.

Other authors have observed similar effects of defective CFTR in the context of lower bone density in mouse models with *Cftr* inactivation [51–53]. Recently, Stalvey *et al* demonstrated altered osteoblast differentiation with reduced *OPG* mRNA and an elevated *RANKL-to-OPG* mRNA ratio in cultured calvaria cells from *Cftr*^{-/-} mice associated with reduced bone mass [40].

In this *in vitro* study, we also showed that the matrix mineralization capacity (through the extracellular Ca²⁺ deposits) of CF osteoblasts was lower than that of non-CF osteoblasts, documenting the lower than normal

capacity of CF osteoblasts to differentiate into fully mature osteoblasts. It has been proposed that the skeletal deficits that occur in CF disease are due to deficiencies of bone mineralization leading to osteoporosis [54]. The mechanisms of how CFTR-dependent chloride activity and Ca²⁺ transport operate in osteoblasts are poorly understood. A recent report has demonstrated the importance of Cl⁻ transport in osteoblasts linked to Ca²⁺ secretion through anoctamin-6 (Ano6, TMEM16F) and Ca²⁺ transporter NCX1 in the mineralization process, and also suggested a potential role for other Cl⁻ channels such as CFTR for proper bone mineralization [55].

The cause of this striking uncoupling of bone turnover has not been fully elucidated and raises the intriguing possibility that CFBD development and progression may in part be due to CFTR dysfunction itself and/or chronic inflammation. Ambroszkiewicz *et al* recently reported that the RANKL-to-OPG protein ratio was nearly 2-fold higher in the sera of CF children compared with healthy controls, suggesting that the RANKL protein is a major promotor of osteoclastogenesis [32]. In adults with CF, serum levels of RANKL were also found to be elevated, and an increase of the production of osteoclast precursors in peripheral blood was found to be associated with bone loss during pulmonary infections and elevated pro-inflammatory cytokines [31,56,57]. The mechanisms responsible have

not been clearly defined. As we have demonstrated in the present study that (1) the overproduction of RANKL associated with high membranous RANKL localization in resting CF osteoblasts is not related to inflammation but is more pronounced under inflammatory conditions and (2) pharmacological inhibition of CFTR chloride channel conductance in non-CF osteoblasts leads to decreased OPG production and enhances the RANKL-to-OPG protein ratio, which is also more pronounced under inflammatory conditions, we propose that basic CFTR defect itself leads to elevated RANKL production and membranous RANKL expression in osteoblasts and thus may contribute to the pathogenesis of CFBD.

Clinical data have reported that CF complications with *TNF* gene polymorphisms coupled with high serum TNF production are associated with decreased bone density [58]. Consistently, our experiments with TNF-stimulated CF osteoblasts showed both enhanced production of RANKL and defective production of OPG and thus support a link between the high levels of TNF and osteoclastogenesis. In bone remodelling, exacerbated nuclear factor-kappa B (NF- κ B) signalling is known to cause inflammation [59] and to promote osteoclastogenesis [60]. We and others had reported evidence of NF- κ B up-regulation related to defective CFTR activity in human lung cells that was associated with reduced production of 15d-PGJ2, a COX-2 metabolite product, and increased TNF, IL-6, IL-8, and IL-17 concentrations [61–63]. Kim *et al* recently reported that treatment with low doses of 15d-PGJ2 in *in vivo* and *in vitro* bone models reduced the RANKL-to-OPG mRNA ratio in a human osteoblastic cell line, and prevented the destruction of femoral trabecular structures in oestrogen-deprived mice, suggesting that 15d-PGJ2 might represent a novel anabolic agent for the amelioration of pathological bone loss [35]. Here, we found that a low dose of 15d-PGJ2, which is well known to directly inhibit NF- κ B signalling at multiple steps [64], slightly reduced the production of RANKL by CF osteoblasts. Higher 15d-PGJ2 doses in CF osteoblasts are currently under investigation in our laboratory.

Clinical trials are underway with the goal of finding new potential treatments that might prevent the development of CFBD, including anti-resorptive agents such as oral bisphosphonates and anabolic agents such as human recombinant growth hormone (hrGH) and parathyroid hormone (PTH) [65]. Administration of bisphosphonates has been associated with bone pain and flu-like symptoms, which could adversely impact the pulmonary status of patients with CF [8]. Denosumab, an available anti-resorptive medication that targets RANKL in post-menopausal women and osteolytic diseases such as rheumatoid arthritis and oncology [66,67], might be particularly effective in CF patients to counteract elevated membranous RANKL in osteoblasts. Hence, targeting upstream factors responsible for the membranous localization of RANKL could also lead to a specific therapeutic approach in CFBD.

New treatments that target the F508del mutation through the use of potentiators and correctors of chloride channels are being developed for the care of CF-related lung pathology [68]. Recently, a combination therapy with a CFTR corrector and potentiator (VX-809 and VX-770) named Orkambi has been tried in patients with the F508del mutation, on pulmonary end-points (FEV1), with promising data based on the hypothesized synergic effects of two combined molecules [46]. We previously reported that C18 reduced the RANKL-to-OPG mRNA ratio (a 34% decrease) in primary CF osteoblasts [50]. Here, we demonstrated that C18 significantly decreased the production of RANKL protein by CF osteoblasts, even under inflammatory conditions, suggesting a strong potential for therapeutic trial in CFBD.

CFBD is a common and serious complication in the ageing CF population, and can significantly affect the health, well-being, and longevity of these patients. Longer life expectancy and better diagnostic methods have made CFBD one of the prevalent comorbidities of CF, besides typical lung pathology and diabetes. The clear association between RANKL-positive osteoblasts and defective CFTR activity suggests that CFTR correctors may represent an effective strategy to treat CFBD.

Acknowledgments

We thank all of the adolescents and young adults who participated in this study. This work was funded in part by research grants from the French Cystic Fibrosis Association 'Vaincre la Mucoviscidose' (RF20150501235 to JJ) and a PhD scholarship recipient from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, Paris, France (MD). We also acknowledge the PICT platform, CAP-Santé, Reims. The CFTR correctors (VX-770, VX-809, and C18) were provided by Vertex Pharmaceuticals, Boston, USA.

Author contribution statement

The authors contributed in the following way: MD: study design, data acquisition, data analysis, and drafting of the manuscript; JB, MLJ, CG, and CB: data acquisition and critical reading of the manuscript; SG, FLPB, and ISG: study design and critical reading of the manuscript; JJ: study concept and design, study supervision, data analysis, and drafting of the manuscript; FV: study concept and design, study supervision, data acquisition, data analysis, and drafting of the manuscript. All authors read and agreed on the final manuscript.

References

1. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, *et al*. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA [erratum in *Science* 1989 Sep 29;245(4925):1437]. *Science* 1989; **245**: 1066–1073.

2. Stoltz DA, Meyerholz DK, Welsh MJ. Origins of cystic fibrosis lung disease. *N Engl J Med* 2015; **372**: 351–362.
3. Boyle MP, De Boeck K. A new era in the treatment of cystic fibrosis: correction of the underlying CFTR defect. *Lancet Respir Med* 2013; **1**: 158–163.
4. Riordan JR. CFTR function and prospects for therapy. *Annu Rev Biochem* 2008; **77**: 701–726.
5. Jacquot J, Delion M, Gangloff S, et al. Bone disease in cystic fibrosis: new pathogenic insights opening novel therapies. *Osteoporos Int* 2016; **27**: 1401–1412.
6. Plant BJ, Goss CH, Plant WD, et al. Management of comorbidities in older patients with cystic fibrosis. *Lancet Respir Med* 2013; **1**: 164–174.
7. Putman MS, Milliren CE, Derrico N, et al. Compromised bone microarchitecture and estimated bone strength in young adults with cystic fibrosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; **99**: 3399–3407.
8. Aris RM, Merkel PA, Bachrach LK, et al. Guide to bone health and disease in cystic fibrosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; **90**: 1888–1896.
9. Buntain HM, Greer RM, Schluter PJ, et al. Bone mineral density in Australian children, adolescents and adults with cystic fibrosis: a controlled cross sectional study. *Thorax* 2004; **59**: 149–155.
10. Paccou J, Zeboulon N, Combesure C, et al. The prevalence of osteoporosis, osteopenia, and fractures among adults with cystic fibrosis: a systematic literature review with meta-analysis. *Calcif Tissue Int* 2010; **86**: 1–7.
11. Sermet-Gaudelus I, Castanet M, Retsch-Bogart G, et al. Update on cystic fibrosis-related bone disease: a special focus on children. *Paediatr Respir Rev* 2009; **10**: 134–142.
12. Aris RM, Renner JB, Winders AD, et al. Increased rate of fractures and severe kyphosis: sequelae of living into adulthood with cystic fibrosis. *Ann Intern Med* 1998; **128**: 186–193.
13. Velard F, Delion M, Le Henaff C, et al. Cystic fibrosis and bone disease: defective osteoblast maturation with the F508del mutation in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Am J Respir Crit Care Med* 2014; **189**: 746–748.
14. Gore AP, Kwon SH, Stenbit AE. A roadmap to the brittle bones of cystic fibrosis. *J Osteoporos* 2010; **2011**: 926045.
15. Boyle MP. Update on maintaining bone health in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med* 2006; **12**: 453–458.
16. Haworth CS. Impact of cystic fibrosis on bone health. *Curr Opin Pulm Med* 2010; **16**: 616–622.
17. Javier RM, Jacquot J. Bone disease in cystic fibrosis: what's new? *Joint Bone Spine* 2011; **78**: 445–450.
18. Stalvey MS, Clines GA. Cystic fibrosis-related bone disease: insights into a growing problem. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2013; **20**: 547–552.
19. Putman MS, Greenblatt LB, Sicilian L, et al. Young adults with cystic fibrosis have altered trabecular microstructure by ITS-based morphological analysis. *Osteoporos Int* 2016; DOI: 10.1007/s00198-016-3557-z.
20. Sermet-Gaudelus I, Souberbielle JC, Ruiz JC, et al. Low bone mineral density in young children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; **175**: 951–957.
21. Le Heron L, Guillaume C, Velard F, et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) regulates the production of osteoprotegerin (OPG) and prostaglandin (PG) E(2) in human bone. *J Cyst Fibros* 2010; **9**: 69–72.
22. Shead EF, Haworth CS, Condliffe AM, et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) is expressed in human bone. *Thorax* 2007; **62**: 650–651.
23. Le Henaff C, Gimenez A, Hay E, et al. The F508del mutation in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene impacts bone formation. *Am J Pathol* 2012; **180**: 2068–2075.
24. Le Henaff C, Hay E, Velard F, et al. Enhanced F508del-CFTR channel activity ameliorates bone pathology in murine cystic fibrosis. *Am J Pathol* 2014; **184**: 1132–1141.
25. Baron R, Kneissel M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nature Med* 2013; **19**: 179–192.
26. Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology* 2001; **142**: 5050–5055.
27. Teitelbaum SL. Osteoclasts: what do they do and how do they do it? *Am J Pathol* 2007; **170**: 427–435.
28. Wei S, Siegal GP. Mechanisms modulating inflammatory osteolysis: a review with insights into therapeutic targets. *Pathol Res Pract* 2008; **204**: 695–706.
29. Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys* 2008; **473**: 139–146.
30. Lacey DL, Timms E, Tan HL, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998; **93**: 165–176.
31. Shead EF, Haworth CS, Barker H, et al. Osteoclast function, bone turnover and inflammatory cytokines during infective exacerbations of cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2010; **9**: 93–98.
32. Ambroszkiewicz J, Sands D, Gajewska J, et al. Bone turnover markers, osteoprotegerin and RANKL cytokines in children with cystic fibrosis. *Adv Med Sci* 2013; **58**: 338–343.
33. Blackwell KA, Raisz LG, Pilbeam CC. Prostaglandins in bone: bad cop, good cop? *Trends Endocrinol Metab* 2010; **21**: 294–301.
34. Xie C, Liang B, Xue M, et al. Rescue of impaired fracture healing in COX-2^{-/-} mice via activation of prostaglandin E2 receptor subtype 4. *Am J Pathol* 2009; **175**: 772–785.
35. Kim KR, Kim HJ, Lee SK, et al. 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ inhibits osteolytic breast cancer bone metastasis and estrogen deficiency-induced bone loss. *PLoS One* 2015; **10**: e0122764.
36. Napimoga MH, Demasi AP, Bossonaro JP, et al. Low doses of 15d-PGJ₂ induce osteoblast activity in a PPAR-gamma independent manner. *Int Immunopharmacol* 2013; **16**: 131–138.
37. Zhang X, Schwarz EM, Young DA, et al. Cyclooxygenase-2 regulates mesenchymal cell differentiation into the osteoblast lineage and is critically involved in bone repair. *J Clin Invest* 2002; **109**: 1405–1415.
38. Tyagi AM, Srivastava K, Mansoori MN, et al. Estrogen deficiency induces the differentiation of IL-17 secreting Th17 cells: a new candidate in the pathogenesis of osteoporosis. *PLoS One* 2012; **7**: e44552.
39. Liu XH, Kirschenbaum A, Yao S, et al. Interactive effect of interleukin-6 and prostaglandin E2 on osteoclastogenesis via the OPG/RANKL/RANK system. *Ann N Y Acad Sci* 2006; **1068**: 225–233.
40. Stalvey MS, Clines KL, Havasi V, et al. Osteoblast CFTR inactivation reduces differentiation and osteoprotegerin expression in a mouse model of cystic fibrosis-related bone disease. *PLoS One* 2013; **8**: e80098.
41. Tiringier K, Treis A, Fucik P, et al. A Th17- and Th2-skewed cytokine profile in cystic fibrosis lungs represents a potential risk factor for *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; **187**: 621–629.
42. Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, et al. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin Invest* 1999; **103**: 1345–1352.
43. Mori G, D'Amelio P, Faccio R, et al. Bone-immune cell crosstalk: bone diseases. *J Immunol Res* 2015; **2015**: 108451.
44. Verkman AS, Jayaraman S. Fluorescent indicator methods to assay functional CFTR expression in cells. *Methods Mol Med* 2002; **70**: 187–196.

45. Van Goor F, Hadida S, Grootenhuys PD, *et al.* Rescue of CF airway epithelial cell function *in vitro* by a CFTR potentiator, VX-770. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; **106**: 18825–18830.
46. Wainwright CE, Elborn JS, Ramsey BW, *et al.* Lumacaftor–ivacaftor in patients with cystic fibrosis homozygous for Phe508del *CFTR*. *N Engl J Med* 2015; **373**: 220–231.
47. Eckford PD, Ramjeesingh M, Molinski S, *et al.* VX-809 and related corrector compounds exhibit secondary activity stabilizing active F508del-CFTR after its partial rescue to the cell surface. *Chem Biol* 2014; **21**: 666–678.
48. Bitam S, Pranke I, Hollenhorst M, *et al.* An unexpected effect of TNF-alpha on F508del-CFTR maturation and function. *F1000Res* 2015; **4**: 218.
49. Baudouin-Legros M, Colas J, Moriceau S, *et al.* Long-term CFTR inhibition modulates 15d-prostaglandin J2 in human pulmonary cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2012; **44**: 1009–1018.
50. Velard F, Delion M, Lemaire F, *et al.* Cystic fibrosis bone disease: is the CFTR corrector C18 an option for therapy? *Eur Respir J* 2015; **45**: 845–848.
51. Dif F, Marty C, Baudoin C, *et al.* Severe osteopenia in CFTR-null mice. *Bone* 2004; **35**: 595–603.
52. Haston CK, Li W, Li A, *et al.* Persistent osteopenia in adult cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-deficient mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; **177**: 309–315.
53. Pashuck TD, Franz SE, Altman MK, *et al.* Murine model for cystic fibrosis bone disease demonstrates osteopenia and sex-related differences in bone formation. *Pediatr Res* 2009; **65**: 311–316.
54. Sermet-Gaudelus I, Bianchi ML, Garabedian M, *et al.* European cystic fibrosis bone mineralisation guidelines. *J Cyst Fibros* 2011; **10** (Suppl 2): S16–S23.
55. Ousingsawat J, Wanitchakool P, Schreiber R, *et al.* Anoctamin-6 controls bone mineralization by activating the calcium transporter NCX1. *J Biol Chem* 2015; **290**: 6270–6280.
56. Shead EF, Haworth CS, Gunn E, *et al.* Osteoclastogenesis during infective exacerbations in patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; **174**: 306–311.
57. Haworth CS, Selby PL, Webb AK, *et al.* Inflammatory related changes in bone mineral content in adults with cystic fibrosis. *Thorax* 2004; **59**: 613–617.
58. Shmarina G, Pukhalsky A, Petrova N, *et al.* TNF gene polymorphisms in cystic fibrosis patients: contribution to the disease progression. *J Transl Med* 2013; **11**: 19.
59. Krum SA, Chang J, Miranda-Carboni G, *et al.* Novel functions for NFkB: inhibition of bone formation. *Nature Rev Rheumatol* 2011; **6**: 607–611.
60. Chang J, Wang Z, Tang E, *et al.* Inhibition of osteoblastic bone formation by nuclear factor-kB. *Nature Med* 2009; **15**: 682–689.
61. DiMango E, Ratner AJ, Bryan R, *et al.* Activation of NF-kB by adherent *Pseudomonas aeruginosa* in normal and cystic fibrosis respiratory epithelial cells. *J Clin Invest* 1998; **101**: 2598–2605.
62. Tabary O, Escotte S, Couetil JP, *et al.* Genistein inhibits constitutive and inducible NFkB activation and decreases IL-8 production by human cystic fibrosis bronchial gland cells. *Am J Pathol* 1999; **155**: 473–481.
63. Vij N, Mazur S, Zeitlin PL. CFTR is a negative regulator of NFkB mediated innate immune response. *PLoS One* 2009; **4**: e4664.
64. Straus DS, Pascual G, Li M, *et al.* 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ inhibits multiple steps in the NF-kB signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97**: 4844–4849.
65. Conwell LS, Chang AB. Bisphosphonates for osteoporosis in people with cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2014; **3**: CD002010.
66. Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS, *et al.* Bench to bedside: elucidation of the OPG–RANK–RANKL pathway and the development of denosumab. *Nature Rev Drug Discov* 2012; **11**: 401–419.
67. Cohen SB, Dore RK, Lane NE, *et al.* Denosumab treatment effects on structural damage, bone mineral density, and bone turnover in rheumatoid arthritis: a twelve-month, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase II clinical trial. *Arthritis Rheum* 2008; **58**: 1299–1309.
68. Birault V, Solari R, Hanrahan J, *et al.* Correctors of the basic trafficking defect of the mutant F508del-CFTR that causes cystic fibrosis. *Curr Opin Chem Biol* 2013; **17**: 353–360.

SUPPORTING INFORMATION ON THE INTERNET

The following supporting information may be found in the online version of this article:

Supplementary materials and methods.

Supplementary Materials and methods

Primary osteoblast cultures and treatments

Trabecular bone explants prepared from rib or sternum fragments harvested from 9 CF patients (median age 18 (range 13-37) years; genotypes 8 F508del/Fdel508, one F508del/G542X) were collected during lung transplantation. Trabecular bone explants of femoral head or tibial tray were also collected from 14 non-CF subjects (median age 60 (range 28-78) years who underwent trauma surgery, or from rib or sternum fragments of organ donors (used as non-CF controls). The bone samples were obtained after written informed consent of patients and the approval by our local research ethics committee in accordance with the usual ethical legal regulations (Article R 1243-57). All procedures were done in accordance with our authorization and registration number DC-2014-2262 given by the National "Cellule de Bioéthique". All CF and non-CF primary osteoblasts were obtained by migration from trabecular bone fragments (see Figure 1A). The fragments were cut into small pieces, washed in phosphate-buffered saline (DPBS, Gibco® - Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) containing 1% of penicillin and streptomycin (Gibco® - Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) four times for five min, digested in a solution of 0.5% trypsin-EDTA (Gibco®-Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) and then in type II collagenase (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). The fragments obtained were placed in 25 cm² culture flasks containing DMEM (Gibco® - Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) supplemented with 20% fetal bovine serum (Dutscher, Brumath, France) and 1% of penicillin and streptomycin (Gibco® - Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) solution and incubated at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. When they reached confluency cells were amplified in 75 cm² culture flasks at a density of 10,000 cells/cm² and fetal bovine serum medium content is decreased at 10%. Amplification step is repeated three times. In all experiments cells were used at the fourth passage (i.e. a 18-20 wk culture period after the first seeding) and cultured in osteogenic differentiation medium composed of the above described medium added with 10 mM of β -glycerophosphate and 50 mM of ascorbic acid (both from Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) but without dexamethasone because of its anti-inflammatory properties. For each non-CF and CF donor, cells were seeding in two independent wells at 10,000 cells/cm² for each condition, and studies of each parameter were realized at least in duplicate. In all experiments, cells were starved with culture medium containing 2% of fetal bovine serum for 24 h. Then cells were treated for 24 h with and without the pro-inflammatory cytokine TNF- α or IL-17 (20 ng.ml⁻¹ each, R&D systems, Lille, France). For pharmacological inhibition of CFTR chloride channel conductance in non-CF osteoblast, the 24 hours of starvation were followed by incubation in 10 μ M of CFTR_{inh} 172 (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) for 48 h (in 2% FBS culture medium, as we previously showed [42]). After the first 48 h, CFTR_{inh}172-

containing culture medium was renewed with or without TNF- α and IL-17 for another 24 h incubation period. In other experiments, starved cells were treated with and without CFTR correctors (VX-770, VX-809 and C18, 10 μ M of each, Vertex Pharmaceuticals, Boston, Massachusetts) and 2 μ M 15-d PGJ2 (Cayman chemical, Ann Arbor, Michigan) for 24 h. Then, each medium was renewed and added with TNF- α or IL-17 (20 ng.ml⁻¹ each). At the end of incubation periods, supernatants were collected and stored at -20°C. Cells were immediately frozen at -80°C in cell lysis buffer (50 mM Trizma hydrochloride, 2.5 mM EGTA, 10 mM NaF, 1 mM PMSF, 2 mM Na₃VO₄ (all from Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), 1 mM EDTA, 1% Triton X100 (both from Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) for total protein extract, or freshly processed for membrane isolation using a Subcellular Protein Fractionation Kit for Cultured Cells (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) accordingly to the manufacturer's instructions.

ELISA measurements

The levels of production of OPG (in supernatants) and RANKL (in cell lysates or membrane extracts) were assessed using DuoSet[®] ELISA kits (R&D systems, Lille, France) according to the manufacturer's instructions. All results were normalized to the amount of total protein content by using the BCA kit (Pierce BCA Protein Assay Kit - Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) according to the manufacturer's instructions.

Alkaline phosphatase (ALP) activity and bone mineralization

ALP activity and extracellular matrix mineralization, used as markers of osteoblast differentiation and maturation were determined at days 7, 14 and 21 after seeding at the fourth-passage. ALP activity was measured using the p-nitrophenyl phosphate (pNPP) technique. Osteoblasts were lysed in an alkaline buffer (0,1 M Tris, 0,06% triton X100 (both from Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France), 0.25 M NaCl, 0.02% NaN₃ (both from Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), pH 10.2) and lysate was incubated in a buffer containing pNPP as a substrate (aminomethyl propanol 10 mM (Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) MgCl₂ 2mM (Merck, Fontenay sous bois, France), pNPP 2 mM (Fisher Bioreagents, Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France), pH 10.2, 2 h at 37°C. ALP activity in the samples hydrolyses pNPP resulting in production of inorganic phosphate and paranitrophenol (PNP) and is measured by spectrophotometry at 405 nm using FLUOstar Omega microplate reader (BMG Labtech, Champigny sur Marne, France) with a correction of non-specific background at 750 nm. In parallel, ALP activity is evaluated with a standard curve based on order 2 dilution range of patient's serum containing a known ALP activity. All results were normalized to the amount of total protein content in each well.

For extracellular mineralization assays, osteoblasts were fixed in ice-cold ethanol for 1 h then washed with deionized water and stained with 2% alizarin red (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) in deionized water for 10 min. Cells were washed 2 times with deionized water to eliminate non-specific staining. After imaging on a Zeiss Axiovert 200M inverted microscope (Carl Zeiss, Marly le Roi, France) cells were then destained using 1% cetylpyridinium chloride monohydrate in 10 mM sodium phosphate (both from Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) for 30 min at room temperature. The optical density was read at 562 nm using FLUOstar Omega microplate reader (BMG Labtech, Champigny sur Marne, France) with a correction at 750nm.

Immunofluorescence

For CFTR immunostaining, non-CF osteoblasts were cultured on glass cover slips until confluent state in the osteogenic differentiation medium. Cells were fixed in 4% paraformaldehyde (Agar Scientific, Elektron Technology, Cambridge, UK) added with 0.1% Triton X100 (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) for 5 min in order to permeabilize the cells, which were then washed twice with DPBS (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France). After blocking with 3% BSA (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) in DPBS overnight, cells were incubated for 1 h with the mouse IgG2A anti-human CFTR monoclonal antibody (clone 24-1, R&D Systems, Lille, France). After washing twice with DPBS cells were blocked with BSA 3% for 30 min and then incubated for 30 min with the horse anti-mouse biotinylated antibody (diluted at 1/50 in BSA 1%, Vector, Burlingame, California), rinsed in DPBS and incubated in a solution of streptavidine-Alexafluor®488 (diluted at 1/200, Molecular Probes) for 30 min and rinsed in DPBS. Glass coverslips were finally mounted in Fluorescence Mounting Medium (Dako, les Ulis, France).

For membranous RANKL immunostainings, confluent CF and non-CF osteoblasts with and without TNF- α stimulation were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min, without Triton X100, then washed twice with DPBS. Cells were blocked for 1 h in BSA 3% before incubation for 1 h with the mouse IgG2B anti-human RANKL monoclonal antibody (1/50 diluted in BSA 1%, clone 70525, R&D Systems, Lille, France). After washing twice with DPBS cells were blocked with BSA 3% for 30min and then incubated for 30min with the goat anti-mouse biotinylated antibody (diluted at 1/50 in BSA 1%, Vector), rinsed in DPBS and incubated in a solution of streptavidin-AlexaFluor®488 (diluted at 1/200, Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) for 30 min and rinsed in DPBS. After rinsing cells, nuclei were counterstained for 5 min with DAPI (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France). Glass coverslips were finally mounted (Fluorescent Mounting Medium, Dako, les Ulis, France). Controls consisting of identical procedure without the step of first antibody to assess non-specific background.

The immunofluorescence experiments were repeated at least four times under TNF- α stimulation. Immunofluorescence images were obtained using a Zeiss Axiovert 200M microscope system (Carl Zeiss, Marly le Roi, France).

Transmission electron microscopy

For ultrastructural microscopy examinations of CF and non-CF osteoblasts, cultured cells were detached using trypsin-EDTA (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France), pelleted and then fixed in 2.5% glutaraldehyde for 1 h at room temperature. After rinsing, cells were embedded in a drop of 5% BSA in dH₂O, by addition of 50 μ L of 25% glutaraldehyde. They were post-fixed in 2% osmium tetroxide for 1 h at 4°C, dehydrated in a graded series of ethanol and embedded using an Agar 100 resin kit (Agar Scientific, Elektron Technology, Cambridge, UK) following manufacturer's instructions. Ultrathin sections (70 nm, obtained using a Reichert Ultracut E ultramicrotome with a Diatome diamond knife) were examined with a JEOL 2100 FEG STEM (JEOL, Croissy sur Seine, France) operating at 200 kV.

Statistics

The significance of the results was first assessed with non-parametric Kruskal-Wallis test followed by *post-hoc* exact, non-parametric, Wilcoxon-Mann-Whitney test (StatXact 7.0, Cytel Inc). Stratification was used when appropriate. We used non-parametric statistics owing to a lack of normal distribution of the assessed variables. Stratification allowed the impact of donor variability to be taken into account. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Les principaux résultats obtenus lors de cette étude sont les suivants :

- La production de la protéine RANKL est augmentée dans les ostéoblastes F508del. RANKL est présent de façon importante dans la membrane cellulaire.
- La stimulation pro-inflammatoire exacerbe la production de RANKL dans les ostéoblastes F508del mais ces derniers ne sont pas capables d'augmenter leur production d'OPG, notamment en réponse au TNF- α .
- En conséquence, le ratio RANKL/OPG est déséquilibré dans les ostéoblastes F508del et ce déséquilibre est aggravé par les conditions pro-inflammatoires.
- L'inhibition pharmacologique de CFTR dans des ostéoblastes normaux entraîne des résultats similaires sur les productions d'OPG et de RANKL et,
- L'utilisation du correcteur C18 permet une diminution de la production de RANKL dans les ostéoblastes F508del, dans des conditions inflammatoires et non-inflammatoires.

Nos résultats permettent de montrer que la voie RANK/RANKL/OPG est fortement impactée dans les ostéoblastes possédant le canal F508del-CFTR. Cette dérégulation conduit à un ratio RANKL/OPG augmenté qui pourrait indiquer une favorisation de l'ostéoclastogénèse et donc de la résorption osseuse. De plus, alors que la maladie osseuse de la mucoviscidose est souvent considérée comme une conséquence des autres symptômes de la maladie et de leurs traitements, nos résultats montrent que l'absence de fonctionnalité du canal CFTR a un rôle direct dans ces dérégulations même si les mécanismes à l'origine de celles-ci restent à éclaircir. Nous avons également montré que l'environnement pro-inflammatoire, caractéristique de la maladie, a également un impact sur la fonctionnalité des ostéoblastes F508del et peut aggraver les dysfonctionnements observés.

Enfin nous avons mis en évidence que l'utilisation du correcteur et potentiateur de CFTR, le C18, qui est un analogue structural de la molécule Vx809 (Lumacaftor) permet de diminuer la production de RANKL et ainsi corriger au moins de façon partielle le ratio RANKL/OPG suggérant que ces molécules sont des stratégies thérapeutiques intéressantes. De façon étonnante, le couple de molécules Vx770 et Vx809 (Orkambi[®]) n'a pas montré d'effet significatif sur le niveau de production de RANKL.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

La maladie osseuse représente un véritable problème de prise en charge du patient CF, jeune et adulte. Plus de 50% des patients adultes présentent un phénomène d'ostéopénie ou d'ostéoporose (141). Le problème osseux des patients a longtemps été sous-estimé. D'une part car l'espérance de vie relativement basse des patients n'en faisait pas un facteur de risque majeur, et d'autre part parce que de nombreux cofacteurs liés aux symptômes et à leurs traitements pouvaient avoir un impact sur le métabolisme osseux (141,143). Il était donc admis qu'un phénomène de résorption excessive, lié à un nombre élevé de précurseurs ostéoclastiques observé durant les phases d'exacerbations pulmonaires était responsable de la maladie osseuse associée à la mucoviscidose (CFBD) (158,190). Cependant plusieurs études cliniques, mais également fondamentales, ont montré que les mutations du gène *CFTR*, et notamment la mutation F508del, étaient directement impliquées dans la perte osseuse observée chez les patients et qu'elles pouvaient être responsables d'un défaut de formation osseuse (152,158). Afin de compiler les informations les plus récentes sur ces aspects nous avons, dans le cadre de cette thèse, publié une revue intitulée: « *Bone disease in cystic fibrosis: new pathogenic insights opening novel therapies* » (annexe 1).

Les deux acteurs cellulaires majeurs du remodelage osseux sont les ostéoblastes et les ostéoclastes. Les premiers pour leur capacité de formation, et les seconds pour leur capacité de résorption osseuse (3). Ce remodelage osseux assure le renouvellement tissulaire et est finement régulé. Des interactions directes ou indirectes entre ostéoblastes et ostéoclastes permettent de coordonner l'action de ces deux types cellulaires (89,205,206). Des études basées sur des ostéoblastes murins dont le gène *CFTR* a été déléte ou porte la mutation F508del ont montré une dysfonction de la voie wnt/ β -caténine (207). De plus un modèle cellulaire d'ostéoblastes primaires humains dont l'activité de *CFTR* a été bloquée de façon pharmacologique montre une diminution de la production d'OPG rejoignant l'hypothèse que la voie wnt/ β -caténine pourrait être impactée par l'absence de fonctionnalité de *CFTR* (193). L'étude de ces « communications », sur la base de modèles cellulaires porteurs de la mutation F508del *in vitro*, est donc nécessaire pour mieux appréhender les mécanismes responsables de la pathologie osseuse des patients.

- Les ostéoblastes F508del-CFTR

Les interactions entre le récepteur RANK, présent à la surface des ostéoclastes et leurs précurseurs, et RANKL qui est produit par les ostéoblastes, sont primordiales pour la différenciation et l'activation des ostéoclastes (58). Les ostéoblastes produisent également un antagoniste à RANKL, l'OPG qui permet de limiter l'interaction RANKL/RANK en se fixant à RANKL. Ainsi, c'est majoritairement le ratio de ces deux cytokines RANKL/OPG qui va permettre une régulation du remodelage osseux (208–210). Dans notre modèle de culture *in vitro* utilisant des ostéoblastes primaires humains, nous avons montré que l'expression des gènes ainsi que la production des cytokines RANKL et OPG sont dérégulées dans les ostéoblastes F508del-CFTR, entraînant une augmentation du ratio RANKL/OPG aussi bien au niveau des ARNm que des protéines. Cette dérégulation, notamment *via* l'augmentation de la production de RANKL, pourrait être à l'origine d'une augmentation de l'ostéoclastogénèse et d'une élévation de l'activité de résorption osseuse des ostéoclastes (211–214). Cependant afin d'exercer son action pro-ostéoclastogénique RANKL doit être exprimé à la membrane des ostéoblastes afin de se lier à RANK (215,216). Dans notre étude nous avons montré que les ostéoblastes portant la mutation F508del sur CFTR présentent une expression membranaire de RANKL bien plus importante que des ostéoblastes non mutés.

Dans la mucoviscidose, l'accumulation du mucus dans le tractus respiratoire crée un terrain propice aux infections pulmonaires, qui vont devenir récidivantes et entraîner un phénomène inflammatoire chronique des voies respiratoires (217,218). Ainsi plusieurs cytokines pro-inflammatoires vont être trouvées en concentration élevée dans les expectorations, lavages broncho-alvéolaires et sérums de patients atteints de mucoviscidose, dont le TNF- α et l'IL-17 (219–222). De façon générale, un contexte inflammatoire, et plus spécifiquement ces deux cytokines, sont connues pour avoir un impact important sur le métabolisme osseux en favorisant l'ostéoclastogénèse (223–226). Le TNF- α est une cytokine polymorphique et, dans la mucoviscidose, certains génotypes sont associés avec une forte production de cette cytokine et une réduction de la densité minérale osseuse (DMO) (227). Dans nos études, nous avons montré qu'en la présence de ces deux médiateurs pro-inflammatoires, TNF- α et IL-17, la dérégulation du ratio RANKL/OPG est exacerbée dans les ostéoblastes F508del-CFTR. Ce phénomène est dû à une augmentation de la production de RANKL, avec une localisation membranaire plus importante, et une incapacité à augmenter la production d'OPG en contrepartie. Cette observation conforte l'hypothèse d'un lien direct entre la mutation F508del-CFTR, la production de RANKL et certaines cytokines pro-inflammatoires comme suggéré dans d'autres études (253,224).

La forte expression membranaire de RANKL, que nous avons identifiée dans les ostéoblastes F508del suggère, une facilitation à l'activation des ostéoclastes et à la résorption osseuse chez les patients CF. Une perspective très intéressante à notre travail pourrait-être de neutraliser l'effet de la surexpression de RANKL à l'aide d'anticorps spécifiques (Dénosumab, Amgen) ou, sur la base d'une étude récente, en utilisant des fragments solubles d'un nouveau récepteur à RANKL (228).

Les cytokines pro-inflammatoires ne sont pas les seuls médiateurs impliqués dans la régulation de la triade RANK-RANKL-OPG. En effet, la PGE2 notamment est également fortement impliquée dans le métabolisme osseux. Cette prostaglandine est connue pour intervenir à la fois sur la résorption et la formation osseuse (73). Son action pro-ostéoclastogène a principalement été montrée dans des modèles animaux ou cellulaires murins (229–231) mais est peu décrite chez l'homme (232). Dans ces modèles, la PGE2 entraîne une augmentation de la production de RANKL (230,230) alors qu'un effet opposé (à savoir une action inhibitrice de l'ostéoclastogénèse) a été observé chez l'homme (78). Dans notre modèle d'ostéoblastes primaires humains, nous avons montré que l'expression du gène codant la COX-2, une enzyme permettant la synthèse de la prostaglandine E2 (PGE2), était fortement diminuée dans les ostéoblastes portant la mutation F508del. De même, la synthèse de PGE2 était effondrée dans les cultures d'ostéoblastes F508del, or, la PGE2 influence également la formation osseuse *via* la voie wnt/ β -caténine en régulant l'expression de la sclérostine, un inhibiteur majeur de cette voie (76,233,234). Elle favorise ainsi la transcription du gène codant l'OPG contrôlée par la translocation de la β -caténine. Cette diminution de synthèse de la PGE2 pourrait expliquer en partie les défauts de production d'OPG également observés dans notre modèle.

Il existe quatre récepteurs connus pour la PGE2, nommés EP1R à EP4R. L'action de la PGE2 sur la formation osseuse est principalement liée à la signalisation de PGE2 *via* les récepteurs EP2R et EP4R (73,76). L'inhibition de l'ostéoclastogénèse par la PGE2 chez l'homme semble médiée par ces mêmes récepteurs (78). Nous avons observé que le profil d'expression des quatre récepteurs à la PGE2 était modifié dans les ostéoblastes F508del (résultats non publiés). Nous avons ainsi noté que l'expression de tous les récepteurs est diminuée lorsque la cellule porte la mutation F508del, l'EP3R étant le plus fortement impacté, ceci pouvant entraîner un défaut de signalisation intracellulaire et donc participer au retard de formation osseuse. Ces résultats, obtenus à l'échelle transcriptionnelle, doivent cependant être confirmés à l'échelle protéique. Il serait également très intéressant d'identifier précisément les acteurs moléculaires en aval des récepteurs susceptibles d'être impactés dans le cadre de la mucoviscidose.

Les phénomènes de résorption et formation osseuse sont finement régulés et coordonnés afin d'assurer l'homéostasie tissulaire osseuse (33). Le ratio RANKL/OPG est un marqueur important du remodelage osseux, notamment dans le cas de la réparation de fracture (206). De fait l'observation, dans notre modèle, d'un ratio RANKL/OPG élevé suggère une possible augmentation de la différenciation et de l'activation des ostéoclastes suivie d'une élévation de la résorption osseuse chez les patients CF (235). En réponse à cette activité ostéoclastique accrue, le maintien de l'homéostasie nécessiterait idéalement une réponse tissulaire tendant vers une augmentation de la synthèse et de la libération de facteurs favorisant l'ostéoblastogénèse. Or, la sphingosine 1 phosphate (S1P), synthétisée et sécrétée par les ostéoclastes *via* l'action d'une enzyme, la sphingosine kinase 1 (SPHK1), est un puissant inducteur de la formation osseuse et les ostéoblastes sont décrits comme exprimant les récepteurs à la S1P (236). Cette dernière active la voie wnt/ β -caténine et agit sur la différenciation ostéoblastique et la synthèse d'OPG (237,238). La S1P permet également une induction de la COX-2 et stimule ainsi la synthèse de PGE2 qui conduit à une augmentation de la production de RANKL (95). Par ailleurs, RANKL est un facteur augmentant l'activité de la kinase SPHK1, aboutissant à une boucle de régulation entre les ostéoblastes et les ostéoclastes (95). Aussi, nous formulons l'hypothèse que le manque de formation osseuse chez les patients CF pourrait être dû, entre autres, à un défaut de signalisation par la S1P. Dans la poursuite de ces travaux de thèse, nous aimerions donc tester cette hypothèse par l'étude de l'expression des récepteurs à la S1P, et évaluer l'effet de cette dernière sur l'activité des ostéoblastes F508del et plus particulièrement sur l'évolution du ratio RANKL/OPG et la production de PGE2.

En plus de l'effet de médiateurs peptidiques et lipidiques à activité autocrine et/ou paracrine, la régulation du métabolisme osseux peut également s'opérer directement au cœur des cellules par l'action des micro ARN (miRNA) (80). En effet, de nombreux miRNA ont été identifiés dans la régulation des facteurs de transcription intervenant dans les différentes périodes de la prolifération, différenciation et maturation des ostéoblastes, ainsi que dans certaines pathologies osseuses (80,239). Certains de ces miRNA, miR-101 et miR-146a notamment, ont été identifiés comme directement impliqués dans la régulation de la signalisation par la voie des prostaglandines en limitant l'expression de COX-2 et donc la synthèse de PGE2 (82,83).

De façon intéressante il a été montré, dans des cellules épithéliales nasales de patients atteints de mucoviscidose, que certains miRNA sont surexprimés et que leur inhibition par des oligonucléotides bloquant permet une stabilisation de l'expression des ARNm de F508del-CFTR ainsi qu'une augmentation de sa fonction de canal anionique (240). D'autres équipes ont montré des taux élevés des miR-145, -223, et -494 dans des épithélia bronchiques de patients porteurs de la mutation F508del, qui sont associés à une réduction de l'expression de CFTR

(241). Nos premières données obtenues par un profil miRNome avec la collaboration du laboratoire de Génétique de Maladies Rares, EA 7402 Université de Montpellier, indiquent que l'expression de plusieurs catégories de miRNA ciblant des gènes de différenciation et de maturation ostéoblastique est très différente (soit augmentée, soit diminuée) entre les ostéoblastes F508del primaires de patients CF comparés à des ostéoblastes normaux. L'expression de certains gènes ostéoblastiques pourrait ainsi être réprimée par une surexpression de miRNA, liée à la mutation F508del-CFTR. Aussi, l'inhibition de ces miRNA pourrait libérer des facteurs ostéoblastiques capables de corriger la fonction ostéoblastique. Nous souhaiterions donc approfondir cette hypothèse *via* l'étude du rôle de certains miRNA dans la pathologie osseuse associée à la mucoviscidose par des méthodes de transfection de miRNA ou d'oligonucléotides bloquant.

Au-delà de toutes ces cibles thérapeutiques potentielles pour corriger la CFBD, notre première intention reste de corriger l'activité CFTR dans les ostéoblastes. Aujourd'hui, deux traitements pour les patients atteints de mucoviscidose disposent d'une autorisation temporaire d'utilisation : Kalydeco[®], destiné aux patients portant la mutation G551D, et Orkambi[®], proposé aux patients homozygotes pour la mutation F508del. Ces traitements, basés sur des molécules correctrices et potentiatrices de CFTR visent à permettre la restauration de la synthèse de CFTR malgré les mutations (correcteurs) puis à améliorer son activation après son acheminement à la membrane plasmique (potentiateurs) (186,242). La société Vertex Pharmaceuticals qui produit déjà les deux premiers traitements disponibles continue de concevoir de nouvelles molécules et d'étudier leur efficacité. Ainsi le C18 (un analogue de Vx809, Lumacaftor) et Vx661 sont en cours d'étude. De nombreuses autres molécules ont montré, à minima *in vitro* qu'elles possédaient une action correctrice de CFTR, au moins partiellement. La molécule N91115, produite par la société Nivalis Therapeutics est notamment présentée comme une nouvelle classe de molécule : un stabilisateur de CFTR. Cette molécule diminue l'action de chaperonnes qui sont responsables de la dégradation de CFTR. Son mécanisme d'action étant différent des correcteurs et potentiateurs de CFTR ; son efficacité a été testée en association avec ces molécules et une étude préclinique a permis de montrer que le N91115 entraîne une amélioration de la fonction de CFTR en association avec des correcteurs et potentiateurs de CFTR. Dans une étude clinique, la molécule N91115 a montré qu'elle était bien tolérée par les patients et elle est actuellement en cours d'essai clinique de phase 2 en association avec Orkambi[®] (243).

D'autres molécules ont également montré *in vitro* une amélioration de l'acheminement de la protéine F508del-CFTR à la membrane en limitant sa dégradation par le protéasome. La roscovitine par exemple, qui permet également d'améliorer l'activité antibactérienne des

macrophages et stimuler l'apoptose des neutrophiles, contrôle ainsi à la fois les infections et l'inflammation chronique (240). De même, le Miglustat® (Actélon), qui est utilisé dans la maladie de Gaucher, est capable d'améliorer *in vivo* le statut osseux de modèles murins porteurs de la mutation F508del-CFTR en améliorant la formation et l'architecture osseuse (201). Sur notre modèle d'ostéoblastes mutés F508del-CFTR nous avons montré que l'utilisation de molécules correctrices de CFTR (le Vx809 et le C18) permettent de restaurer l'activité de canal chlorure de F508del-CFTR ainsi que corriger le ratio des ARNm de RANKL/OPG et l'expression de COX-2 de même que la production de PGE2. Dans ce même modèle nous avons également montré que l'ajout de C18 qui présente à la fois une activité correctrice et potentiatrice de CFTR permet de corriger la production de RANKL des ostéoblastes portant la mutation F508del-CFTR en la ramenant à un niveau similaire à celle d'ostéoblastes non mutés. Ce résultat n'est cependant pas retrouvé lorsque de l'utilisation du couple de molécules correctrices et potentiatrices Vx770 et Vx809, qui sont les principes actifs d'Orkambi®. Bien que présenté pour corriger le défaut de CFTR dû à la mutation F508del dans le tissu respiratoire, ce couple de molécules semble donc avoir un effet limité sur le métabolisme osseux. De plus l'utilisation d'Orkambi® chez les patients homozygotes F508del, bien qu'efficace, présente une amélioration plus modeste sur certains paramètres de la pathologie (FEV₁, IMC, exacerbations pulmonaires) que l'utilisation de Kalydeco® chez les patients portant la mutation G551D (187,242). Cela pourrait refléter la nécessité d'une classification plus approfondie des mutations causant la mucoviscidose. En effet certaines mutations présentent des caractéristiques de plusieurs classes de la classification actuelle. Ainsi la protéine F508del-CFTR qui est répertoriée comme une mutation de classe II, car retenue par le réticulum endoplasmique et dégradée par le protéasome présente également des spécificités des mutations de classe III et de classe IV (245).

La réduction de la production de RANKL par le correcteur C18 est également présente lors d'une stimulation pro-inflammatoire au TNF- α et tend même à être plus marquée. Cela pourrait être directement dû à un effet du TNF- α qui a été montré *in vitro* dans des cellules HeLa et des cellules épithéliales bronchiques de patients F508del. Dans ces cellules, sur des temps courts tels que ceux que nous utilisons, il a été montré que le TNF- α était capable de permettre l'expression membranaire de la protéine F508del-CFTR et de la rendre fonctionnelle (246).

Cette diminution de la production de RANKL pourrait améliorer le remodelage osseux et ainsi restaurer la formation et la qualité osseuse. Une récente étude rétrospective clinique, bien que basée sur une petite cohorte de patients, a montré pour la première fois que l'utilisation d'une molécule potentiatrice de CFTR chez des patients portant la mutation G551D permet une nette amélioration de leur statut osseux, se traduisant notamment par une élévation de leur DMO au

niveau des vertèbres lombaires (annexe 2). L'amélioration d'autres symptômes avec le potentiateur de CFTR, le Vx770 (Ivacaftor), comme les statuts nutritionnels et respiratoires peuvent également avoir un impact sur le métabolisme osseux. Cependant, dans cette étude, ni l'indice de masse corporel ni le volume expiratoire maximal en 1 seconde ne sont corrélés avec l'amélioration observée de la DMO. De plus pendant la durée du traitement aucun de ces patients n'a eu de supplémentation en vitamine D ni de traitements aux biphosphonates ou aux hormones sexuelles stéroïdiennes. L'utilisation de molécules correctrices de CFTR chez les patients atteints de mucoviscidose semble donc être une stratégie thérapeutique intéressante qui nécessite de plus amples investigations.

- Etudes fonctionnelles des ostéoclastes F508del-CFTR

Afin d'appréhender au mieux les interactions entre les ostéoclastes et les ostéoblastes dans la pathologie osseuse associée à la mucoviscidose, nous avons commencé à développer un modèle d'étude des ostéoclastes F508del-CFTR. Nos objectifs sont d'analyser l'impact de la mutation F508del sur le phénotype des précurseurs ostéoclastiques, la formation puis l'activité de résorption osseuse des ostéoclastes matures F508del. Dans la mesure où de plus en plus de patients CF auront un traitement avec des correcteurs de CFTR, il devient nécessaire d'évaluer les modifications de l'activité des ostéoclastes engendrées par la présence de ces correcteurs. Pour cela, nous utiliserons des cellules mononuclées (PBMC) issus du sang périphérique des patients CF qui seront différenciées en ostéoclastes *in vitro* par l'adjonction de M-CSF et RANKL (61).

Une de nos perspectives sera de mettre en place un système de cocultures afin d'appréhender au mieux les interactions entre les ostéoblastes et les ostéoclastes qui sont les deux principaux acteurs du remodelage osseux. Il sera ainsi intéressant d'étudier la capacité des ostéoblastes F508del à induire la différenciation des ostéoclastes et réciproquement. Par ailleurs, une étude récente a montré, chez la souris, que les ostéoblastes issus d'os plats (calvaria) entraînent l'apparition d'un plus grand nombre d'ostéoclastes que les ostéoblastes issus des os longs (247). Or pour la culture d'ostéoblastes, les tissus osseux issus de patients CF que nous récupérons habituellement sont des fragments de côtes ou de sternum (os plats) obtenus lors de transplantations pulmonaires. Nous voudrions donc évaluer leur capacité à promouvoir l'ostéoclastogénèse par rapport à des ostéoblastes venant d'autres sites osseux.

Ayant observé une dérégulation du ratio RANKL/OPG chez les ostéoblastes F508del, un modèle de coculture nous permettrait également d'évaluer l'impact de l'évolution du rapport

RANKL/OPG sur la différenciation et l'activation des ostéoclastes F508del en comparaison à des ostéoclastes non porteurs de mutations sur le gène *CFTR*. De plus, la signalisation par la S1P modulant la production de RANKL et d'OPG (95,236), elle pourrait participer à la dérégulation du ratio de ces deux cytokines. Un défaut de signalisation par la voie S1P pourrait ainsi expliquer, au moins partiellement, le découplage entre la formation et la résorption osseuse qui est observé chez les patients atteints de mucoviscidose. Il sera donc intéressant de comparer la production de S1P par les ostéoclastes F508del avec celle d'ostéoclastes non mutés, complétant ainsi l'étude envisagée de la voie de signalisation par le S1P par l'évaluation du profil d'expression des récepteurs à la S1P dans les ostéoblastes F508del.

Enfin, des études sur des interactions entre les ostéoblastes et les ostéoclastes, portant ou non la mutation F508del, pourront être complétées par une évaluation de l'impact de correcteurs et potentiateurs de *CFTR* comme le C18 pour lequel une efficacité sur les ostéoblastes F508del a déjà été montrée.

Les perspectives des travaux de cette thèse ont pour but de proposer, à court terme, des correcteurs de *CFTR* permettant de rééquilibrer le remodelage osseux et la formation osseuse dans la mucoviscidose. Améliorer le statut osseux permettra d'augmenter la durée et la qualité de vie des patients jeunes et adultes atteints de mucoviscidose.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. OLSZTA MJ, CHENG X, JEE SS, KUMAR R, KIM Y-Y, KAUFMAN MJ, et al.
Bone structure and formation: A new perspective.
Mater Sci Eng R Rep. 2007;58(3–5):77–116.
2. AnatomyAndPhysiology-OP.pdf
https://openstaxcollege.org/files/textbook_version/hi_res_pdf/13/AnatomyAndPhysiology-OP.pdf
3. CLARKE B.
Normal Bone Anatomy and Physiology.
Clin J Am Soc Nephrol CJASN. 2008 Nov;3(Suppl 3):S131–9.
4. BROTT M, BONEWALD L.
Bone and muscle: Interactions beyond mechanical.
Bone. 2015 Nov;80:109–14.
5. SHAKER JL, DEFTOS L.
Calcium and Phosphate Homeostasis.
In: De Groot LJ, Beck-Peccoz P, Chrousos G, Dungan K, Grossman A, Hershman JM, et al.,
Editors : Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000
6. TALMAGE DW, TALMAGE RV.
Calcium homeostasis: how bone solubility relates to all aspects of bone physiology.
J Musculoskelet Neuronal Interact. 2007;7(2):108–12.
7. VAN DER EERDEN BCJ, TETI A, ZAMBUZZI WF.
Bone, a dynamic and integrating tissue.
Arch Biochem Biophys. 2014;561:1–2.
8. SEITA J, WEISSMAN IL.
Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation.
Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med. 2010;2(6):640–53.
9. LECKA-CZERNIK B.
Marrow fat metabolism is linked to the systemic energy metabolism.
Bone. 2012;50(2):534–9.
10. DWEK JR.
The periosteum: what is it, where is it, and what mimics it in its absence?
Skeletal Radiol. 2010;39(4):319–23.
11. BOSKEY AL.
Bone composition: relationship to bone fragility and antiosteoporotic drug effects.
BoneKEy Rep. 2013;2:447.
12. DIRCKX N, VAN HUL M, MAES C.
Osteoblast recruitment to sites of bone formation in skeletal development, homeostasis, and regeneration.
Birth Defects Res Part C Embryo Today Rev. 2013;99(3):170–91.

13. NEVE A, CORRADO A, CANTATORE FP.
Osteoblast physiology in normal and pathological conditions.
Cell Tissue Res. 2010;343(2):289–302.
14. FAKHRY M, HAMADE E, BADRAN B, BUCHET R, MAGNE D.
Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts.
World J Stem Cells. 2013;5(4):136–48.
15. KOMORI T.
Signaling networks in RUNX2-dependent bone development.
J Cell Biochem. 2011;112(3):750–5.
16. TITORENCU I, PRUNA V, JINGA VV, SIMIONESCU M.
Osteoblast ontogeny and implications for bone pathology: an overview.
Cell Tissue Res. 2013;355(1):23–33.
17. YANG Y, HUANG Y, ZHANG L, ZHANG C.
Transcriptional regulation of bone sialoprotein gene expression by *Osx*.
Biochem Biophys Res Commun. 2016 Aug 5;476(4):574–9.
18. LONG F.
Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage.
Nat Rev Mol Cell Biol. 2012;13(1):27–38.
19. RIOS HF, YE L, DUSEVICH V, EICK D, BONEWALD LF, FENG JQ.
DMP1 is essential for osteocyte formation and function.
J Musculoskelet Neuronal Interact. 2005;5(4):325–7.
20. JACQUOT J, DELION M, GANGLOFF S, BRAUX J, VELARD F.
Bone disease in cystic fibrosis: new pathogenic insights opening novel therapies.
Osteoporos Int. 2016;27(4):1401–12.
21. FRANZ-ODENDAAL TA, HALL BK, WITTEN PE.
Buried alive: How osteoblasts become osteocytes.
Dev Dyn. 2006;235(1):176–90.
22. CAPULLI M, PAONE R, RUCCI N.
Osteoblast and osteocyte: Games without frontiers.
Arch Biochem Biophys. 2014;561:3–12.
23. PAJEVIC PD, SPATZ JM, GARR J, ADAMSON C, MISENER L.
Osteocyte biology and space flight.
Curr Biotechnol. 2013;2(3):179–83.
24. BONEWALD LF.
The Amazing Osteocyte.
J Bone Miner Res. 2011;26(2):229–38.
25. SCHAFFLER MB, CHEUNG W-Y, MAJESKA R, KENNEDY O.
Osteocytes: Master Orchestrators of Bone.
Calcif Tissue Int. 2014;94(1):5–24.
26. ERIKSEN EF.
Cellular mechanisms of bone remodeling.
Rev Endocr Metab Disord. 2010;11(4):219–27.

27. BOYLE WJ, SIMONET WS, LACEY DL.
Osteoclast differentiation and activation.
Nature. 2003;423(6937):337–42.
28. EDWARDS JR, MUNDY GR.
Advances in osteoclast biology: old findings and new insights from mouse models.
Nat Rev Rheumatol. 2011;7(4):235–43.
29. KIM JH, KIM N.
Signaling Pathways in Osteoclast Differentiation.
Chonnam Med J. 2016;52(1):12–7.
30. BOYCE BF, ROSENBERG E, DE PAPP AE, DUONG LT.
The osteoclast, bone remodelling and treatment of metabolic bone disease.
Eur J Clin Invest. 2012;42(12):1332–41.
31. KIKUTA J, ISHII M.
Osteoclast migration, differentiation and function: novel therapeutic targets for rheumatic diseases.
Rheumatology. 2013;52(2):226–34.
32. BARRÈRE F, VAN BLITTERSWIJK CA, DE GROOT K.
Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics.
Int J Nanomedicine. 2006;1(3):317–32.
33. SHERMAN VR, YANG W, MEYERS MA.
The materials science of collagen.
J Mech Behav Biomed Mater. 2015;52:22–50.
34. ALLISTON T.
Biological Regulation of Bone Quality.
Curr Osteoporos Rep. 2014;12(3):366–75.
35. MORGAN S, POUNDARIK AA, VASHISHTH D.
Do Non-collagenous Proteins Affect Skeletal Mechanical Properties?
Calcif Tissue Int. 2015;97(3):281–91.
36. NEVE A, CORRADO A, CANTATORE FP.
Osteocalcin: Skeletal and extra-skeletal effects.
J Cell Physiol. 2013;228(6):1149–53.
37. GORSKI JP.
Biom mineralization of bone: a fresh view of the roles of non-collagenous proteins.
Front Biosci Landmark Ed. 2011;16:2598–621.
38. MONFOULET L, MALAVAL L, AUBIN JE, RITTLING SR, GADEAU AP, FRICAIN JC, et al.
Bone sialoprotein, but not osteopontin, deficiency impairs the mineralization of regenerating bone during cortical defect healing.
Bone. 2010;46(2):447–52.
39. GORDON JAR, TYE CE, SAMPAIO AV, UNDERHILL TM, HUNTER GK, GOLDBERG HA.
Bone sialoprotein expression enhances osteoblast differentiation and matrix mineralization in vitro.
Bone. 2007;41(3):462–73.

40. GRAMOUN A, AZIZI N, SODEK J, HEERSCHE JNM, NAKCHBANDI I, MANOLSON MF.
Fibronectin inhibits osteoclastogenesis while enhancing osteoclast activity via nitric oxide and interleukin-1 β -mediated signaling pathways.
J Cell Biochem. 2010;111(4):1020–34.
41. STOCK SR.
The Mineral–Collagen Interface in Bone.
Calcif Tissue Int. 2015;97(3):262–80.
42. BALA Y, FARLAY D, DELMAS PD, MEUNIER PJ, BOIVIN G.
Time sequence of secondary mineralization and microhardness in cortical and cancellous bone from ewes.
Bone. 2010;46(4):1204–12.
43. KHOSHNIAT S, BOURGINE A, JULIEN M, WEISS P, GUICHEUX J, BECK L.
The emergence of phosphate as a specific signaling molecule in bone and other cell types in mammals.
Cell Mol Life Sci. 2010;68(2):205–18.
44. DVORAK-EWELL MM, CHEN T-H, LIANG N, GARVEY C, LIU B, TU C, et al.
Osteoblast Extracellular Ca²⁺-Sensing Receptor Regulates Bone Development, Mineralization and Turnover.
J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res. 2011;26(12):2935–47.
45. DVORAK MM, SIDDIQUA A, WARD DT, CARTER DH, DALLAS SL, NEMETH EF, et al.
Physiological changes in extracellular calcium concentration directly control osteoblast function in the absence of calciotropic hormones.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(14):5140–5.
46. BARON R.
Anatomy and Ultrastructure of Bone – Histogenesis, Growth and Remodeling.
In: De Groot LJ, Beck-Peccoz P, Chrousos G, Dungan K, Grossman A, Hershman JM, et al.,
Editors : Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000
47. <https://global.britannica.com/science/bone-remodeling> consulté le 18/05/2016
48. MARTIN TJ, UDAGAWA N.
Hormonal Regulation of Osteoclast Function.
Trends Endocrinol Metab. 1998;9(1):6–12.
49. LEE NK.
Molecular Understanding of Osteoclast Differentiation and Physiology.
Endocrinol Metab. 2010;25(4):264.
50. VÄÄNÄNEN HK, LAITALA-LEINONEN T.
Osteoclast lineage and function.
Arch Biochem Biophys. 2008;473(2):132–8.
51. TOUITAHUATA H, BLANGY A, VIVES V.
Modulation of osteoclast differentiation and bone resorption by Rho GTPases.
Small GTPases. 2014;5:e28119.
52. RODAN SB, DUONG LT.
Cathepsin K – A new molecular target for osteoporosis.
IBMS BoneKEy. 2008;5(1):16–24.

53. ABDELGAWAD ME, DELAISSE J-M, HINGE M, JENSEN PR, ALNAIMI RW, ROLIGHED L, et al.
Early reversal cells in adult human bone remodeling: osteoblastic nature, catabolic functions and interactions with osteoclasts.
Histochem Cell Biol. 2016;145(6):603–15.
54. DELAISSE J-M.
The reversal phase of the bone-remodeling cycle: cellular prerequisites for coupling resorption and formation.
BoneKEy Reports. 2014;3:561.
55. EVERTS V, DELAISSÉ JM, KORPER W, JANSEN DC, TIGCHELAAR-GUTTER W, SAFTIG P, et al.
The Bone Lining Cell: Its Role in Cleaning Howship's Lacunae and Initiating Bone Formation.
J Bone Miner Res. 2002;17(1):77–90.
56. HESSLE L, JOHNSON KA, ANDERSON HC, NARISAWA S, SALI A, GODING JW, et al.
Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization.
Proc Natl Acad Sci. 2002;99(14):9445–9.
57. IKEDA T, KASAI M, UTSUYAMA M, HIROKAWA K.
Determination of Three Isoforms of the Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand and Their Differential Expression in Bone and Thymus.
Endocrinology. 2001;142(4):1419–26.
58. BOYCE BF, XING L.
Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin.
Arthritis Res Ther. 2007;9(Suppl 1):S1.
59. KEARNS AE, KHOSLA S, KOSTENUIK PJ.
Receptor Activator of Nuclear Factor κ B Ligand and Osteoprotegerin Regulation of Bone Remodeling in Health and Disease.
Endocr Rev. 2008;29(2):155–92.
60. KULAR J, TICKNER J, CHIM SM, XU J.
An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level.
Clin Biochem. 2012;45(12):863–73.
61. LACEY DL, TIMMS E, TAN H-L, KELLEY MJ, DUNSTAN CR, BURGESS T, et al.
Osteoprotegerin Ligand Is a Cytokine that Regulates Osteoclast Differentiation and Activation.
Cell. 1998;93(2):165–76.
62. NAKASHIMA T, KOBAYASHI Y, YAMASAKI S, KAWAKAMI A, EGUCHI K, SASAKI H, et al.
Protein Expression and Functional Difference of Membrane-Bound and Soluble Receptor Activator of NF- κ B Ligand: Modulation of the Expression by Osteotropic Factors and Cytokines.
Biochem Biophys Res Commun. 2000;275(3):768–75.
63. O'BRIEN CA.
Control of RANKL gene expression.
Bone. 2010;46(4):911–9.
64. XU F, TEITELBAUM SL.
Osteoclasts: New Insights.
Bone Res. 2013;1(1):11–26.

65. ARMSTRONG AP, TOMETSKO ME, GLACCUM M, SUTHERLAND CL, COSMAN D, DOUGALL WC. A RANK/TRAF6-dependent Signal Transduction Pathway Is Essential for Osteoclast Cytoskeletal Organization and Resorptive Function. *J Biol Chem.* 2002;277(46):44347–56.
66. SCHOLTYSEK C, KATZENBEISSER J, FU H, UDERHARDT S, IPSEIZ N, STOLL C, et al. PPAR β/δ governs Wnt signaling and bone turnover. *Nat Med.* 2013;19(5):608–13.
67. BARON R, KNEISSEL M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat Med.* 2013;19(2):179–92.
68. MOVÉRARE-SKRTIC S, HENNING P, LIU X, NAGANO K, SAITO H, BÖRJESSON AE, et al. Osteoblast-derived WNT16 represses osteoclastogenesis and prevents cortical bone fragility fractures. *Nat Med.* 2014;20(11):1279–88.
69. AMBROSZKIEWICZ J, SANDS D, GAJEWSKA J, CHELCHOWSKA M, LASKOWSKA-KLITA T. Bone turnover markers, osteoprotegerin and RANKL cytokines in children with cystic fibrosis. *Adv Med Sci.* 2013;58(2):338–43.
70. HOFBAUER LC, HEUFELDER AE. Role of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med.* 2001;79(5–6):243–53.
71. ROGERS A, EASTELL R. Circulating Osteoprotegerin and Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand: Clinical Utility in Metabolic Bone Disease Assessment. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(11):6323–31.
72. KUMAR V, ABBAS AK, FAUSTO N, MITCHELL R. Chapter 20 : Bones, Joints, and Soft Tissue Tumors *Robbins Basic Pathology (Ninth Edition)* Elsevier Health Sciences. 2007;765-796.e1
73. BLACKWELL KA, RAISZ LG, PILBEAM CC. Prostaglandins in Bone: Bad Cop, Good Cop? *Trends Endocrinol Metab.* 2010;21(5):294–301.
74. LARA-CASTILLO N, KIM-WEROHA NA, KAMEL MA, JAVAHERI B, ELLIES DL, KRUMLAUF RE, et al. In vivo mechanical loading rapidly activates β -catenin signaling in osteocytes through a prostaglandin mediated mechanism. *Bone.* 2015;76:58–66.
75. HAVERSATH M, CATELAS I, LI X, TASSEMEIER T, JÄGER M. PGE2 and BMP-2 in bone and cartilage metabolism: 2 intertwining pathways. *Can J Physiol Pharmacol.* 2012;90(11):1434–45.
76. GENETOS DC, YELLOWLEY CE, LOOTS GG. Prostaglandin E 2 Signals Through PTGER2 to Regulate Sclerostin Expression. *PLoS One.* 2011;6(3):e17772.

77. LIU X-H, KIRSCHENBAUM A, WEINSTEIN BM, ZAIDI M, YAO S, LEVINE AC.
Prostaglandin E2 modulates components of the Wnt signaling system in bone and prostate cancer cells.
Biochem Biophys Res Commun. 2010;394(3):715–20.
78. TAKE I, KOBAYASHI Y, YAMAMOTO Y, TSUBOI H, OCHI T, UEMATSU S, et al.
Prostaglandin E2 Strongly Inhibits Human Osteoclast Formation.
Endocrinology. 2005;146(12):5204–14.
79. SEN CK, GHATAK S.
miRNA Control of Tissue Repair and Regeneration.
Am J Pathol. 2015;185(10):2629–40.
80. KIM KM, LIM S-K.
Role of miRNAs in bone and their potential as therapeutic targets.
Curr Opin Pharmacol. 2014;16:133–41.
81. JI X, CHEN X, YU X.
MicroRNAs in Osteoclastogenesis and Function: Potential Therapeutic Targets for Osteoporosis.
International Journal of Molecular Sciences. 2016;17(3):349.
82. STRILLACCI A, GRIFFONI C, SANSONE P, PATERINI P, PIAZZI G, LAZZARINI G, et al.
MiR-101 downregulation is involved in cyclooxygenase-2 overexpression in human colon cancer cells.
Exp Cell Res. 2009;315(8):1439–47.
83. SATO T, LIU X, NELSON A, NAKANISHI M, KANAJI N, WANG X, et al.
Reduced miR-146a Increases Prostaglandin E2 in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Fibroblasts.
Am J Respir Crit Care Med. 2010;182(8):1020–9.
84. SILVA BC, BILEZIKIAN JP.
Parathyroid hormone: anabolic and catabolic actions on the skeleton.
Curr Opin Pharmacol. 2015;22:41–50.
85. KOUSTENI S, BILEZIKIAN JP.
The cell biology of parathyroid hormone in osteoblasts.
Curr Osteoporos Rep. 2008;6(2):72–6.
86. LOCKLIN RM, KHOSLA S, TURNER RT, RIGGS BL.
Mediators of the biphasic responses of bone to intermittent and continuously administered parathyroid hormone.
J Cell Biochem. 2003;89(1):180–90.
87. HISA I, INOUE Y, HENDY GN, CANAFF L, KITAZAWA R, KITAZAWA S, et al.
Parathyroid Hormone-responsive Smad3-related Factor, Tmem119, Promotes Osteoblast Differentiation and Interacts with the Bone Morphogenetic Protein-Runx2 Pathway.
J Biol Chem. 2011;286(11):9787–96.
88. TIAN Y, XU Y, FU Q, HE M.
Parathyroid hormone regulates osteoblast differentiation in a Wnt/ β -catenin-dependent manner.
Mol Cell Biochem. 2011;355(1–2):211–6.
89. SIMS NA, MARTIN TJ.
Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit.
BoneKEy Reports. 2014;3:481.

90. SIDDIQUI JA, PARTRIDGE NC.
Physiological Bone Remodeling: Systemic Regulation and Growth Factor Involvement.
Physiol Bethesda Md. 2016;31(3):233–45.
91. TETI A.
Mechanisms of osteoclast-dependent bone formation.
BoneKEy Reports. 2013;2:449.
92. NEGISHI-KOGA T, SHINOHARA M, KOMATSU N, BITO H, KODAMA T, FRIEDEL RH, et al.
Suppression of bone formation by osteoclastic expression of semaphorin 4D.
Nat Med. 2011;17(11):1473–80.
93. SHIWAKU Y, NEFF L, NAGANO K, TAKEYANA K, DE BRUIJN J, DARD M, et al.
The Crosstalk between Osteoclasts and Osteoblasts Is Dependent upon the Composition and Structure of Biphasic Calcium Phosphates.
PLoS One. 2015;10(7):e0132903.
94. LOTINUN S, KIVIRANTA R, MATSUBARA T, ALZATE JA, NEFF L, LÜTH A, et al.
Osteoclast-specific cathepsin K deletion stimulates S1P-dependent bone formation.
J Clin Invest. 2013;123(2):666–81.
95. RYU J, KIM HJ, CHANG E-J, HUANG H, BANNO Y, KIM H-H.
Sphingosine 1-phosphate as a regulator of osteoclast differentiation and osteoclast–osteoblast coupling.
EMBO J. 2006;25(24):5840–51.
96. KARSENTY G, OURY F.
Biology Without Walls: The Novel Endocrinology of Bone.
Annu Rev Physiol. 2012;74(1):87–105.
97. FERRON M, LACOMBE J.
Regulation of energy metabolism by the skeleton: Osteocalcin and beyond.
Arch Biochem Biophys. 2014;561:137–46.
98. BOUCKENOOGHE T, LEFEBVRE B.
When the Skeleton Is Controlling Pancreatic β -Cell Mass During Development and After.
Diabetes. 2014;63(3):838–40.
99. PI M, KAPOOR K, YE R, NISHIMOTO SK, SMITH JC, BAUDRY J, et al.
Evidence for Osteocalcin Binding and Activation of GPRC6A in β -Cells.
Endocrinology. 2016;157(5):1866–80.
100. OURY F, FERRON M, HUIZHEN W, CONFAVREUX C, XU L, LACOMBE J, et al.
Osteocalcin regulates murine and human fertility through a pancreas-bone-testis axis.
J Clin Invest. 2015;125(5):2180.
101. CUNHA JS, FERREIRA VM, MAQUIGUSSA E, NAVES MA, BOIM MA.
Effects of high glucose and high insulin concentrations on osteoblast function in vitro.
Cell Tissue Res. 2014;358(1):249–56.
102. KONDEGOWDA NG, FENUTRIA R, POLLACK IR, ORTHOFER M, GARCIA-OCAÑA A, PENNINGER JM, et al.
Osteoprotegerin and Denosumab Stimulate Human Beta Cell Proliferation through Inhibition of the Receptor Activator of NF- κ B Ligand Pathway.
Cell Metab. 2015;22(1):77–85.

103. KIECHL S, WITTMANN J, GIACCARI A, KNOFLACH M, WILLEIT P, BOZEC A, et al.
Blockade of receptor activator of nuclear factor- κ B (RANKL) signaling improves hepatic insulin resistance and prevents development of diabetes mellitus.
Nat Med. 2013;19(3):358–63.
104. KARSENTY G, OURY F.
Regulation of male fertility by the bone-derived hormone osteocalcin.
Mol Cell Endocrinol. 2014;382(1):521–6.
105. CHAMOUNI A, OURY F.
Reciprocal interaction between bone and gonads.
Arch Biochem Biophys. 2014;561:147–53.
106. CHAMOUNI A, SCHREIWEIS C, OURY F.
Bone, brain & beyond.
Rev Endocr Metab Disord. 2015;16(2):99–113.
107. OURY F, KHRIMIAN L, DENNY CA, GARDIN A, CHAMOUNI A, GOEDEN N, et al.
Maternal and Offspring Pools of Osteocalcin Influence Brain Development and Functions.
Cell. 2013 Sep;155(1):228–41.
108. CORVOL H, THOMPSON KE, TABARY O, LE ROUZIC P, GUILLOT L.
Translating the genetics of cystic fibrosis to personalized medicine.
Transl Res. 2016;168:40–9.
109. http://www.vaincrelamuco.org/sites/default/files/rapport_registre_2014.pdf consulté le 29/06/2016
110. DAVIS PB.
Cystic Fibrosis Since 1938.
Am J Respir Crit Care Med. 2006;173(5):475–82.
111. AMARAL MD.
Novel personalized therapies for cystic fibrosis: Treating the basic defect in all patients.
J Intern Med. 2014;277(2).
112. COLLINS FS, RIORDAN JR, TSUI L-C.
The Cystic Fibrosis Gene: Isolation and Significance.
Hosp Pract. 1990;25(10):47–57.
113. SHEAD EF, HAWORTH CS, CONDLIFFE AM, MCKEON DJ, SCOTT MA, COMPSTON JE.
Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) is expressed in human bone.
Thorax. 2007;62(7):650–1.
114. O’SULLIVAN BP, FREEDMAN SD.
Cystic fibrosis.
The Lancet. 2009;373(9678):1891–904.
115. ELBORN JS.
Cystic fibrosis.
Lancet Lond Engl. 2016; In press
116. KOGAN I, RAMJEESINGH M, LI C, KIDD JF, WANG Y, LESLIE EM, et al.
CFTR directly mediates nucleotide-regulated glutathione flux.
EMBO J. 2003;22(9):1981–9.

117. BOROWITZ D.
CFTR, bicarbonate, and the pathophysiology of cystic fibrosis.
Pediatr Pulmonol. 2015;50(S40):S24-S30.
118. PALMA AG, KOTSIAS BA, MARINO GI.
CFTR and ENaC functions in cystic fibrosis.
Medicina (Mex). 2014;74(2):133–9.
119. CYR DM.
Arrest of CFTR Δ F508 folding.
Nat Struct Mol Biol. 2005;12(1):2–3.
120. HANRAHAN JW, SAMPSON HM, THOMAS DY.
Novel pharmacological strategies to treat cystic fibrosis.
Trends Pharmacol Sci. 2013;34(2):119–25.
121. KÄLIN N, CLAAß A, SOMMER M, PUCHELLE E, TÜMMLER B.
 Δ F508 CFTR protein expression in tissues from patients with cystic fibrosis.
J Clin Invest. 1999;103(10):1379–89.
122. CEBOTARU L, VIJ N, CIOBANU I, WRIGHT J, FLOTTE T, GUGGINO WB.
Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator Missing the First Four Transmembrane Segments Increases Wild Type and Δ F508 Processing.
J Biol Chem. 2008;283(32):21926–33.
123. ELBORN S, VALLIERES E.
Cystic fibrosis gene mutations: evaluation and assessment of disease severity.
Adv Genomics Genet. 2014;161.
124. ZHOU Z, WANG X, LIU H-Y, ZOU X, LI M, HWANG T-C.
The Two ATP Binding Sites of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Play Distinct Roles in Gating Kinetics and Energetics.
J Gen Physiol. 2006;128(4):413–22.
125. WANG Y, WRENNALL JA, CAI Z, LI H, SHEPPARD DN.
Understanding how cystic fibrosis mutations disrupt CFTR function: From single molecules to animal models.
Int J Biochem Cell Biol. 2014;52:47–57.
126. WANG XR, LI C.
Decoding F508del Misfolding in Cystic Fibrosis.
Biomolecules. 2014;4(2):498–509.
127. LIVRAGHI A, RANDELL SH.
Cystic Fibrosis and Other Respiratory Diseases of Impaired Mucus Clearance.
Toxicol Pathol. 2007;35(1):116–29.
128. BELESSIS Y, DIXON B, HAWKINS G, PEREIRA J, PEAT J, MACDONALD R, et al.
Early Cystic Fibrosis Lung Disease Detected by Bronchoalveolar Lavage and Lung Clearance Index.
Am J Respir Crit Care Med. 2012;185(8):862–73.
129. GEHRIG S, DUERR J, WEITNAUER M, WAGNER CJ, GRAEBER SY, SCHATTERNY J, et al.
Lack of Neutrophil Elastase Reduces Inflammation, Mucus Hypersecretion, and Emphysema, but Not Mucus Obstruction, in Mice with Cystic Fibrosis-like Lung Disease.
Am J Respir Crit Care Med. 2014;189(9):1082–92.

130. DEAN TP, DAI Y, SHUTE JK, CHURCH MK, WARNER JO.
Interleukin-8 Concentrations Are Elevated in Bronchoalveolar Lavage, Sputum, and Sera of Children with Cystic Fibrosis.
Pediatr Res. 1993;34(2):159–61.
131. BERNARDI DM, RIBEIRO AF, MAZZOLA TN, VILELA MMS, SGARBIERI VC.
The Impact of Cystic Fibrosis on the Immunologic Profile of Pediatric Patients.
J Pediatr. 2013;89(1):40–7.
132. <http://www.cfmedicine.com/htmldocs/cftext/basicproblem.htm> consulté le 10/05/2016
133. KELLY T, BUXBAUM J.
Gastrointestinal Manifestations of Cystic Fibrosis.
Dig Dis Sci. 2015;60(7):1903–13.
134. O'SHEA D, O'CONNELL J.
Cystic Fibrosis Related Diabetes.
Curr Diab Rep. 2014;14(8):1–10.
135. KOBELSKA-DUBIEL N, KLINCEWICZ B, CICHY W.
Liver disease in cystic fibrosis. *Przegląd Gastroenterol.*
2014;9(3):136–41.
136. LISLE RCD, BOROWITZ D.
The Cystic Fibrosis Intestine.
Cold Spring Harb Perspect Med. 2013;3(9):a009753.
137. JONES GH, WALSHAW MJ.
Potential impact on fertility of new systemic therapies for cystic fibrosis.
Paediatr Respir Rev. 2015;16, Supplement 1:25–7.
138. CHEN H, RUAN YC, XU WM, CHEN J, CHAN HC.
Regulation of male fertility by CFTR and implications in male infertility.
Hum Reprod Update. 2012;18(6):703–13.
139. <https://www.cff.org/2014-Annual-Data-Report.pdf> consulté le 03/06/2016
140. ARIS RM, RENNER JB, WINDERS AD, BUELL HE, RIGGS DB, LESTER GE, et al.
Increased Rate of Fractures and Severe Kyphosis: Sequelae of Living into Adulthood with Cystic Fibrosis.
Ann Intern Med. 1998;128(3):186–93.
141. STALVEY MS, CLINES GA.
Cystic Fibrosis-Related Bone Disease: Insights Into a Growing Problem.
Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes. 2013;20(6):547–52.
142. DEAN NC, VAN BOERUM DH, LIOU TG.
Rib plating of acute and sub-acute non-union rib fractures in an adult with cystic fibrosis: a case report.
BMC Res Notes. 2014;7:681.
143. HAWORTH CS.
Impact of cystic fibrosis on bone health.
Curr Opin Pulm Med. 2010;16(6):616–22.

144. GORE AP, KWON SH, STENBIT AE.
A roadmap to the brittle bones of cystic fibrosis.
J Osteoporos. 2010;2011:926045.
145. PACCOU J, ZEBoulON N, COMBESCURE C, GOSSEC L, CORTET B.
The Prevalence of Osteoporosis, Osteopenia, and Fractures Among Adults with Cystic Fibrosis: A Systematic Literature Review with Meta-Analysis.
Calcif Tissue Int. 2009;86(1):1–7.
146. ELKIN SL, FAIRNEY A, BURNETT S, KEMP M, KYD P, BURGESS J, et al.
Vertebral Deformities and Low Bone Mineral Density in Adults with Cystic Fibrosis: A Cross-sectional Study.
Osteoporos Int. 2001;12(5):366–72.
147. ARIS RM, MERKEL PA, BACHRACH LK, BOROWITZ DS, BOYLE MP, ELKIN SL, et al.
Guide to Bone Health and Disease in Cystic Fibrosis.
J Clin Endocrinol Metab. 2005;90(3):1888–96.
148. KELLY A, SCHALL J, STALLINGS VA, ZEMEL BS.
Trabecular and cortical bone deficits are present in children and adolescents with cystic fibrosis.
Bone. 2016;90:7–14.
149. ILIAS I, GHAYEE H.
Glucocorticoid-Induced Osteoporosis.
In: De Groot LJ, Beck-Peccoz P, Chrousos G, Dungan K, Grossman A, Hershman JM, et al., editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000
150. SYED F, KHOSLA S.
Mechanisms of sex steroid effects on bone.
Biochem Biophys Res Commun. 2005;328(3):688–96.
151. JAVIER R-M, JACQUOT J.
Bone disease in cystic fibrosis: What's new?
Joint Bone Spine. 2011;78(5):445–50.
152. KING SJ, TOPLISS DJ, KOTSIMBOS T, NYULASI IB, BAILEY M, EBELING PR, et al.
Reduced bone density in cystic fibrosis: $\Delta F508$ mutation is an independent risk factor.
Eur Respir J. 2005;25(1):54–61.
153. SERMET-GAUDELUS I, SOUBERBIELLE JC, RUIZ JC, VRIELYNCK S, HEUILLON B, AZHAR I, et al.
Low Bone Mineral Density in Young Children with Cystic Fibrosis.
Am J Respir Crit Care Med. 2007;175(9):951–7.
154. SERMET-GAUDELUS I, CASTANET M, RETSCH-BOGART G, ARIS RM.
Update on Cystic Fibrosis-Related Bone Disease: A Special Focus on Children.
Paediatr Respir Rev. 2009;10(3):134–42.
155. PUTMAN MS, GREENBLATT LB, SICILIAN L, ULUER A, LAPEY A, SAWICKI G, et al.
Young adults with cystic fibrosis have altered trabecular microstructure by ITS-based morphological analysis.
Osteoporos Int. 2016;1–9.
156. MORTENSEN LA, CHAN GM, ALDER SC, MARSHALL BC.
Bone mineral status in prepubertal children with cystic fibrosis.
J Pediatr. 2000;136(5):648–52.

157. LEGROUX-GÉROT I, LEROY S, PRUDHOMME C, PEREZ T, FLIPO RM, WALLAERT B, et al.
Bone loss in adults with cystic fibrosis: Prevalence, associated factors, and usefulness of biological markers.
Joint Bone Spine. 2012;79(1):73–7.
158. SHEAD EF, HAWORTH CS, BARKER H, BILTON D, COMPSTON JE.
Osteoclast function, bone turnover and inflammatory cytokines during infective exacerbations of cystic fibrosis.
J Cyst Fibros. 2010;9(2):93–8.
159. GIGER EV, CASTAGNER B, LEROUX J-C.
Biomedical applications of bisphosphonates.
J Controlled Release. 2013;167(2):175–88.
160. OTT SM.
Long-Term Safety of Bisphosphonates.
J Clin Endocrinol Metab. 2005;90(3):1897–9.
161. SHIMIZU E, TAMASI J, PARTRIDGE NC.
Alendronate Affects Osteoblast Functions by Crosstalk through EphrinB1-EphB.
J Dent Res. 2012;91(3):268–74.
162. ORRISS IR, KEY ML, COLSTON KW, ARNETT TR.
Inhibition of osteoblast function in vitro by aminobisphosphonates.
J Cell Biochem. 2009;106(1):109–18.
163. IWATA K, LI J, FOLLET H, PHIPPS RJ, BURR DB.
Bisphosphonates suppress periosteal osteoblast activity independently of resorption in rat femur and tibia.
Bone. 2006;39(5):1053–8.
164. BASSO FG, SILVEIRA TURRIONI AP, HEBLING J, DE SOUZA COSTA CA.
Zoledronic Acid Inhibits Human Osteoblast Activities.
Gerontology. 2013;59(6):534–41.
165. SAMADFAM R, XIA Q, GOLTZMAN D.
Pretreatment with Anticatabolic Agents Blunts But Does Not Eliminate the Skeletal Anabolic Response to Parathyroid Hormone in Oophorectomized Mice.
Endocrinology. 2007;148(6):2778–87.
166. BLACK DM, GREENSPAN SL, ENSRUD KE, PALERMO L, MCGOWAN JA, LANG TF, et al.
The Effects of Parathyroid Hormone and Alendronate Alone or in Combination in Postmenopausal Osteoporosis.
N Engl J Med. 2003;349(13):1207–15.
167. PENDRYS DG, SILVERMAN SL.
Osteonecrosis of the jaws and bisphosphonates.
Curr Osteoporos Rep. 2008;6(1):31–8.
168. ROSINI S, ROSINI S, BERTOLDI I, FREDIANI B.
Understanding bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw: uses and risks.
Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2015;19(17):3309–17.
169. LASKOWSKI LK, GOLDFARB DS, HOWLAND MA, KAVCSAK K, LUGASSY DM, SMITH SW.
A RANKL Wrinkle: Denosumab-Induced Hypocalcemia.
J Med Toxicol. 2016;1–4.

170. MATSUSHITA Y, HAYASHIDA S, MORISHITA K, SAKAMOTO H, NARUSE T, SAKAMOTO Y, et al.
Denosumab-associated osteonecrosis of the jaw affects osteoclast formation and differentiation: Pathological features of two cases.
Mol Clin Oncol. 2016;4(2):191–4.
171. HAMBLI R, BOUGHATTAS MH, DANIEL J-L, KOURTA A.
Prediction of denosumab effects on bone remodeling: A combined pharmacokinetics and finite element modeling.
J Mech Behav Biomed Mater. 2016;60:492–504.
172. LINDSAY R, KREGE JH, MARIN F, JIN L, STEPAN JJ.
Teriparatide for osteoporosis: importance of the full course.
Osteoporos Int. 2016;1–16.
173. COPPOLA C, DEL BUONO A, MAFFULLI N.
Teriparatide in Fracture Non-Unions.
Transl Med UniSa. 2014;12:47–53.
174. HODSMAN AB, BAUER DC, DEMPSTER DW, DIAN L, HANLEY DA, HARRIS ST, et al.
Parathyroid Hormone and Teriparatide for the Treatment of Osteoporosis: A Review of the Evidence and Suggested Guidelines for Its Use.
Endocr Rev. 2005;26(5):688–703.
175. MA YL, CAIN RL, HALLADAY DL, YANG X, ZENG Q, MILES RR, et al.
Catabolic Effects of Continuous Human PTH (1–38) in Vivo Is Associated with Sustained Stimulation of RANKL and Inhibition of Osteoprotegerin and Gene-Associated Bone Formation.
Endocrinology. 2001;142(9):4047–54.
176. ANASTASILAKIS AD, GOULIS DG, POLYZOS SA, GEROU S, PAVLIDOU V, KOUKOULIS G, et al.
Acute changes in serum osteoprotegerin and receptor activator for nuclear factor- κ B ligand levels in women with established osteoporosis treated with teriparatide.
Eur J Endocrinol. 2008;158(3):411–5.
177. BUXTON EC, YAO W, LANE NE.
Changes in Serum Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand, Osteoprotegerin, and Interleukin-6 Levels in Patients with Glucocorticoid-Induced Osteoporosis Treated with Human Parathyroid Hormone (1–34).
J Clin Endocrinol Metab. 2004;89(7):3332–6.
178. SERMET-GAUDELUS I, BIANCHI ML, GARABÉDIAN M, ARIS RM, MORTON A, HARDIN DS, et al.
European cystic fibrosis bone mineralisation guidelines.
J Cyst Fibros. 2011;10:S16–23.
179. ARIS RM, LESTER GE, CAMINITI M, BLACKWOOD AD, HENSLER M, LARK RK, et al.
Efficacy of Alendronate in Adults with Cystic Fibrosis with Low Bone Density.
Am J Respir Crit Care Med. 2004;169(1):77–82.
180. HAWORTH CS, SHARPLES L, HUGHES V, ELKIN SL, HODSON ME, CONWAY SP, et al.
Multicentre trial of weekly risedronate on bone density in adults with cystic fibrosis.
J Cyst Fibros. 2011;10(6):470–6.
181. CONWELL LS, CHANG AB.
Bisphosphonates for osteoporosis in people with cystic fibrosis.
Cochrane Database Syst Rev. 2014;(3):CD002010.

182. SIWAMOGSATHAM O, STEPHENS K, TANGPRICHA V.
Evaluation of teriparatide for treatment of osteoporosis in four patients with cystic fibrosis: a case series.
Case Rep Endocrinol. 2014;2014:893589.
183. CUTTING GR.
Cystic fibrosis genetics: from molecular understanding to clinical application.
Nat Rev Genet. 2015;16(1):45–56.
184. DHOOGHE B, HAAF JB, NOEL S, LEAL T.
Strategies in early clinical development for the treatment of basic defects of cystic fibrosis.
Expert Opin Investig Drugs. 2016;25(4):423–36.
185. BARRY P, RONAN N, PLANT B.
Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Modulators: The End of the Beginning.
Semin Respir Crit Care Med. 2015;36(2):287–98.
186. <http://ansm.sante.fr/Activites/Autorisations-temporaires-d-utilisation-ATU/ATU-de-cohorte-arretees/Liste-des-ATU-de-cohorte-arretees/LUMACAFTOR-IVACAFTOR-VERTEX-200-mg-125-mg-comprime-pellicule> consulté le 09/06/2016
187. RAMSEY BW, DAVIES J, MCELVANEY NG, TULLIS E, BELL SC, DŘEVÍNEK P, et al.
A CFTR Potentiator in Patients with Cystic Fibrosis and the G551D Mutation.
N Engl J Med. 2011;365(18):1663–72.
188. DAVIES JC, WAINWRIGHT CE, CANNY GJ, CHILVERS MA, HOWENSTINE MS, MUNCK A, et al.
Efficacy and Safety of Ivacaftor in Patients Aged 6 to 11 Years with Cystic Fibrosis with a G551D Mutation.
Am J Respir Crit Care Med. 2013;187(11):1219–25.
189. WAINWRIGHT CE, ELBORN JS, RAMSEY BW, MARIGOWDA G, HUANG X, CIPOLLI M, et al.
Lumacaftor–Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR. N Engl J Med. 2015;373(3):220–31.
190. SHEAD EF, HAWORTH CS, GUNN E, BILTON D, SCOTT MA, COMPSTON JE.
Osteoclastogenesis during Infective Exacerbations in Patients with Cystic Fibrosis.
Am J Respir Crit Care Med. 2006;174(3):306–11.
191. BRONCKERS A, KALOGERAKI L, JORNA HJN, WILKE M, BERVOETS TJ, LYARUU DM, et al.
The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) is expressed in maturation stage ameloblasts, odontoblasts and bone cells.
Bone. 2010;46(4):1188–96.
192. STALVEY MS, CLINES KL, HAVASI V, MCKIBBIN CR, DUNN LK, CHUNG WJ, et al.
Osteoblast CFTR inactivation reduces differentiation and osteoprotegerin expression in a mouse model of cystic fibrosis-related bone disease.
PloS One. 2013;8(11):e80098.
193. LE HERON L, GUILLAUME C, VELARD F, BRAUX J, TOUQUI L, MORICEAU S, et al.
Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) regulates the production of osteoprotegerin (OPG) and prostaglandin (PG) E2 in human bone.
J Cyst Fibros. 2010;9(1):69–72.

194. LE HENAFF C, GIMENEZ A, HAÏ E, MARTY C, MARIE P, JACQUOT J.
The F508del Mutation in Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene Impacts Bone Formation.
Am J Pathol. 2012;180(5):2068–75.
195. LE HENAFF C, MANSOURI R, MODROWSKI D, ZARKA M, GEOFFROY V, MARTY C, et al.
Increased NF- κ B Activity and Decreased Wnt/ β -Catenin Signaling Mediate Reduced Osteoblast Differentiation and Function in Δ F508 Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Mice.
J Biol Chem. 2015;290(29):18009–17.
196. GIMENEZ-MAITRE A, HENAFF CL, NOREZ C, GUILLAUME C, RAVONINJATOVO B, LAURENT-MAQUIN D, et al.
Deficit of osteoprotegerin release by osteoblasts from a patient with cystic fibrosis.
Eur Respir J. 2012;39(3):780–1.
197. LE HENAFF C, FARIA DA CUNHA M, HATTON A, TONDELIER D, MARTY C, COLLET C, et al.
Genetic deletion of keratin 8 corrects the altered bone formation and osteopenia in a mouse model of cystic fibrosis.
Hum Mol Genet. 2016;25(7):1281–93.
198. PASHUCK TD, FRANZ SE, ALTMAN MK, WASSERFALL CH, ATKINSON MA, WRONSKI TJ, et al.
Murine Model for Cystic Fibrosis Bone Disease Demonstrates Osteopenia and Sex-Related Differences in Bone Formation.
Pediatr Res. 2009;65(3):311–6.
199. PARADIS J, WILKE M, HASTON CK.
Osteopenia in Cftr-deltaF508 mice.
J Cyst Fibros. 2010;9(4):239–45.
200. DIF F, MARTY C, BAUDOIN C, VERNEJOUL M-C DE, LEVI G.
Severe osteopenia in CFTR-null mice.
Bone. 2004;35(3):595–603.
201. LE HENAFF C, HAÏ E, VELARD F, MARTY C, TABARY O, MARIE PJ, et al.
Enhanced F508del-CFTR Channel Activity Ameliorates Bone Pathology in Murine Cystic Fibrosis.
Am J Pathol. 2014;184(4):1132–41.
202. PUTMAN MS, BAKER JF, ULUER A, HERLYN K, LAPEY A, SICILIAN L, et al.
Trends in bone mineral density in young adults with cystic fibrosis over a 15 year period.
J Cyst Fibros. 2015;14(4):526–32.
203. ECKFORD PDW, RAMJEESINGH M, MOLINSKI S, PASYK S, DEKKERS JF, LI C, et al.
VX-809 and Related Corrector Compounds Exhibit Secondary Activity Stabilizing Active F508del-CFTR after Its Partial Rescue to the Cell Surface.
Chem Biol. 2014;21(5):666–78.
204. HE L, KOTA P, ALEKSANDROV AA, CUI L, JENSEN T, DOKHOLYAN NV, et al.
Correctors of Δ F508 CFTR restore global conformational maturation without thermally stabilizing the mutant protein.
FASEB J. 2013;27(2):536–45.

205. SIMS NA, NG KW.
Implications of Osteoblast-Osteoclast Interactions in the Management of Osteoporosis by Antiresorptive Agents Denosumab and Odanacatib.
Curr Osteoporos Rep. 2014;12(1):98–106.
206. SIMS NA, WALSH NC.
Intercellular Cross-Talk Among Bone Cells: New Factors and Pathways.
Curr Osteoporos Rep. 2012;10(2):109–17.
207. STALVEY MS, CLINES KL, HAVASI V, MCKIBBIN CR, DUNN LK, CHUNG WJ, et al.
Osteoblast CFTR inactivation reduces differentiation and osteoprotegerin expression in a mouse model of cystic fibrosis-related bone disease.
PLoS One. 2013;8(11):e80098.
208. PITARI MR, ROSSI M, AMODIO N, BOTTA C, MORELLI E, FEDERICO C, et al.
Inhibition of miR-21 restores RANKL/OPG ratio in multiple myeloma-derived bone marrow stromal cells and impairs the resorbing activity of mature osteoclasts.
Oncotarget. 2015;6(29):27343–58.
209. ZHANG Z, SONG C, FU X, LIU M, LI Y, PAN J, et al.
High-Dose Diosgenin Reduces Bone Loss in Ovariectomized Rats via Attenuation of the RANKL/OPG Ratio.
Int J Mol Sci. 2014;15(9):17130–47.
210. WANG X-F, ZHANG Y-K, YU Z-S, ZHOU J-L.
The role of the serum RANKL/OPG ratio in the healing of intertrochanteric fractures in elderly patients.
Mol Med Rep. 2013;7(4):1169–72.
211. KHOSLA S.
Minireview: The OPG/RANKL/RANK System.
Endocrinology. 2001;142(12):5050–5.
212. THEOLEYRE S, WITTRANT Y, TAT SK, FORTUN Y, REDINI F, HEYMANN D.
The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling.
Cytokine Growth Factor Rev. 2004;15(6):457–75.
213. ASAGIRI M, TAKAYANAGI H.
The molecular understanding of osteoclast differentiation.
Bone. 2007;40(2):251–64.
214. SHARAF-ELDIN WE, ABU-SHAHBA N, MAHMOUD M, EL-BADRI N.
The Modulatory Effects of Mesenchymal Stem Cells on Osteoclastogenesis.
Stem Cells Int. 2016;2016:1908365.
215. IKEDA T, KASAI M, SUZUKI J, KUROYAMA H, SEKI S, UTSUYAMA M, et al.
Multimerization of the Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand (RANKL) Isoforms and Regulation of Osteoclastogenesis.
J Biol Chem. 2003;278(47):47217–22.
216. NAKASHIMA T, KOBAYASHI Y, YAMASAKI S, KAWAKAMI A, EGUCHI K, SASAKI H, et al.
Protein Expression and Functional Difference of Membrane-Bound and Soluble Receptor Activator of NF- κ B Ligand: Modulation of the Expression by Osteotropic Factors and Cytokines.
Biochem Biophys Res Commun. 2000;275(3):768–75.

217. NICHOLS DP, CHMIEL JF.
Inflammation and its genesis in cystic fibrosis.
Pediatr Pulmonol. 2015;50(S40):S39–56.
218. ELIZUR A, CANNON CL, FERKOL TW.
Airway Inflammation in Cystic Fibrosis.
Chest. 2008;133(2):489–95.
219. COURTNEY JM, ENNIS M, ELBORN JS.
Cytokines and inflammatory mediators in cystic fibrosis.
J Cyst Fibros. 2004;3(4):223–31.
220. SAGEL SD, CHMIEL JF, KONSTAN MW.
Sputum Biomarkers of Inflammation in Cystic Fibrosis Lung Disease.
Proc Am Thorac Soc. 2007;4(4):406–17.
221. TIRINGER K, TREIS A, FUCIK P, GONA M, GRUBER S, RENNER S, et al.
A Th17- and Th2-skewed Cytokine Profile in Cystic Fibrosis Lungs Represents a Potential Risk Factor for *Pseudomonas aeruginosa* Infection.
Am J Respir Crit Care Med. 2013;187(6):621–9.
222. NORMAN D, ELBORN JS, CORDON SM, RAYNER RJ, WISEMAN MS, HILLER EJ, et al.
Plasma tumour necrosis factor alpha in cystic fibrosis.
Thorax. 1991;46(2):91–5.
223. KIM K-W, KIM H-R, KIM B-M, CHO M-L, LEE S-H.
Th17 Cytokines Regulate Osteoclastogenesis in Rheumatoid Arthritis.
Am J Pathol. 2015;185(11):3011–24.
224. ZHANG YH, HEULSMANN A, TONDRAVI MM, MUKHERJEE A, ABU-AMER Y.
Tumor necrosis factor-alpha (TNF) stimulates RANKL-induced osteoclastogenesis via coupling of TNF type 1 receptor and RANK signaling pathways.
J Biol Chem. 2001;276(1):563–8.
225. BRAUN T, ZWERINA J.
Positive regulators of osteoclastogenesis and bone resorption in rheumatoid arthritis.
Arthritis Res Ther. 2011;13(4):235.
226. ZHAO Z, HOU X, YIN X, LI Y, DUAN R, BOYCE BF, et al.
TNF Induction of NF- κ B RelB Enhances RANKL-Induced Osteoclastogenesis by Promoting Inflammatory Macrophage Differentiation but also Limits It through Suppression of NFATc1 Expression.
PLoS One. 2015;10(8):e0135728.
227. SHMARINA G, PUKHALSKY A, PETROVA N, ZAKHAROVA E, AVAKIAN L, KAPRANOV N, et al.
TNF gene polymorphisms in cystic fibrosis patients: contribution to the disease progression.
J Transl Med. 2013;11:19.
228. LUO J, YANG Z, MA Y, YUE Z, LIN H, QU G, et al.
LGR4 is a receptor for RANKL and negatively regulates osteoclast differentiation and bone resorption.
Nat Med. 2016;22(5):539–46.

229. KOBAYASHI Y, MIZOGUCHI T, TAKE I, KURIHARA S, UDAGAWA N, TAKAHASHI N.
Prostaglandin E2 Enhances Osteoclastic Differentiation of Precursor Cells through Protein Kinase A-dependent Phosphorylation of TAK1.
J Biol Chem. 2005;280(12):11395–403.
230. SUZAWA T, MIYAURA C, INADA M, MARUYAMA T, SUGIMOTO Y, USHIKUBI F, et al.
The Role of Prostaglandin E Receptor Subtypes (EP1, EP2, EP3, and EP4) in Bone Resorption: An Analysis Using Specific Agonists for the Respective EPs.
Endocrinology. 2000;141(4):1554–9.
231. LI X, OKADA Y, PILBEAM CC, LORENZO JA, KENNEDY CRJ, BREYER RM, et al.
Knockout of the Murine Prostaglandin EP2 Receptor Impairs Osteoclastogenesis in Vitro.
Endocrinology. 2000;141(6):2054–61.
232. LADER CS, FLANAGAN AM.
Prostaglandin E2, Interleukin 1 α , and Tumor Necrosis Factor- α Increase Human Osteoclast Formation and Bone Resorption in Vitro.
Endocrinology. 1998;139(7):3157–64.
233. GALEA GL, SUNTERS A, MEAKIN LB, ZAMAN G, SUGIYAMA T, LANYON LE, et al.
Sost down-regulation by mechanical strain in human osteoblastic cells involves PGE2 signaling via EP4.
Febs Lett. 2011;585(15):2450–4.
234. GOESSLING W, NORTH TE, LOEWER S, LORD AM, LEE S, STOICK-COOPER CL, et al.
Genetic interaction of PGE2 and Wnt signaling regulates developmental specification of stem cells and regeneration.
Cell. 2009;136(6):1136–47.
235. GRIMAUD E, SOUBIGOU L, COUILLAUD S, COIPEAU P, MOREAU A, PASSUTI N, et al.
Receptor Activator of Nuclear Factor κ B Ligand (RANKL)/Osteoprotegerin (OPG) Ratio Is Increased in Severe Osteolysis.
Am J Pathol. 2003;163(5):2021–31.
236. GREY A, XU X, HILL B, WATSON M, CALLON K, REID IR, et al.
Osteoblastic Cells Express Phospholipid Receptors and Phosphatases and Proliferate in Response to Sphingosine-1-Phosphate.
Calcif Tissue Int. 2004;74(6):542–50.
237. MATSUZAKI E, HIRATSUKA S, HAMACHI T, TAKAHASHI-YANAGA F, HASHIMOTO Y, HIGASHI K, et al.
Sphingosine-1-phosphate promotes the nuclear translocation of β -catenin and thereby induces osteoprotegerin gene expression in osteoblast-like cell lines.
Bone. 2013;55(2):315–24.
238. SATO C, IWASAKI T, KITANO S, TSUNEMI S, SANO H.
Sphingosine 1-phosphate receptor activation enhances BMP-2-induced osteoblast differentiation.
Biochem Biophys Res Commun. 2012;423(1):200–5.
239. LIAN JB, STEIN GS, VAN WIJNEN AJ, STEIN JL, HASSAN MQ, GAUR T, et al.
MicroRNA control of bone formation and homeostasis.
Nat Rev Endocrinol. 2012;8(4):212–27.

240. VIART V, BERGOUGNOUX A, BONINI J, VARILH J, CHIRON R, TABARY O, et al.
Transcription factors and miRNAs that regulate fetal to adult CFTR expression change are new targets for cystic fibrosis.
Eur Respir J. 2015;45(1):116–28.
241. OGLESBY IK, CHOTIRMALL SH, MCELVANEY NG, GREENE CM.
Regulation of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator by MicroRNA-145, -223, and -494 Is Altered in $\Delta F508$ Cystic Fibrosis Airway Epithelium.
J Immunol. 2013;190(7):3354–62.
242. MAYER M.
Lumacaftor-ivacaftor (Orkambi) for cystic fibrosis: behind the “breakthrough.”
Evid Based Med. 2016;21(3):83–6.
243. <http://cysticfibrosisnewstoday.com/2015/10/08/phase-1b-results-n91115-cystic-fibrosis-drug-presented-north-american-cystic-fibrosis-conference/> consulté le 15/06/2016
244. MEIJER L, NELSON DJ, RIAZANSKI V, GABDOULKHAKOVA AG, HERY-ARNAUD G, LE BERRE R, et al.
Modulating Innate and Adaptive Immunity by (R)-Roscovitine: Potential Therapeutic Opportunity in Cystic Fibrosis.
J Innate Immun. 2016;8(4):330–49.
245. VEIT G, AVRAMESCU RG, CHIANG AN, HOUCK SA, CAI Z, PETERS KW, et al.
From CFTR biology toward combinatorial pharmacotherapy: expanded classification of cystic fibrosis mutations.
Mol Biol Cell. 2016;27(3):424–33.
246. BITAM S, PRANKE I, HOLLENHORST M, SERVEL N, MOQUEREAU C, TONDELIER D, et al.
An unexpected effect of TNF- α on F508del-CFTR maturation and function.
F1000Research. 2015;4:218.
247. WAN Q, SCHOENMAKER T, JANSEN IDC, BIAN Z, VRIES TJ DE, EVERTS V.
Osteoblasts of calvaria induce higher numbers of osteoclasts than osteoblasts from long bone.
Bone. 2016;86:10–21.

BIBLIOGRAPHIE PERSONNELLE

Articles scientifiques:

-**Delion M**, Braux J, Jourdain ML, Guillaume C, Bour C, Gangloff S, Sermet-Gaudelus I, Jacquot J, Velard F. Over-expression of RANKL in osteoblasts: a possible mechanism of susceptibility to bone disease in cystic fibrosis. *J. of Pathology*. 2016. Manuscrit accepté, disponible en ligne. Impact Factor 7.43

-Jacquot J, **Delion M**, Braux J, Gangloff S, Velard F. Bone disease in cystic fibrosis: New pathogenic insights opening novel therapies. *Osteoporosis Int*. 2016;27(4):1401-12. Impact Factor 4.16.

-Sermet-Gaudelus I, **Delion M**, Durieu I, Jacquot J, Hubert D. Bone demineralization is improved by ivacaftor in patients with cystic fibrosis carrying the G551D mutation, 2016. manuscrit en soumission.

-Velard F, **Delion M**, Lemaire F, Tabary O, Guillaume C, Barthes F, Touqui L, Gangloff S, Sermet-Gaudelus I, Jacquot J. Cystic fibrosis bone disease : is the CFTR corrector C18 an option for therapy? *Eur Respir J*. 2015;45(3):845-848. Impact Factor 7.64.

-Velard F, **Delion M**, Le Henaff C, Tabary O, Guillaume C, Barthes F, Touqui L, Gangloff S, Sermet-Gaudelus I, Jacquot J. Cystic fibrosis and bone disease: Defective osteoblast maturation with the F508del mutation in Cfr. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;189(6):746-8. Impact Factor 13.00.

Publications d'actes de congrès:

-Velard F, **Delion M**, Le Henaff C, Tabary O, Barthes F, Touqui L, Gangloff SC, Sermet-Gaudelus I, Jacquot J. Cystic fibrosis bone disease: is the CFTR corrector C18 an option for therapy? *J. Cyst. Fibrosis* 2015;14(S1):S51. Impact Factor 3.48.

-Velard F, **Delion M**, Le Henaff C, Tabary O, Guillaume C, Barthes F, Touqui L, Gangloff SC, Sermet-Gaudelus I, Jacquot J. Cystic fibrosis and bone disease: defective osteoblast maturation with the F508del mutation in CFTR. *J. Cyst. Fibrosis* 2014;13(S2):S13. Impact Factor 3.48

Conférences invitées:

-Velard F, **Delion M**, Le Henaff C, Tabary O, Guillaume C, Barthes F, Touqui L, Gangloff S, Sermet-Gaudelus I, Jacquot J. Cystic fibrosis and bone disease: Defective human and murine osteoblast function with the F508del mutation in Cfr. 2014 European Cystic Fibrosis Society Basic Science Conference, St Julians, Malte.

Communications orales:

- **Delion M**, Velard F, Guillaume C, Gangloff S, Le Pimpec-Barthes F, Sermet-Gaudelus I, Jacquot J. La perte osseuse dans la mucoviscidose: un rapport RANK-L/OPG élevé dans les ostéoblastes porteurs de la mutation F508del. 17ème Colloque Français des Jeunes Chercheurs travaillant sur la mucoviscidose, Paris, France, 2016

- **Delion M**, Velard F, Guillaume C, Gangloff S, Le Pimpec-Barthes F, Sermet-Gaudelus I, Jacquot J. Cystic fibrosis bone disease: an increased RANK-L-to-OPG ratio in osteoblasts with the F508del mutation in Cfr. 10th European CF Young Investigators Meeting, Paris, France, 2016

- Velard F, **Delion M**, Tabary O, Guillaume C, Le Pimpec-Barthes F, Sermet-Gaudelus I, Ingersoll S, Gangloff S, Tirouvanziam R, Jacquot J. New insights into the pathogenesis and potential therapies of CF bone disease. 10th European CF Young Investigators Meeting, Paris, France, 2016

- **Delion M**, Velard F, Guillaume C, Gangloff S, Le Pimpec-Barthes F, Sermet-Gaudelus I, Jacquot J. La perte osseuse dans la mucoviscidose: un rapport RANK-L/OPG élevé dans les ostéoblastes porteurs de la mutation F508del. Journée des Jeunes Chercheurs de la SFR CAP santé, Amiens, France, 2016

- **Delion M**, Velard F, Guillaume C, Gangloff S, Le Pimpec-Barthes F, Sermet-Gaudelus I, Jacquot J. Elevated RANKL-to-OPG ratio in F508del osteoblasts: a possible cause for bone loss in patients with cystic fibrosis 18èmes Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés, Nancy, France, 2016

-Velard F, **Delion M**, Tabary O, Guillaume C, Le Pimpec-Barthes F, Sermet-Gaudelus I, Ingersoll S, Gangloff S, Tirouvanziam R, Jacquot J. New insights into the pathogenesis and potential therapies of CF bone disease. 39th European Cystic Fibrosis Conference, Bâle, Suisse, 2016

-Velard F, **Delion M**, Tabary O, Guillaume C, Gangloff SC, le Pimpec-Barthes F, Sermet-Gaudelus I, Jacquot J. Bone disease in cystic fibrosis: expression of osteocalcin and RANK-L/OPG ratio in human osteoblasts with the F508-del mutation in CFTR. 29th Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Phoenix, Etats-Unis, 2015

-Velard F, **Delion M**, Lemaire F, Tabary O, Touqui L, le Pimpec-Barthes F, Sermet-Gaudelus I, Gangloff SC, Jacquot J. Cystic fibrosis bone disease: is the CFTR corrector C18 an option for therapy? 38th Cystic Fibrosis Society Conference, Bruxelles, Belgique, 2015

-Velard F, **Delion M**, Le Henaff C, Tabary O, Guillaume C, Barthes F, Touqui L, Gangloff S, Sermet-Gaudelus I, Jacquot J. Cystic fibrosis and bone disease: Defective osteoblast function with the F508del mutation in Cfr. 37th Cystic Fibrosis Society Conference, Göteborg, Suède, 2014

Communications affichées:

-**Delion M**, Velard F, Guillaume C, Gangloff S, Le Pimpec-Barthes F, Sermet-Gaudelus I, Jacquot J. Cystic fibrosis bone disease: an increased RANK-L-to-OPG ratio in osteoblasts with the F508del mutation in Cfr. 10th European CF Young Investigators Meeting, Paris, France, 2016

-Velard F, **Delion M**, Tabary O, Guillaume C, Le Pimpec-Barthes F, Sermet-Gaudelus I, Ingersoll S, Gangloff S, Tirouvanziam R, Jacquot J. New insights into the pathogenesis and potential therapies of CF bone disease. 10th European CF Young Investigators Meeting, Paris, France, 2016

-Velard F, **Delion M**, Tabary O, Guillaume C, Le Pimpec-Barthes F, Sermet-Gaudelus I, Ingersoll S, Gangloff S, Tirouvanziam R, Jacquot J. New insights into the pathogenesis and potential therapies of CF bone disease. 13th European Cystic Fibrosis Basic Science Conference, Pisa, Italy, 2016

-**Delion M**, Velard F, Guillaume C, Gangloff S, Le Pimpec-Barthes F, Sermet-Gaudelus I, Jacquot J. Cystic fibrosis bone disease: an increased RANK-L-to-OPG ratio in human osteoblasts with the F508del mutation in Cfr. 39th European Cystic Fibrosis Conference, Basel, Swiss, 2016

-Velard F, **Delion M**, Lemaire F, Guillaume C, Tabary O, Touqui L, le Pimpec-Barthes F, Sermet-Gaudelus I, Gangloff SC, Jacquot J. Bone disease in Cystic Fibrosis : impairment of maturation key factors expression in osteoblasts and potential therapeutic. 17ème Journées de la Société Française de Biologie des Tissus Minéralisés, Clermont-Ferrand, France, 2015

-**Delion M**, Velard F, Lemaire F, Guillaume C, le Pimpec-Barthes F, Sermet-Gaudelus I, Gangloff SC, Jacquot J. Cystic fibrosis bone disease: an elevated RANK-L/OPG protein ratio in osteoblasts with the F508del-CFTR mutation. 17ème Journées de la Société Française de Biologie des Tissus Minéralisés, Clermont-Ferrand, France, 2015

-Velard F, **Delion M**, Guillaume C, Tabary O, Barthes F, Touqui L, Gangloff S, Sermet-Gaudelus I, Jacquot J. CF bone disease: effect of CFTR correctors on human osteoblasts with the f508del mutation. 28th Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Atlanta, Etats-Unis, 2015

-Velard F, **Delion M**, Le Henaff C, Tabary O, Guillaume C, Barthes F, Touqui L, Gangloff S, Sermet-Gaudelus I, Jacquot J. Cystic fibrosis and bone disease: Defective osteoblast function with the F508del mutation in Cfr. 37th Cystic Fibrosis Society Conference, Göteborg, Suède, 2015

ANNEXES

Annexe 1 :

Bone disease in cystic fibrosis: new pathogenic insights opening novel therapies

Osteoporos Int (2016) 27:1401–1412
DOI 10.1007/s00198-015-3343-3



REVIEW

Bone disease in cystic fibrosis: new pathogenic insights opening novel therapies

J. Jacquot¹ · M. Delion · S. Gangloff · J. Braux · F. Velard

Received: 1 September 2015 / Accepted: 24 September 2015 / Published online: 2 October 2015
© International Osteoporosis Foundation and National Osteoporosis Foundation 2015

Abstract Mutations within the gene encoding for the chloride ion channel cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) results in cystic fibrosis (CF), the most common lethal autosomal recessive genetic disease that causes a number of long-term health problems, as the bone disease. Osteoporosis and increased vertebral fracture risk associated with CF disease are becoming more important as the life expectancy of patients continues to improve. The etiology of low bone density is multifactorial, most probably a combination of inadequate peak bone mass during puberty and increased bone losses in adults. Body mass index, male sex, advanced pulmonary disease, malnutrition and chronic therapies are established additional risk factors for CF-related bone disease (CFBD). Consistently, recent evidence has confirmed that CFTR plays a major role in the osteoprotegerin (OPG) and COX-2 metabolite prostaglandin E2 (PGE2) production, two key regulators in the bone formation and regeneration. Several others mechanisms were also recognized from animal and cell models contributing to malfunctions of osteoblast (cell that form bone) and indirectly of bone-resorpting osteoclasts. Understanding such mechanisms is crucial for the development of therapies in CFBD. Innovative therapeutic approaches using CFTR modulators such as C18 have recently shown in vitro capacity to enhance PGE2 production and normalized the RANKL-to-OPG ratio in human osteoblasts bearing the mutation F508del-CFTR and therefore potential clinical utility in CFBD. This review focuses on the recently

identified pathogenic mechanisms leading to CFBD and potential future therapies for treating CFBD.

Keywords Bone disease · CFTR modulators · Cystic fibrosis · F508del-CFTR · Osteoporosis · Treatment

Introduction

Mutations within the gene encoding for the chloride ion channel cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) results in cystic fibrosis, the most common lethal autosomal recessive genetic disease that is characterized by multi-organ pathology that begins early in life [1, 2]. This polyexocrinopathy genetic disease is caused by 1 of the 2000 mutations in the *Cftr* gene; among them the deletion F508 (F508del-CFTR, accounting for 67 % of the total mutant alleles worldwide) is the most common and severe cystic fibrosis (CF) mutation [3, 4]. This causes misfolding, endoplasmic reticulum retention and early degradation of the CFTR protein that prevents its function at the plasma membrane [5]. Other *Cftr* mutations also impair protein folding and production, gating, conductance, splicing or interactions with other cell membrane proteins [4]. The defects in CFTR leads to alterations in the sodium, chloride, bicarbonate and water transport which causes dehydration of secretions with viscous mucus and leads to chronic respiratory obstruction and infections, pancreatic insufficiency and intestinal malabsorption [6, 7]. While many organs are affected in patients with CF, lung disease is the major cause of morbidity and mortality. With the increasing life expectancy due to improvements in the treatment of pulmonary and gastro-intestinal disorders of their disease, other complications of CF have become more prevalent, such as diabetes [8], liver disease [9] and bone disease in CF adult clinic [10–14].

✉ J. Jacquot
jacky.jacquot@inserm.fr

¹ EA 4691, Biomatériaux et Inflammation en Site Osseux (BIOS), SFR CAP-Santé (FED 4231), Université Reims Champagne Ardenne, 1, Avenue du Maréchal Juin, 51095 Reims, France

In addition to expression of CFTR in the variety of epithelial cells, its expression has been found in human bone cells (osteoblasts and osteoclasts), but its precise role in these cells remains to be elucidated [15, 16]. At the clinical level, osteopenia and osteoporosis have been reported in children, adolescents and adults with CF, and the prevalence of CF-related bone disease (CFBD) increases with increasing age [12, 17, 18]. Whether or not this is caused by bone disease around puberty due to a poor acquisition of peak bone mass and worsens with age, lower bone mineral density (BMD) gains are already being observed in CF children as early as 6 years of age with mild disease and normal nutritional status, suggesting that CFBD may, in part, be due to a primary defect in bone metabolism [19]. Less of 5 % of children with CF have CFBD, but this proportion increases to 20 % in adolescence, with 55–65 % of patients older than 45 years affected [20]. The reason of why all older patients are not affected is unknown. In several cross-sectional and longitudinal studies with a large cohort of adolescent and adult CF patients, the incidence of osteopenia and osteoporosis ranges from 34 to 79 % [21–23]. Osteoporosis decreases BMD and makes bones brittle and more susceptible to vertebral fractures in CF adults [24]. Currently, BMD is the most common diagnostic used to assess fracture risk, yet more than half of fractures cannot be explained by BMD alone. A systematic literature review by Paccou and colleagues emphasized the high prevalence of osteopenia and osteoporosis and fracture in young adults with CF, but fracture rate was not simply a low BMD problem [20, 25]. Bone quality and fragility, the subject of growing interest and research efforts, comprise a number of other parameters such as the micro-architecture of trabecular bone, bone geometry, prevalence of microcracks, and importantly, bone matrix material properties including elastic modulus and fracture toughness [26].

Vertebral compressions and rib fractures lead to excessive kyphosis in CF which compromises the thoracic skeletal architecture, with the consequence of an accelerated decline in lung function, ineffective cough and airway clearance, limitations in chest physiotherapy, and potentially contribute to the development of pulmonary exacerbations [17, 27, 28]. CFBD is a common and serious complication, and has been correlated with severity of lung disease [29, 30]. As well as increased mortality, CFBD can be associated with adverse effects on respiratory function and nutritional status. Whether CFBD is more likely to occur in patients with worse pulmonary disease and exacerbations remains uncertain, as does whether or not CFBD contributes to worsening of respiratory function. Recently, Alicandro and colleagues reported that recurrent acute pulmonary exacerbations are associated with reduced fat free mass and low BMD in young adults with CF (although the correlation was only seen in male) [31].

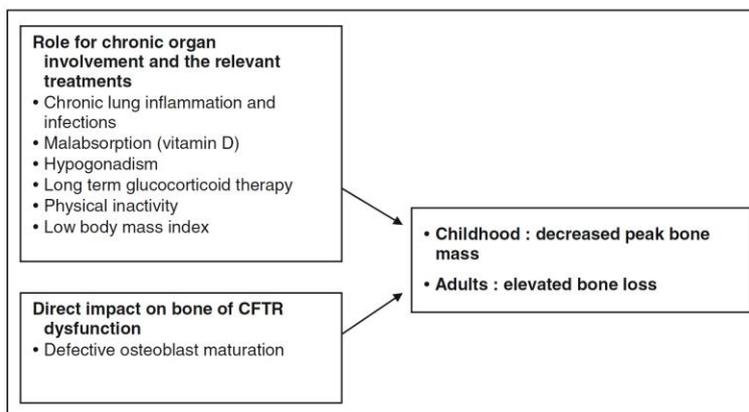
Pathogenesis and importance of early diagnosis of CFBD

The pathogenesis of the CFBD and the increased risk of rib and vertebral fractures in patients with CF is currently not well defined. The cause of CFBD is thought to be multifactorial including pancreatic insufficiency, diabetes mellitus, pulmonary inflammation/infection, sex hormonal insufficiency, vitamin D and vitamin K insufficiency, calcium malabsorption, malnutrition, delayed puberty, use of exogenous glucocorticoids, physical inactivity and the effect of CFTR dysfunction on bone cell activity (Fig. 1) [11, 14, 17, 27, 28, 32, 33].

In the context of CF physiopathology, a direct association between the F508del mutation and a reduced bone density was demonstrated in young CF adults [34]. An imbalance of an increased bone resorption and decreased bone formation rate has been observed in CF patients [23, 28, 33], even in young prepubertal children [21]. The CFBD development may be largely related to the role of chronic inflammation and infection in CF patients [35]; however, evidence for the only involvement of osteoclasts (bone-resorptive cells) in CFBD is weak. Indeed, serum resorption markers are not consistently elevated, serum osteoclast precursors seem to be increased only in the context of infective exacerbations [30] and potent inhibitors of bone resorption, as oral bisphosphonates, have modest effects in amelioration of bone mass in CF [12]. This suggests that other cell types beyond osteoclast lineage, such as the osteoblast (the cell that form bone), might be affected.

Low bone mass in adult patients with CF has been attributed to a failure to thrive and accrue bone during childhood and adolescence. Through histomorphometric data, Elkin and colleagues revealed bone harvested from adult patients with CF with low BMD to have reduced trabecular bone volume compared with age- and sex-matched healthy control subjects, which was ascribed to low bone formation [36]. A second study, in which histomorphometric analysis of bone taken at autopsy from patients treated with corticosteroids, revealed the existence of cortical and trabecular osteopenia in the CF specimens, in association with decreased osteoblastic and increased osteoclastic activity. Supporting this, using the high-resolution peripheral quantitative computed tomography (HR-pqCT), Putman and colleagues recently reported that young adults with CF had lower bone area and estimated bone strength at the radius and had compromised trabecular microarchitecture as well as lower total and trabecular vBMD and estimated strength at the tibia, even after accounting for their smaller body size [37]. The authors suggest that alterations in the trabecular bone and estimated bone strength in the weight bearing bones of young adults with CF are greater than reflected in areal BMD findings, which may help explain the propensity to fracture trabecular-rich bones such as vertebrae.

Fig. 1 Pathophysiological mechanisms involved in CFBD



Over the past two decades, investigators have conducted studies involving patients with CF at progressively earlier time points. We have learned that during childhood and puberty the CF patients achieve approximately half of the bone density than their healthy counterparts [18]. Interestingly, recent evidence from clinical and CF mice model studies suggests that loss of functional CFTR does not only cause osteoblast dysfunction in bones associated with a reduced bone mass [34, 38, 39], but also in airway cartilage, which may be important for airway development and dysfunction. Reports have shown that mice, rats and pigs with CF, but not ENaC overexpressing mice with CF-like lung disease show abnormalities in tracheal cartilage development with early airflow obstruction [40–43], suggesting a critical role of CFTR dysfunction independent of deficient ion transport/airway surface liquid depletion. Understanding the initial defects in the chondrocyte and osteoblast activities of patients with CF could suggest new preventions and treatments, as well as the means to assess the bone status and the efficacy of therapeutic agents. Studies involving children at early age might reveal the origins of CFBD and thereby change the clinical practice. Additional reasons to elucidate the origins of the CFBD are the implantation of universal screening to detect CF in newborns and potential novel therapeutic avenues that target directly CFTR [44, 45].

Early risk markers for CFBD would be clinically useful. Apart from measuring BMD, biochemical bone turnover markers in blood showing a global skeletal activity have lately been developed for the assessment of the dynamics of bone formation and resorption. Bone remodelling is mainly regulated by the cellular interactions of bone-forming osteoblasts and bone-resorptive osteoclasts. Data regarding biochemical bone metabolism markers in CF pediatric population are limited, sometimes conflicting and until recently not fully explained [46, 47]. Among them, the osteocalcin (OC, also known as bone-Gla-protein, BGP), a biomarker of osteoblast activity, and the complex of cytokines RANKL and

osteoprotegerin (OPG), two products secreted from osteoblasts, are considered to be clinically useful. Reduced circulating OC levels were observed in CF patients with vertebral fractures [24]. More recently, a lower serum OC level associated with a higher RANKL/OPG ratio, suggesting both an increased bone resorption and a low bone formation rate, was observed of children with CF aged 5–9 years compared to healthy controls [21]. Therefore, a less elevated OC level and a high RANKL/OPG ratio observed in sera of young children with CF may favour an increased risk of CFBD.

New mechanistic concepts on CFBD

During the past 15–20 years, patients with CF have been living longer, largely due to improvements in their nutritional support and the development of new medications and interventions to reduce pulmonary and gastrointestinal decline. In 2005 and 2011 years, the Cystic Fibrosis Foundation and the European Cystic Fibrosis Society, respectively, established guidelines addressing further attention to optimizing bone health in patients with CF. Improvements in the control of lung infections, therapies towards a better mucociliary clearance and an early identification of non-pulmonary complications have contributed to ameliorate the clinical care of young patients with CF [22, 48, 49]. However, despite significant improvements in clinical care and life expectancy, a recent and solid clinical study demonstrated that average BMD in spine and distal radius in young adults with CF is always reduced and has not changed over a 15-year period when compared to that previously evaluated in an age-, race- and gender-matched cohort of young adults with CF in the 1995–1999 period [50]. Therefore, despite improved respiratory function and lower prevalence of vitamin D deficiency in these CF patients, other factors such as inflammation, hyperglycemia, reduced physical activity and the CFTR dysfunction itself may be playing an important role in the CFBD. The

authors suggest that attention to bone health including aggressive nutritional interventions and attempts to reduce the use of glucocorticoid may be important in preventing this complication.

Abnormalities in bone turnover

Bone metabolism is tightly regulated by a number of growth factors, prostaglandins and hormones which control both the bone formation and resorption processes [51, 52]. Major pathogenic mechanisms mediating the development of CFBD in patients with CF may result from a combination of episodes of low bone turnover and formation rate during periods of disease stability, and an increased bone turnover and resorption during infective exacerbations. Studies have reported that CF newborns are shorter and have a lower body weight than non-CF newborns [53]. Others have suggested that reduced levels of serum insulin-like growth factor I (IGF-1) might be responsible, at least in part, for the growth defect reported in patients with CF [54] which was also observed in both *Cftr*^{-/-} mouse and newborn *Cftr*^{-F508} pig models [55]. Reinforcing these findings, we also reported lower levels of serum IGF-1 in young and adult F508del mice which might contribute to the impaired bone formation [38]. A low bone turnover with reduced bone formation and no evidence for increased bone resorption has been reported in young adults with CF [34, 36, 56] which might be related to sex steroid imbalance [17]. Regarding sex hormones, 17 β -estradiol deficiency is known to affect bone metabolism in both humans and mouse models [57]. In patients with CF, low serum 17 β -estradiol levels were found with prevalent vertebral fractures in both genders [24]. Interestingly, both the CF mouse models with the 489X and F508del mutation in *Cftr* gene display higher follicular stimulating hormone levels, suggesting a possible decrease in 17 β -estradiol production [58].

CFTR dysfunction in bone cells

In humans, the expression of CFTR protein has been identified in two major bone cells, i.e. in osteoblasts and osteoclasts [16], but only in murine osteoblasts [39]. In human osteoblasts obtained from a 25-year-old CF male with the F508del/G542X mutation in CFTR, we discovered a defective CFTR-mediated Cl⁻ channel activity and a severe deficit of the production of OPG [59] which is a key regulator in bone density [60]. These data raised the hypothesis that the *Cftr* gene may play a role in cell differentiation and bone matrix maturation (Table 1).

The use of mouse models with a *Cftr* invalidation or with the F508 mutation in *Cftr* eliminates other clinical parameters, namely lung disease and chronic malnutrition that are absent in these models [61, 62]. Genetic studies in *Cftr*^{-/-} mice have shown that *Cftr* invalidation causes low bone mass and altered

microarchitecture, a phenotype associated with decreased bone formation and increased bone resorption [61, 63, 64]. More recently, Stalvey and colleagues demonstrated altered osteoblast differentiation with reduced OPG production in cultured calvaria cells from *Cftr*^{-/-} mice [39]. However, the relevance of the global *Cftr* invalidation to cystic fibrosis disease resulting from *Cftr* mutations is not known. We reported that the F508del mutation in *Cftr* also causes reduced bone mass as a result of decreased osteoblast activity and bone formation in mice, independently of age and sex [65]. Interestingly, we showed that improvement of the defective F508del CFTR in osteoblasts by the in vivo administration of a CFTR corrector, the miglustat, in young F508del CF mice normalized bone volume and improved bone formation, bone mass and bone microarchitecture in the lumbar spine and femur (Fig. 2) [38]. Since miglustat has been approved in adult patients with type I Gaucher disease [66, 67] and in pediatric and adult patients with Niemann-Pick type C disease [68], these findings provide a strong rationale for oral administration of miglustat for treating bone loss in CF-related bone disease.

In human osteoblasts with F508del-CFTR, we also noted a defective CFTR-mediated chloride channel activity compared to healthy osteoblasts [32]. No significant difference in levels of osteoblast gene expression related to differentiation (collagen type1, OC, ON, ALPL, RUNX2, OSX) was found between F508del osteoblasts and healthy osteoblasts. By contrast, we detected a severe defective maturation of F508del osteoblasts with a diminished expression of SMAD2, COX-2 mRNA and at a lesser extend for OPG but elevated RANKL mRNA level. We reported a significant increase of RANKL/OPG mRNA ratio expression in F508del osteoblasts, as previously shown in murine calvarial osteoblasts with the *Cftr*^{-/-}, suggesting a potentially increased bone resorption [39]. Furthermore, we found that the basal production of OPG protein and COX-2 metabolite prostaglandin E2 (PGE2), a potent immuno-modulatory mediator, was greatly reduced by human F508del osteoblasts. Interestingly, we previously provided evidence that inhibition of CFTR-chloride channel function in normal human osteoblasts resulted in a significant reduction of OPG [15]. The OPG expression is mediated through the Wnt/ β -catenin signaling cascade [52] and was found to be involved in the regulation of bone density [60]. COX-2 is an enzyme that converts arachidonic acid to prostaglandins (PGs) such as PGE2 and cyclopentenone prostaglandin 15d-PGJ₂, which are both required to mediate the full effects of Wnt/ β -catenin signaling [69] and induce the osteoblastic activity [70]. COX-2 activity and PGE2 have been identified as key mediators in the initial step of osteogenesis and the latter step of osteoblast maturation, supporting an important role for COX-2 and PGE2 in the regulation of skeletal growth and efficient bone fracture healing [71, 72].

authors suggest that attention to bone health including aggressive nutritional interventions and attempts to reduce the use of glucocorticoid may be important in preventing this complication.

Abnormalities in bone turnover

Bone metabolism is tightly regulated by a number of growth factors, prostaglandins and hormones which control both the bone formation and resorption processes [51, 52]. Major pathogenic mechanisms mediating the development of CFBD in patients with CF may result from a combination of episodes of low bone turnover and formation rate during periods of disease stability, and an increased bone turnover and resorption during infective exacerbations. Studies have reported that CF newborns are shorter and have a lower body weight than non-CF newborns [53]. Others have suggested that reduced levels of serum insulin-like growth factor I (IGF-1) might be responsible, at least in part, for the growth defect reported in patients with CF [54] which was also observed in both *Cfir*^{-/-} mouse and newborn *Cfir*^{-F508} pig models [55]. Reinforcing these findings, we also reported lower levels of serum IGF-1 in young and adult F508del mice which might contribute to the impaired bone formation [38]. A low bone turnover with reduced bone formation and no evidence for increased bone resorption has been reported in young adults with CF [34, 36, 56] which might be related to sex steroid imbalance [17]. Regarding sex hormones, 17 β -estradiol deficiency is known to affect bone metabolism in both humans and mouse models [57]. In patients with CF, low serum 17 β -estradiol levels were found with prevalent vertebral fractures in both genders [24]. Interestingly, both the CF mouse models with the 489X and F508del mutation in *Cfir* gene display higher follicular stimulating hormone levels, suggesting a possible decrease in 17 β -estradiol production [58].

CFTR dysfunction in bone cells

In humans, the expression of CFTR protein has been identified in two major bone cells, i.e. in osteoblasts and osteoclasts [16], but only in murine osteoblasts [39]. In human osteoblasts obtained from a 25-year-old CF male with the F508del/G542X mutation in CFTR, we discovered a defective CFTR-mediated Cl⁻ channel activity and a severe deficit of the production of OPG [59] which is a key regulator in bone density [60]. These data raised the hypothesis that the *Cfir* gene may play a role in cell differentiation and bone matrix maturation (Table 1).

The use of mouse models with a *Cfir* invalidation or with the F508 mutation in *Cfir* eliminates other clinical parameters, namely lung disease and chronic malnutrition that are absent in these models [61, 62]. Genetic studies in *Cfir*^{-/-} mice have shown that *Cfir* invalidation causes low bone mass and altered

microarchitecture, a phenotype associated with decreased bone formation and increased bone resorption [61, 63, 64]. More recently, Stalvey and colleagues demonstrated altered osteoblast differentiation with reduced OPG production in cultured calvaria cells from *Cfir*^{-/-} mice [39]. However, the relevance of the global *Cfir* invalidation to cystic fibrosis disease resulting from *Cfir* mutations is not known. We reported that the F508del mutation in *Cfir* also causes reduced bone mass as a result of decreased osteoblast activity and bone formation in mice, independently of age and sex [65]. Interestingly, we showed that improvement of the defective F508del CFTR in osteoblasts by the in vivo administration of a CFTR corrector, the miglustat, in young F508del CF mice normalized bone volume and improved bone formation, bone mass and bone microarchitecture in the lumbar spine and femur (Fig. 2) [38]. Since miglustat has been approved in adult patients with type I Gaucher disease [66, 67] and in pediatric and adult patients with Niemann-Pick type C disease [68], these findings provide a strong rationale for oral administration of miglustat for treating bone loss in CF-related bone disease.

In human osteoblasts with F508del-CFTR, we also noted a defective CFTR-mediated chloride channel activity compared to healthy osteoblasts [32]. No significant difference in levels of osteoblast gene expression related to differentiation (collagen type1, OC, ON, ALPL, RUNX2, OSX) was found between F508del osteoblasts and healthy osteoblasts. By contrast, we detected a severe defective maturation of F508del osteoblasts with a diminished expression of SMAD2, COX-2 mRNA and at a lesser extent for OPG but elevated RANKL mRNA level. We reported a significant increase of RANKL/OPG mRNA ratio expression in F508del osteoblasts, as previously shown in murine calvarial osteoblasts with the *Cfir*^{-/-}, suggesting a potentially increased bone resorption [39]. Furthermore, we found that the basal production of OPG protein and COX-2 metabolite prostaglandin E2 (PGE2), a potent immuno-modulatory mediator, was greatly reduced by human F508del osteoblasts. Interestingly, we previously provided evidence that inhibition of CFTR-chloride channel function in normal human osteoblasts resulted in a significant reduction of OPG [15]. The OPG expression is mediated through the Wnt/ β -catenin signaling cascade [52] and was found to be involved in the regulation of bone density [60]. COX-2 is an enzyme that converts arachidonic acid to prostaglandins (PGs) such as PGE2 and cyclopentenone prostaglandin 15d-PGJ₂, which are both required to mediate the full effects of Wnt/ β -catenin signaling [69] and induce the osteoblastic activity [70]. COX-2 activity and PGE2 have been identified as key mediators in the initial step of osteogenesis and the latter step of osteoblast maturation, supporting an important role for COX-2 and PGE2 in the regulation of skeletal growth and efficient bone fracture healing [71, 72].

Table 1 Impact of CFTR dysfunction on bone metabolism

| Mutated/inhibited/corrected CFTR | Impact on bone metabolism | References |
|--|---|------------|
| <i>Cftr</i> ^{-/-} mice (aged 3 weeks) | Osteopenia and low BMD in male and female mice | [63] |
| <i>Cftr</i> ^{-/-} mice (aged 8,12 and 28 weeks) | Osteopenia, low BMD and decreased bone formation rate in male and female mice | [64] |
| <i>Cftr</i> ^{-/-} mice treated with intestinal hCFTR (aged 14 weeks) | Osteopenia and low BMD in male and female mice | [61] |
| F508del- <i>Cftr</i> mice (aged 6, 10 and 14 weeks) | Osteopenia, low BMD and decreased bone formation rate in male and female mice | [65] |
| F508del- <i>Cftr</i> male mice (aged 6 weeks) treated with miglustat for 4 weeks | Improved bone formation rate, bone mass and microarchitecture in the lumbar spine and femur | [38] |
| <i>Cftr</i> ^{-/-} murine calvarial organ cultures | Reduced differentiation and osteoprotegerin production | [39] |
| Normal human osteoblasts cultured with the pharmacological CFTR inhibitor CFTR inh-172 | Reduced osteoprotegerin production | [15] |
| Primary human osteoblasts bearing the F508del-CFTR mutation | Reduced osteoblast maturation, reduced COX-2 metabolite PGE2 production and elevated RANKL-to-OPG ratio | [32] |
| Human F508del-CFTR osteoblasts treated with CFTR modulator C18 | Increased PGE2 production and reduced RANKL-to-OPG ratio | [143] |

Interestingly, Baudouin-Legros and colleagues had reported that the absence of a functional CFTR Cl⁻ channel in human pulmonary cells modified the PGs production, and particularly reduced the secretion of PGE2 and 15d-PGJ₂ [73]. Lower secretion of PGE2 and impaired responsiveness to PGE2 by lung-resident mesenchymal stem cells has been

associated with an increased risk of bronchiolitis obliterans syndrome [74]. PGE2 has been shown to inhibit the TNF- α and induced the anti-inflammatory cytokine IL-10 [75]. Recent clinical genetic and cellular evidence studies have suggested that the PGE2 pathway may indeed be a therapeutic potential in primary graft dysfunction after lung transplantation [76].

Strong evidence also highlights the anti-inflammatory role of 15d-PGJ₂ by its effects on transcriptional pathways such as PPAR- γ , NRF2 and NF- κ B, and its modulation of IL-1- β release through inhibition of the NLR inflammasomes [77, 78]. A number of studies have shown that 15d-PGJ₂ has therapeutic potential in animal models of inflammatory disease [79]. In a non-CF context of bone remodelling, small doses of 15d-PGJ₂ favoured the osteoblast activity and the bone-related proteins expression, and recent *in vivo* studies have shown that 15d-PGJ₂ inhibited osteolytic breast cancer bone metastasis and estrogen deficiency-induced bone loss through a normalized RANKL/OPG ratio expression in osteoblasts via PPAR- γ independent pathways [70, 80]. Future studies need to analyse the effects of exogenous 15d-PGJ₂ in the function of CFTR-deficient osteoblasts and in the rate of bone formation in CF models.

Increasing evidence also highlights the local actions of lipids in bone physiology [81]. CFTR dysfunction causes abnormalities in sphingolipid metabolism [82, 83], and a decreased level of sphingosine-1-phosphate (S1P) was observed in CF lung disease [84, 85], a ubiquitous signalling mediator that directs a diverse array of biological processes [86]. S1P formed by phosphorylation of sphingosine catalysed by two sphingosine kinases (SPHK1 and SPHK2) is a well-known bioactive lipid mediator, playing important roles in many tissue repair processes, including bone regeneration and osseous tissue growth *in vivo* [87]. It has been recently proposed that

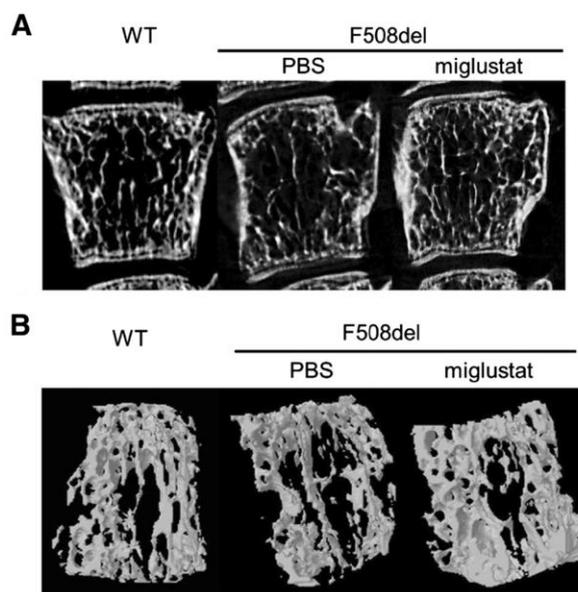


Fig. 2 Miglustat increases vertebral bone volume in F508del mice. Micro-computed tomography analysis of lumbar spine in F508del and WT mice treated with miglustat for 4 weeks. Representative two-dimensional cross-sectional scans (a) and three-dimensional reconstructions (b) showing evidence that the connecting rods of trabeculae were disrupted in vertebrae of PBS-treated F508del mice compared with PBS-treated WT mice. Note that treatment with miglustat increases the number of bone trabeculae in vertebrae of F508del mice. Reproduced from Le Henaff and colleagues, 2014 [38]

the S1P gradient between peripheral blood (high S1P concentrations) and the bone microenvironment (low S1P concentration) would be a determinant of bone remodelling [88, 89]. Clinical data suggested that plasma S1P may be a potential biomarker for the risk of osteoporotic vertebral fracture, independent of BMD, in postmenopausal women [89]. S1P activates the Wnt/ β -catenin signaling and thereby induces the OPG expression in osteoblastic cell lines [90]. The CFTR protein has been shown to be involved in the cellular uptake of S1P in a mouse model of heart failure [91, 92], and recent data highlight the S1P molecule as a potentially important player in the activity of bone cells by increasing the PGE2 production, reducing the RANKL/OPG ratio expression and ameliorating bone formation [93, 94]. It is tempting to speculate that CFTR could be involved in the S1P signalling in bone cells, which would explained some of the aberrant activities observed in CFTR-deficient osteoblasts. Future studies also need to analyse S1P transport and its effect in CFTR-deficient osteoblasts.

Altered bone-pancreas loop

The primary function of the skeleton has been long relegated in providing mechanical support, responding to external mechanical forces and storing minerals. However, the skeleton has recently emerged as an additional player in the control of whole-body glucose metabolism. Many evidences highlight the skeleton as an endocrine “gland”, and specifically, of bone-specific proteins, as OC, and proteins involving in bone remodelling, as OPG, in the regulation of insulin and glucose metabolism. Solid genetic-based studies in mice have shown that there is a coordinated regulation between bone mass and growth, glucose homeostasis, energy expenditure, brain development and reproduction [95–99]. Osteoblasts have been shown to control glucose homeostasis through the secretion of OC and other osteoblast-derived regulators via the neuropeptide Y (NPY) signalling [99], which acts on pancreatic islets and adipose tissue [100–102], and in male fertility [103]. In humans, OC is incompletely carboxylated and therefore circulates in both a fully carboxylated (OC) and undercarboxylated (ucOC) or uncarboxylated (uOC) form [104]. The physiological meanings of the relative changes in OC, ucOC and uOC are still unknown [105]. Only the ucOC and uOC forms of OC are active on target organs [100]. The identification of ucOC, as an osteoblast-derived polypeptide hormone that stimulates insulin sensitivity in peripheral tissues and insulin secretion by the pancreas, has opened the way for new fields of research [106]. In humans, one report has provided evidence that lowering serum ucOC levels might elevate serum glucose levels [107]. Therefore, interactions between bone, pancreas and other organs need to be further explored. Insulin signalling in osteoblasts decreases expression of OPG and induces OC expression. Reduction of OPG

favours the differentiation of bone-resorptive osteoclasts and the low pH of resorption lacunae promotes the decarboxylation of OC and consequently its activation. The ucOC form released in the circulation stimulates pancreatic β cells insulin secretion and also increases the insulin sensitivity in liver, muscle and adipose tissue [95, 102, 106]. In a large cohort of 2966 patients without CF, clinical data showed that higher serum ucOC and other bone turnover markers are associated with reduced diabetes risk and lower estradiol concentration [108]. Of note, in a pediatric CF population, dysglycaemia was shown to be associated with reduced bone mass accrual, in addition to recognized factors such as abnormal function, poor nutritional status and disease severity. These authors concluded that bone health assessment is essential in youth with CF [109]. In humans, long-term glucocorticoid treatment is associated with numerous adverse outcomes, including weight gain, insulin resistance, diabetes and osteoporosis [110, 111]. The effects of glucocorticoids on the skeleton and particularly the osteoblast are manifested by a rapid and profound suppression of serum markers of bone formation as OC, which correlates with bone loss [112]. Brennan-Speranza and colleagues postulate that the effects of exogenous high-dose glucocorticoids on insulin target tissues and systemic energy metabolism are mediated, at least in part, through the osteoblast [113].

All these observations show that the bone-pancreas loop is very complex and studies will be necessary to evaluate, in the CF population, the impact of the connection between the low bone-related proteins and dysglycaemia. Development of new drugs that simultaneously target the skeleton, the glucose metabolism and the adipose tissue are certain to be considered a future perspective in the CF disease.

Misbalance in the immune system

A relationship between the immune system and bone has long been speculated as bone loss is an invariable pathology of autoimmune and inflammatory conditions [114]. The parallel progression of decline in lung function, diabetes and CFBD in patients with CF is not fully understood, but experimental evidence suggests that chronic inflammation might be involved in both processes. Diabetes has been identified as an independent risk factor for the development of osteoporosis in people without CF, and dysglycaemia in young people with CF was found to be associated with reduced bone mass accrual, in addition to recognized factors such as abnormal lung function, poor nutritional status and disease severity [109, 115]. Patients with CF have increased glucose fluctuations and hyperglycemia, and therefore may lead to lymphocyte dysfunction [116]. The function of lymphocytes is susceptible not only to dysglycaemia but also to non-optimal levels of vitamin D which could both trigger aberrant immune responses in CF [117].

It has become increasingly clear that CFTR plays a role in lung immune cells, and that the dysfunction of the CFTR affects immune cell responses [118, 119]. T-helper 17 lymphocytes (Th17) have been implicated in various immune-mediated diseases [120]. In patients with CF, there is some evidence that Th17, neutrophils and natural killer T cells, all producing the pro-inflammatory cytokine IL-17A, perpetuate the excessive inflammatory process in lung tissue [121, 122]. IL-17 has been also reported to be an important mediator of inflammatory arthritis and other diseases affecting the bone [123]. Interestingly, strong data provide that IL-17 promotes bone loss by favouring osteoclast production and inhibiting osteoblast differentiation, and whose production is under the negative regulation of 17 β -estradiol [124]. However, in patients with CF, data supporting the bone loss by elevated IL-17 levels is currently lacking.

In CF disease, chronic inflammation leads to elevated levels of other pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8,...) which have stimulatory and/or inhibitory effects on the development and activity of bone cells [125, 126]. Recent clinical data have reported that CF complications with TNF gene polymorphisms coupled with high TNF- α production are associated with a decrease of bone density [127]. Interestingly, Li and colleagues had shown that suppression of basal TNF- α signaling in *in vivo* and *in vitro* bone models enhanced differentiation and mineralization of osteoblasts and ameliorated bone formation, suggesting that TNF- α and NF- κ B antagonists may represent novel anabolic agents for the maximization of peak basal bone mass and/or the amelioration of pathological bone loss [128].

Current and emerging novel therapies

Despite increasing research in the CFBD, numerous questions about pathogenesis and appropriate therapy still remain. The current assay of therapeutic tools available for CFBD is based on the preventive treatment with vitamin D and calcium supplementation, and maintaining lung health and nutrition [22, 33]. However, no evidence of benefit in three clinical trials consisting of vitamin D and calcium supplementation in CF patients was found [129].

Clinical trials are underway with the goal of finding new potential treatments that might prevent the development of CFBD including anti-resorptive agents such as oral bisphosphonates and anabolic agents such as human recombinant growth hormones (hrGH) and parathyroid hormone (PTH) [12]. To reduce the risk of bone disease in adults with CF, European guidelines recommend optimizing nutrition to gain a normal body mass index; vitamin D, vitamin K and calcium supplementation; and weight-bearing exercise for 30 min three times a week [22]. Oral or intravenous bisphosphonates are recommended for patients whose T-

score or Z-score is lower than -2 , who are on the transplant waiting list or whose bone mineral density is falling by more than 3–5 % per year. Bisphosphonates are potent inhibitors of osteoclastic bone resorption and numerous clinical trials have reported that they can improve BMD without reducing fracture risks in adults with CF [12]. Additional problems with oral bisphosphonates therapy include poor absorption leading to ineffective therapy in some CF patients and concerns of higher incidence of erosive pill esophagitis. Administration of bisphosphonates has been also associated with bone pain and flu-like symptoms, which could adversely impact the pulmonary status of patients with CF [17].

Early recognition and treatment are the most effective strategies for sustaining bone health to help maintain quality of life in young patients with CF. Strategies for optimizing bone health—i.e. bone mineral density—and providing preventive care are necessary from childhood to adolescence to minimize CFBD in adult patients. Clinical trial data is especially limited in the CF pediatric age group. One report provides convincing evidence that the oral bisphosphonate alendronate is effective, well tolerated and safe for young patients with CF [130]. However, the use of bisphosphonates in children with CF is controversial because of potential long-term safety and tolerability concerns including over suppression of bone formation. Bisphosphonates inhibit bone resorption, but they concomitantly reduce the circulating levels of bone formation markers and OC (up to 50 %) even long time after the end of treatment in postmenopausal women [131]. The European cystic fibrosis bone mineralization guidelines recently highlighted controversial issues such as the use of bisphosphonates and vitamin D supplementation regimens in children and adolescents indicating the need for other therapeutic trials for treating CF-related skeletal deficits [22]. Thus, there is an urgent need for an efficient and safe anti-osteopenic treatment to favour the bone formation in patients with CF.

Teriparatide, a recombinant form of human parathyroid hormone, has been approved as a bone formation agent for use in osteoporotic postmenopausal women [132]. Controlled trials evaluating teriparatide and bisphosphonates therapy in postmenopausal women with osteoporosis have suggested that teriparatide is effective in increasing BMD and reducing fracture risk [133]. Recently, in a small study of patients with CF aged 31–59 years receiving teriparatide for 2 years, significant improvements of their BMD was observed. The authors suggested that anabolic therapy for CFBD may be an effective and safe treatment modality, particularly in those who are intolerant of bisphosphonates [134].

The recent development of CFTR-targeted drugs that emerged from high-throughput screening and are able to correct the basic protein defects promises to transform the therapeutic landscape from a trial-and-error prescription to personalized type of mutation-based medicine [135–137]. New treatments that target the F508del mutation through the use of

potentiators and correctors of chloride channels are being developed in the care of cystic fibrosis-related lung pathology [138]. Certain small-molecule “corrector” compounds have been shown to partially rescue the functional expression of F508del-CFTR on the membrane of epithelia in patient-derived airway cultures, providing the rationale for clinical trials of the best compounds, including VX-809 (Lumacaftor) [139, 140]. Recently, a combined therapy with a CFTR corrector and potentiator (Lumacaftor and Kalydeco) named Orkambi has been tried in patients homozygotes for F508del, on pulmonary end-points (FEV1), with promising data based on hypothesized synergic effects of two combined molecules [45]. Previous *in vitro* studies had shed considerable light on the potential mechanism of action of the structurally related compounds VX-809 and C18 (also known as VRT-534) showing the correctors VX-809 and C18 bind to the full-length F508del-CFTR and enhance the channel-active form of the metastable F508del-CFTR protein after its biosynthetic rescue [141, 142]. In a recent investigation of our laboratory, we showed that in primary human osteoblasts with the F508 mutation, C18 is able to restore the defective channel function and ameliorate the COX-2/PGE2 expression and production and counteracting the elevated RANKL-to-OPG ratio [143]. Thus, this opens the possibility of a clinical use of C18 and/or other analogues of C18 in patients bearing the F508del mutation in CFTR. Kalydeco, a CFTR potentiator, was approved by the Food and Drug Administration (FDA) in 2012 for treatment of the 4 to 5 % patients who have the Gly551Asp mutation in CFTR. Kalydeco corrects the sweat chloride defect, improves pulmonary function and patient-reported respiratory symptoms, and results in substantial weight gain [144]. Therefore, in patients with G551Asp, who have the longest Kalydeco treatment exposure, it will be very interesting to assess BMD cross sectionally and longitudinally in Kalydeco-treated patients.

Conclusions and unresolved questions

CFBD is a common and serious complication in the aging CF population, and can significantly affect the health, well-being and longevity of these patients. The longer life expectancy and better diagnostic methods have made CFBD one the prevalent co-morbidity of CF, beside typical lung pathology and diabetes. In young and adult patients with CF, the dynamic status of bone formation and resorption is altered. Further studies are needed to understand the underlying pathophysiology, the contribution of CFTR and clinical implications of these bone alterations. It is relevant to underline that early recognition and treatment of CFBD can be of substantial benefit to compensate excessive catabolism and the overall outcome of CF. However, despite the major advances in CFBD research, we are still faced with unresolved questions and remaining

challenges. For example, how effectively misprocessing of the most common mutation F508del can be corrected and how much correction is required to yield clinical benefits in patients? Can rescue of mutant CFTR function prevent and/or normalize CFBD? How early do we need to start treatment with CFTR modulators to delay or even prevent CFBD?

As sensitive noninvasive outcome measures for assessment of abnormal microarchitecture and bone strength in patients with CF, such as the high-resolution peripheral quantitative computed tomography (HR-pqCT) are becoming available [37], the CFTR modulators clinical trial programs should be extended to studies in CF children and infants as soon as possible to exploit the narrow window of opportunity that has been created by widespread implementation of newborn screening and determine to what extent early therapy can delay or even prevent irreversible bone damage in patients with CF.

Conflict of interests None.

Support statement This study was supported in part by funds from the French Cystic Fibrosis Association Vaincre la Mucoviscidose (RF20150501235 to J. Jacquot). M. Delion is a PhD scholarship recipient from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, Paris, France

References

- Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavics N, Chou JL et al (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA [published erratum appears in *Science* 1989 Sep 29;245(4925):1437]. *Science* 245:1066–1073
- Stoltz DA, Meyerholz DK, Welsh MJ (2015) Origins of cystic fibrosis lung disease. *N Engl J Med* 372:351–362
- Boyle MP, De Boeck K (2013) A new era in the treatment of cystic fibrosis: correction of the underlying CFTR defect. *Lancet Respir Med* 1:158–163
- Riordan JR (2008) CFTR function and prospects for therapy. *Annu Rev Biochem* 77:701–726
- Cheng SH, Gregory RJ, Marshall J, Paul S, Souza DW, White GA, O'Riordan CR, Smith AE (1990) Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell* 63:827–834
- Boucher RC (2004) New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Eur Respir J* 23:146–158
- O'Sullivan BP, Freedman SD (2009) Cystic fibrosis. *Lancet* 373:1891–1904
- Kelly A, Moran A (2013) Update on cystic fibrosis-related diabetes. *J Cyst Fibros* 12:318–331
- Rowland M, Bourke B (2011) Liver disease in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med* 17:461–466
- Plant BJ, Goss CH, Plant WD, Bell SC (2013) Management of comorbidities in older patients with cystic fibrosis. *Lancet Respir Med* 1:164–174
- Stalvey MS, Clines GA (2013) Cystic fibrosis-related bone disease: insights into a growing problem. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 20:547–552

12. Conwell LS, Chang AB (2014) Bisphosphonates for osteoporosis in people with cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev* 3: CD002010
13. Haworth CS, Webb AK, Egan JJ, Selby PL, Hasleton PS, Bishop PW, Freemont TJ (2000) Bone histomorphometry in adult patients with cystic fibrosis. *Chest* 118:434–439
14. Javier RM, Jacquot J (2011) Bone disease in cystic fibrosis: what's new? *Joint Bone Spine* 78:445–450
15. Le Heron L, Guillaume C, Velard F, Braux J, Touqui L, Moriceau S, Sermet-Gaudelus I, Laurent-Maquin D, Jacquot J (2010) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) regulates the production of osteoprotegerin (OPG) and prostaglandin (PG) E(2) in human bone. *J Cyst Fibros* 9:69–72
16. Shead EF, Haworth CS, Condliffe AM, McKeon DJ, Scott MA, Compston JE (2007) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) is expressed in human bone. *Thorax* 62:650–651
17. Aris RM, Merkel PA, Bachrach LK, Borowitz DS, Boyle MP, Elkin SL, Guise TA, Hardin DS, Haworth CS, Holick MF, Joseph PM, O'Brien K, Tullis E, Watts NB, White TB (2005) Guide to bone health and disease in cystic fibrosis. *J Clin Endocrinol Metab* 90:1888–1896
18. Bianchi ML, Romano G, Saraifofer S, Costantini D, Limonta C, Colombo C (2006) BMD and body composition in children and young patients affected by cystic fibrosis. *J Bone Miner Res* 21: 388–396
19. Sermet-Gaudelus I, Souberbielle JC, Ruiz JC, Vrielynck S, Heuillon B, Azhar I, Cazenave A, Lawson-Body E, Chedevergne F, Lenoir G (2007) Low bone mineral density in young children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 175:951–957
20. Paccou J, Zeboulon N, Combescure C, Gossec L, Cortet B (2010) The prevalence of osteoporosis, osteopenia, and fractures among adults with cystic fibrosis: a systematic literature review with meta-analysis. *Calcif Tissue Int* 86:1–7
21. Ambroszkiewicz J, Sands D, Gajewska J, Chelchowska M, Laskowska-Klita T (2013) Bone turnover markers, osteoprotegerin and RANKL cytokines in children with cystic fibrosis. *Adv Med Sci* 58:338–343
22. Sermet-Gaudelus I, Bianchi ML, Garabedian M, Aris RM, Morton A, Hardin DS, Elkin SL, Compston JE, Conway SP, Castanet M, Wolfe S, Haworth CS (2011) European cystic fibrosis bone mineralisation guidelines. *J Cyst Fibros* 10(Suppl 2):S16–23
23. Legroux-Gerot I, Leroy S, Prudhomme C, Perez T, Flipo RM, Wallaert B, Cortet B (2011) Bone loss in adults with cystic fibrosis: prevalence, associated factors, and usefulness of biological markers. *Joint Bone Spine* 79:73–77
24. Rossini M, Del Marco A, Dal Santo F, Gatti D, Braggion C, James G, Adami S (2004) Prevalence and correlates of vertebral fractures in adults with cystic fibrosis. *Bone* 35:771–776
25. Tejero Garcia S, Giraldez Sanchez MA, Cejudo P, Quintana Gallego E, Dapena J, Garcia Jimenez R, Cano Luis P, Gomez de Terreros I (2011) Bone health, daily physical activity, and exercise tolerance in patients with cystic fibrosis. *Chest* 140:475–481
26. Hernandez CJ, Keaveny TM (2006) A biomechanical perspective on bone quality. *Bone* 39:1173–1181
27. Gore AP, Kwon SH, Stenbit AE (2010) A roadmap to the brittle bones of cystic fibrosis. *J Osteoporos* 2011:926045
28. Haworth CS (2010) Impact of cystic fibrosis on bone health. *Curr Opin Pulm Med* 16:616–622
29. Elkin SL, Fairney A, Burnett S, Kemp M, Kyd P, Burgess J, Compston JE, Hodson ME (2001) Vertebral deformities and low bone mineral density in adults with cystic fibrosis: a cross-sectional study. *Osteoporos Int* 12:366–372
30. Shead EF, Haworth CS, Gunn E, Bilton D, Scott MA, Compston JE (2006) Osteoclastogenesis during infective exacerbations in patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 174: 306–311
31. Alicandro G, Bisogno A, Battezzati A, Bianchi ML, Corti F, Colombo C (2014) Recurrent pulmonary exacerbations are associated with low fat free mass and low bone mineral density in young adults with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 13:328–334
32. Velard F, Delion M, Le Henaff C, Guillaume C, Gangloff S, Jacquot J, Tabary O, Touqui L, Barthes F, Sermet-Gaudelus I (2014) Cystic fibrosis and bone disease: defective osteoblast maturation with the F508del mutation in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Am J Respir Crit Care Med* 189: 746–748
33. Boyle MP (2006) Update on maintaining bone health in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med* 12:453–458
34. King SJ, Topliss DJ, Kotsimbos T, Nyulasi IB, Bailey M, Ebeling PR, Wilson JW (2005) Reduced bone density in cystic fibrosis: DeltaF508 mutation is an independent risk factor. *Eur Respir J* 25: 54–61
35. Scheid P, Kempster L, Griesenbach U, Davies JC, Dewar A, Weber PP, Colledge WH, Evans MJ, Geddes DM, Alton EW (2001) Inflammation in cystic fibrosis airways: relationship to increased bacterial adherence. *Eur Respir J* 17:27–35
36. Elkin SL, Vedi S, Bord S, Garrahan NJ, Hodson ME, Compston JE (2002) Histomorphometric analysis of bone biopsies from the iliac crest of adults with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 166:1470–1474
37. Putman MS, Milliren CE, Derrico N, Uluer A, Sicilian L, Lapey A, Sawicki G, Gordon CM, Bouxsein ML, Finkelstein JS (2014) Compromised bone microarchitecture and estimated bone strength in young adults with cystic fibrosis. *J Clin Endocrinol Metab* 99: 3399–3407
38. Le Henaff C, Hay E, Velard F, Marty C, Tabary O, Marie PJ, Jacquot JP (2014) Enhanced F508del-CFTR channel activity ameliorates bone pathology in murine cystic fibrosis. *Am J Pathol* 184: 1132–1141
39. Stalvey MS, Clines KL, Havasi V, McKibbin CR, Dunn LK, Chung WJ, Clines GA (2013) Osteoblast CFTR inactivation reduces differentiation and osteoprotegerin expression in a mouse model of cystic fibrosis-related bone disease. *PLoS One* 8:e80098
40. Bonora M, Riffault L, Marie S, Mall M, Clement A, Tabary O (2011) Morphological analysis of the trachea and pattern of breathing in betaENaC-Tg mice. *Respir Physiol Neurobiol* 178: 346–348
41. Bonvin E, Le Rouzic P, Bernaudin JF, Cottart CH, Vandebrouck C, Crie A, Leal T, Clement A, Bonora M (2008) Congenital tracheal malformation in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-deficient mice. *J Physiol* 586:3231–3243
42. Meyerholz DK, Stoltz DA, Namati E, Ramachandran S, Pezzulo AA, Smith AR, Rector MV, Suter MJ, Kao S, McLennan G, Tearney GJ, Zabner J, McCray PB Jr, Welsh MJ (2010) Loss of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function produces abnormalities in tracheal development in neonatal pigs and young children. *Am J Respir Crit Care Med* 182:1251–1261
43. Adam RJ, Michalski AS, Bauer C, Abou Alaiwa MH, Gross TJ, Awadalla MS, Bouzek DC, Gansemer ND, Taft PJ, Hoegger MJ, Diwakar A, Ochs M, Reinhardt JM, Hoffman EA, Beichel RR, Meyerholz DK, Stoltz DA (2013) Air trapping and airflow obstruction in newborn cystic fibrosis piglets. *Am J Respir Crit Care Med* 188:1434–1441
44. Davies JC, Wainwright CE, Canny GJ, Chilvers MA, Howenstine MS, Munck A, Mainz JG, Rodriguez S, Li H, Yen K, Ordonez CL, Ahrens R (2013) Efficacy and safety of ivacaftor in patients aged 6 to 11 years with cystic fibrosis with a G551D mutation. *Am J Respir Crit Care Med* 187:1219–1225
45. Wainwright CE, Elborn JS, Ramsey BW, Marigowda G, Huang X, Cipolli M, Colombo C, Davies JC, De Boeck K, Flume PA,

- Konstan MW, McColley SA, McCoy K, McKone EF, Munck A, Ratjen F, Rowe SM, Waltz D, Boyle MP (2015) Lumacaftor-ivacaftor in patients with cystic fibrosis homozygous for Phe508del CFTR. *N Engl J Med*
46. Baroncelli GI, De Luca F, Magazzu G, Arrigo T, Sferlazza C, Catena C, Bertelloni S, Saggese G (1997) Bone demineralization in cystic fibrosis: evidence of imbalance between bone formation and degradation. *Pediatr Res* 41:397–403
 47. Nicolaidou P, Stavrinadis I, Loukou I, Papadopoulou A, Georgouli H, Douros K, Priftis KN, Gourgiotis D, Matsinos YG, Doudounakis S (2006) The effect of vitamin K supplementation on biochemical markers of bone formation in children and adolescents with cystic fibrosis. *Eur J Pediatr* 165:540–545
 48. Cohen-Cymbberknoh M, Shoseyov D, Kerem E (2011) Managing cystic fibrosis: strategies that increase life expectancy and improve quality of life. *Am J Respir Crit Care Med* 183:1463–1471
 49. Sermet-Gaudelus I, Castanet M, Retsch-Bogart G, Aris RM (2009) Update on cystic fibrosis-related bone disease: a special focus on children. *Paediatr Respir Rev* 10:134–142
 50. Putman MS, Baker JF, Uluer A, Herlyn K, Lapey A, Sicilian L, Tillotson AP, Gordon CM, Merkel PA, Finkelstein JS (2015) Trends in bone mineral density in young adults with cystic fibrosis over a 15-year period. *J Cyst Fibros*
 51. Giustina A, Mazziotti G, Canalis E (2008) Growth hormone, insulin-like growth factors, and the skeleton. *Endocr Rev* 29:535–559
 52. Baron R, Kneissel M (2013) WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat Med* 19: 179–192
 53. Festini F, Taccetti G, Repetto T, Reali MF, Campana S, Mergni G, Marianelli L, de Martino M (2005) Gestational and neonatal characteristics of children with cystic fibrosis: a cohort study. *J Pediatr* 147:316–320
 54. Switzer M, Rice J, Rice M, Hardin DS (2009) Insulin-like growth factor-I levels predict weight, height and protein catabolism in children and adolescents with cystic fibrosis. *J Pediatr Endocrinol Metab* 22:417–424
 55. Rogan MP, Reznikov LR, Pezzulo AA, Gansemer ND, Samuel M, Prather RS, Zabner J, Fredericks DC, McCray PB Jr, Welsh MJ, Stoltz DA (2010) Pigs and humans with cystic fibrosis have reduced insulin-like growth factor I (IGF1) levels at birth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:20571–20575
 56. Haworth CS, Freemont AJ, Webb AK, Dodd ME, Selby PL, Mawer EB, Adams JE (1999) Hip fracture and bone histomorphometry in a young adult with cystic fibrosis. *Eur Respir J* 14:478–479
 57. Imai Y, Kondoh S, Kouzmenko A, Kato S (2011) Minireview: osteoprotective action of estrogens is mediated by osteoclastic estrogen receptor- α . *Mol Endocrinol* 24:877–885
 58. Chen H, Guo JH, Lu YC, Ding GL, Yu MK, Tsang LL, Fok KL, Liu XM, Zhang XH, Chung YW, Huang P, Huang H, Chan HC (2012) Impaired CFTR-dependent amplification of FSH-stimulated estrogen production in cystic fibrosis and PCOS. *J Clin Endocrinol Metab* 97:923–932
 59. Gimenez A, Le Henaff C, Norez C, Guillaume C, Ravoninjatovo B, Laurent-Maquin D, Becq F, Jacquot J (2012) Deficit of osteoprotegerin release by osteoblasts from a patient with cystic fibrosis. *Eur Respir J* 39:780–781
 60. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ (1997) Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89:309–319
 61. Pashuck TD, Franz SE, Altman MK, Wasserfall CH, Atkinson MA, Wronski TJ, Flotte TR, Stalvey MS (2009) Murine model for cystic fibrosis bone disease demonstrates osteopenia and sex-related differences in bone formation. *Pediatr Res* 65:311–316
 62. Snouwaert JN, Brigman KK, Latour AM, Malouf NN, Boucher RC, Smithies O, Koller BH (1992) An animal model for cystic fibrosis made by gene targeting. *Science* 257:1083–1088
 63. Dif F, Marty C, Baudoin C, de Vernejoul MC, Levi G (2004) Severe osteopenia in CFTR-null mice. *Bone* 35:595–603
 64. Haston CK, Li W, Li A, Lafleur M, Henderson JE (2008) Persistent osteopenia in adult cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-deficient mice. *Am J Respir Crit Care Med* 177:309–315
 65. Le Henaff C, Gimenez A, Hay E, Marty C, Marie P, Jacquot J (2012) The F508del mutation in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene impacts bone formation. *Am J Pathol* 180:2068–2075
 66. Pastores GM, Elstein D, Hrebicek M, Zimran A (2007) Effect of miglustat on bone disease in adults with type 1 Gaucher disease: a pooled analysis of three multinational, open-label studies. *Clin Ther* 29:1645–1654
 67. Venier RE, Igdoura SA (2012) Miglustat as a therapeutic agent: prospects and caveats. *J Med Genet* 49:591–597
 68. Galanaud D, Tourbah A, Lehericy S, Leveque N, Heron B, Bilette de Villemeur T, Guffon N, Feillet F, Baumann N, Vanier MT, Sedel F (2009) 24 month-treatment with miglustat of three patients with Niemann-Pick disease type C: follow up using brain spectroscopy. *Mol Genet Metab* 96:55–58
 69. Goessling W, North TE, Loewer S, Lord AM, Lee S, Stoick-Cooper CL, Weidinger G, Puder M, Daley GQ, Moon RT, Zon LI (2009) Genetic interaction of PGE2 and Wnt signaling regulates developmental specification of stem cells and regeneration. *Cell* 136:1136–1147
 70. Napimoga MH, Demasi AP, Bossonaro JP, de Araujo VC, Clemente-Napimoga JT, Martinez EF (2013) Low doses of 15d-PGJ2 induce osteoblast activity in a PPAR- γ independent manner. *Int Immunopharmacol* 16:131–138
 71. Blackwell KA, Raisz LG, Pilbeam CC (2010) Prostaglandins in bone: bad cop, good cop? *Trends Endocrinol Metab* 21: 294–301
 72. Xie C, Liang B, Xue M, Lin AS, Loisele A, Schwarz EM, Guldberg RE, O'Keefe RJ, Zhang X (2009) Rescue of impaired fracture healing in COX-2 $^{-/-}$ mice via activation of prostaglandin E2 receptor subtype 4. *Am J Pathol* 175:772–785
 73. Baudouin-Legros M, Colas J, Moriceau S, Kelly M, Planelles G, Edelman A, Ollero M (2012) Long-term CFTR inhibition modulates 15d-prostaglandin J2 in human pulmonary cells. *Int J Biochem Cell Biol* 44:1009–1018
 74. Walker NM, Badri LN, Wadhwa A, Wettlaufer S, Peters-Golden M, Lama VN (2012) Prostaglandin E2 as an inhibitory modulator of fibrogenesis in human lung allografts. *Am J Respir Crit Care Med* 185:77–84
 75. Nemeth K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Mayer B, Pamelee A, Doi K, Robey PG, Leelahavanichkul K, Koller BH, Brown JM, Hu X, Jelinek I, Star RA, Mezey E (2009) Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med* 15:42–49
 76. Diamond JM, Akimova T, Kazi A, Shah RJ, Cantu E, Feng R, Levine MH, Kawut SM, Meyer NJ, Lee JC, Hancock WW, Aplenc R, Ware LB, Palmer SM, Borhade S, Lama VN, Weinacker A, Orens J, Wille K, Crespo M, Lederer DJ, Arcasoy S, Demissie E, Christie JD (2014) Genetic variation in the prostaglandin E2 pathway is associated with primary graft dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med* 189:567–575

77. Maier NK, Leppla SH, Moayeri M (2015) The cyclopentenone prostaglandin 15d-PGJ2 inhibits the NLRP1 and NLRP3 inflammasomes. *J Immunol* 194:2776–2785
78. Straus DS, Pascual G, Li M, Welch JS, Ricote M, Hsiang CH, Sengchanthalangsy LL, Ghosh G, Glass CK (2000) 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:4844–4849
79. Surh YJ, Na HK, Park JM, Lee HN, Kim W, Yoon IS, Kim DD (2011) 15-Deoxy-delta(1)(2), (1)(4)-prostaglandin J(2), an electrophilic lipid mediator of anti-inflammatory and pro-resolving signaling. *Biochem Pharmacol* 82:1335–1351
80. Kim KR, Kim HJ, Lee SK, Ma GT, Park KK, Chung WY (2015) 15-Deoxy-delta(12,14)-prostaglandin j2 inhibits osteolytic breast cancer bone metastasis and estrogen deficiency-induced bone loss. *PLoS One* 10:e0122764
81. During A, Penel G, Hardouin P (2015) Understanding the local actions of lipids in bone physiology. *Prog Lipid Res*
82. Teichgraber V, Ulrich M, Endlich N, Riethmuller J, Wilker B, De Oliveira-Munding CC, van Heeckeren AM, Barr ML, von Kurthy G, Schmid KW, Weller M, Tummler B, Lang F, Grassme H, Doring G, Gulbins E (2008) Ceramide accumulation mediates inflammation, cell death and infection susceptibility in cystic fibrosis. *Nat Med* 14:382–391
83. Strandvik B (2010) Fatty acid metabolism in cystic fibrosis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 83:121–129
84. Worgall TS, Veerappan A, Sung B, Kim BI, Weiner E, Bholah R, Silver RB, Jiang XC, Worgall S (2011) Impaired sphingolipid synthesis in the respiratory tract induces airway hyperreactivity. *Sci Transl Med* 5:186ra167
85. Xu Y, Krause A, Limberis M, Worgall TS, Worgall S (2011) Low sphingosine-1-phosphate impairs lung dendritic cells in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 48:250–257
86. Spiegel S, Milstien S (2003) Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:397–407
87. Petrie Aronin CE, Shin SJ, Naden KB, Rios PD Jr, Sefcik LS, Zawodny SR, Bagayoko ND, Cui Q, Khan Y, Botchwey EA (2010) The enhancement of bone allograft incorporation by the local delivery of the sphingosine 1-phosphate receptor targeted drug FTY720. *Biomaterials* 31:6417–6424
88. Ahn SH, Koh JM, Gong EJ, Byun S, Lee SY, Kim BJ, Lee SH, Chang JS, Kim GS (2013) Association of bone marrow sphingosine 1-phosphate levels with osteoporotic hip fractures. *J Bone Metab* 20:61–65
89. Kim BJ, Koh JM, Lee SY, Lee YS, Lee SH, Lim KH, Cho EH, Kim SW, Kim TH, Kim SY, Kim GS (2012) Plasma sphingosine 1-phosphate levels and the risk of vertebral fracture in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 97:3807–3814
90. Matsuzaki E, Hiratsuka S, Hamachi T, Takahashi-Yanaga F, Hashimoto Y, Higashi K, Kobayashi M, Hirofujii T, Hirata M, Maeda K (2013) Sphingosine-1-phosphate promotes the nuclear translocation of beta-catenin and thereby induces osteoprotegerin gene expression in osteoblast-like cell lines. *Bone* 55:315–324
91. Malik FA, Meissner A, Semenkov I, Molinski S, Pasyk S, Ahmadi S, Bui HH, Bear CE, Lidington D, Bolz SS (2015) Sphingosine-1-phosphate is a novel regulator of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) activity. *PLoS One* 10:e0130313
92. Meissner A, Yang J, Kroetsch JT, Sauve M, Dax H, Momen A, Noyan-Ashraf MH, Heximer S, Husain M, Lidington D, Bolz SS (2012) Tumor necrosis factor-alpha-mediated downregulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator drives pathological sphingosine-1-phosphate signaling in a mouse model of heart failure. *Circulation* 125:2739–2750
93. Lotinun S, Kiviranta R, Matsubara T, Alzate JA, Neff L, Luth A, Koskivirta I, Kleuser B, Vacher J, Vuorio E, Home WC, Baron R (2013) Osteoclast-specific cathepsin K deletion stimulates S1P-dependent bone formation. *J Clin Invest* 123:666–681
94. Zhang JN, Zhao Y, Liu C, Han ES, Yu X, Lidington D, Bolz SS, You L (2015) The role of the sphingosine-1-phosphate signaling pathway in osteocyte mechanotransduction. *Bone* 79:71–78
95. Ferron M, Lacombe J (2014) Regulation of energy metabolism by the skeleton: osteocalcin and beyond. *Arch Biochem Biophys* 561:137–146
96. Karsenty G, Oury F (2013) Regulation of male fertility by the bone-derived hormone osteocalcin. *Mol Cell Endocrinol* 382:521–526
97. Oury F, Ferron M, Huizhen W, Confavreux C, Xu L, Lacombe J, Srinivas P, Chamouni A, Lugani F, Lejeune H, Kumar TR, Plotton I, Karsenty G (2013) Osteocalcin regulates murine and human fertility through a pancreas-bone-testis axis. *J Clin Invest* 123:2421–2433
98. Karsenty G, Ferron M (2012) The contribution of bone to whole-organism physiology. *Nature* 481:314–320
99. Lee NJ, Nguyen AD, Enriquez RF, Luzuriaga J, Bensellam M, Laybutt R, Baldock PA, Herzog H (2015) NPY signalling in early osteoblasts controls glucose homeostasis. *Mol Metab* 4:164–174
100. Ferron M, Hinoi E, Karsenty G, Ducy P (2008) Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:5266–5270
101. Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, Dacquin R, Mee PJ, McKee MD, Jung DY, Zhang Z, Kim JK, Mauvais-Jarvis F, Ducy P, Karsenty G (2007) Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* 130:456–469
102. Rodriguez-Carballo E, Gamez B, Mendez-Lucas A, Sanchez-Freutrie M, Zorzano A, Bartrons R, Alcantara S, Perales JC, Ventura F (2015) p38alpha function in osteoblasts influences adipose tissue homeostasis. *Faseb J* 29:1414–1425
103. Wei J, Ferron M, Clarke CJ, Hannun YA, Jiang H, Blaner WS, Karsenty G (2014) Bone-specific insulin resistance disrupts whole-body glucose homeostasis via decreased osteocalcin activation. *J Clin Invest* 124:1–13
104. Price PA, Otsuka AA, Poser JW, Kristaponis J, Raman N (1976) Characterization of a gamma-carboxyglutamic acid-containing protein from bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73:1447–1451
105. Lombardi G, Perego S, Luzi L, Banfi G (2014) A four-season molecule: osteocalcin. Updates in its physiological roles. *Endocrine* 48:394–404
106. Wei J, Karsenty G (2015) An overview of the metabolic functions of osteocalcin. *Curr Osteoporos Rep* 13:180–185
107. Confavreux CB, Borel O, Lee F, Vaz G, Guyard M, Fadat C, Carlier MC, Chapurlat R, Karsenty G (2012) Osteoid osteoma is an osteocalcinoma affecting glucose metabolism. *Osteoporos Int* 23:1645–1650
108. Yeap BB, Alfonso H, Chubb SA, Gauci R, Byrnes E, Beilby JP, Ebeling PR, Handelsman DJ, Allan CA, Grossmann M, Norman PE, Flicker L (2015) Higher serum undercarboxylated osteocalcin and other bone turnover markers are associated with reduced diabetes risk and lower estradiol concentrations in older men. *J Clin Endocrinol Metab* 100:63–71
109. Rana M, Munns CF, Selvadurai H, Briody J, Craig ME (2013) The impact of dysglycaemia on bone mineral accrual in young people with cystic fibrosis. *Clin Endocrinol (Oxf)* 78:36–42
110. Gounarides JS, Korach-Andre M, Killary K, Argentieri G, Turner O, Laurent D (2008) Effect of dexamethasone on glucose tolerance and fat metabolism in a diet-induced obesity mouse model. *Endocrinology* 149:758–766
111. Weinstein RS (2011) Clinical practice. Glucocorticoid-induced bone disease. *N Engl J Med* 365:62–70
112. Prummel MF, Wiersinga WM, Lips P, Sanders GT, Sauerwein HP (1991) The course of biochemical parameters of bone turnover

- during treatment with corticosteroids. *J Clin Endocrinol Metab* 72: 382–386
113. Brennan-Speranza TC, Henneicke H, Gasparini SJ, Blankenstein KI, Heinevetter U, Cogger VC, Svistounov D, Zhang Y, Cooney GJ, Buttgerit F, Dunstan CR, Gundberg C, Zhou H, Seibel MJ (2012) Osteoblasts mediate the adverse effects of glucocorticoids on fuel metabolism. *J Clin Invest* 122:4172–4189
 114. Clowes JA, Riggs BL, Khosla S (2005) The role of the immune system in the pathophysiology of osteoporosis. *Immunol Rev* 208: 207–227
 115. Hamilton EJ, Rakic V, Davis WA, Chubb SA, Kamber N, Prince RL, Davis TM (2009) Prevalence and predictors of osteopenia and osteoporosis in adults with type 1 diabetes. *Diabet Med* 26:45–52
 116. Ziai S, Coriati A, Gauthier MS, Rabasa-Lhoret R, Richter MV (2014) Could T cells be involved in lung deterioration and hyperglycemia in cystic fibrosis? *Diabetes Res Clin Pract* 105:22–29
 117. Mueller C, Braag SA, Keeler A, Hodges C, Drumm M, Flotte TR (2011) Lack of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in CD3+ lymphocytes leads to aberrant cytokine secretion and hyperinflammatory adaptive immune responses. *Am J Respir Cell Mol Biol* 44:922–929
 118. Bruscia EM, Zhang PX, Satoh A, Caputo C, Medzhitov R, Shenoy A, Egan ME, Krause DS (2009) Abnormal trafficking and degradation of TLR4 underlie the elevated inflammatory response in cystic fibrosis. *J Immunol* 186:6990–6998
 119. Xu Y, Tertilt C, Krause A, Quadri LE, Crystal RG, Worgall S (2009) Influence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator on expression of lipid metabolism-related genes in dendritic cells. *Respir Res* 10:26
 120. Tesmer LA, Lundy SK, Sarkar S, Fox DA (2008) Th17 cells in human disease. *Immunol Rev* 223:87–113
 121. Tan HL, Regamey N, Brown S, Bush A, Lloyd CM, Davies JC (2011) The Th17 pathway in cystic fibrosis lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 184:252–258
 122. Tiringier K, Treis A, Fucik P, Gona M, Gruber S, Renner S, Dehlink E, Nachbaur E, Horak F, Jaksch P, Doring G, Cramer R, Jung A, Rochat MK, Hormann M, Spittler A, Klepetko W, Akdis CA, Szepefalusi Z, Frischer T, Eiwegger T (2013) A Th17- and Th2-skewed cytokine profile in cystic fibrosis lungs represents a potential risk factor for *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Am J Respir Crit Care Med* 187:621–629
 123. Yuan FL, Li X, Lu WG, Zhao YQ, Li CW, Li JP, Sun JM, Xu RS (2012) Type 17 T-helper cells might be a promising therapeutic target for osteoporosis. *Mol Biol Rep* 39:771–774
 124. Tyagi AM, Srivastava K, Mansoori MN, Trivedi R, Chattopadhyay N, Singh D (2012) Estrogen deficiency induces the differentiation of IL-17 secreting Th17 cells: a new candidate in the pathogenesis of osteoporosis. *PLoS One* 7:e44552
 125. Haworth CS, Selby PL, Webb AK, Martin L, Elborn JS, Sharples LD, Adams JE (2004) Inflammatory related changes in bone mineral content in adults with cystic fibrosis. *Thorax* 59:613–617
 126. Shead EF, Haworth CS, Barker H, Bilton D, Compston JE (2010) Osteoclast function, bone turnover and inflammatory cytokines during infective exacerbations of cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 9: 93–98
 127. Shmarina G, Pukhalsky A, Petrova N, Zakharova E, Avakian L, Kapranov N, Alioshkin V (2013) TNF gene polymorphisms in cystic fibrosis patients: contribution to the disease progression. *J Transl Med* 11:19
 128. Li Y, Li A, Strait K, Zhang H, Nanes MS, Weitzmann MN (2007) Endogenous TNF α lowers maximum peak bone mass and inhibits osteoblastic Smad activation through NF- κ B. *J Bone Miner Res* 22:646–655
 129. Ferguson JH, Chang AB (2012) Vitamin D supplementation for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev* 4:CD007298
 130. Bianchi ML, Colombo C, Assael BM, Dubini A, Lombardo M, Quattrucci S, Bella S, Collura M, Messori B, Raia V, Poli F, Bini R, Albanese CV, De Rose V, Costantini D, Romano G, Pustorino E, Magazzu G, Bertasi S, Lucidi V, Traverso G, Coruzzo A, Grzejdziak AD (2013) Treatment of low bone density in young people with cystic fibrosis: a multicentre, prospective, open-label observational study of calcium and calcifediol followed by a randomised placebo-controlled trial of alendronate. *Lancet Respir Med* 1:377–385
 131. Hirao M, Hashimoto J, Ando W, Ono T, Yoshikawa H (2008) Response of serum carboxylated and undercarboxylated osteocalcin to alendronate monotherapy and combined therapy with vitamin K2 in postmenopausal women. *J Bone Miner Metab* 26:260–264
 132. Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, Prince R, Gaich GA, Reginster JY, Hodsman AB, Eriksen EF, Ish-Shalom S, Genant HK, Wang O, Mitlak BH (2001) Effect of parathyroid hormone (1–34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* 344:1434–1441
 133. Body JJ, Gaich GA, Scheele WH, Kulkarni PM, Miller PD, Peretz A, Dore RK, Correa-Rotter R, Papaioannou A, Cumming DC, Hodsman AB (2002) A randomized double-blind trial to compare the efficacy of teriparatide [recombinant human parathyroid hormone (1–34)] with alendronate in postmenopausal women with osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 87:4528–4535
 134. Siwamogsatham O, Stephens K, Tangpricha V (2014) Evaluation of teriparatide for treatment of osteoporosis in four patients with cystic fibrosis: a case series. *Case Rep Endocrinol* 2014:893589
 135. Ikpa PT, Bijvelds MJ, de Jonge HR (2014) Cystic fibrosis: toward personalized therapies. *Int J Biochem Cell Biol* 52:192–200
 136. Bell SC, De Boeck K, Amaral MD (2014) New pharmacological approaches for cystic fibrosis: promises, progress, pitfalls. *Pharmacol Ther* 145:19–34
 137. Clancy JP, Jain M (2012) Personalized medicine in cystic fibrosis: dawning of a new era. *Am J Respir Crit Care Med* 186:593–597
 138. Birault V, Solari R, Hanrahan J, Thomas DY (2013) Correctors of the basic trafficking defect of the mutant F508del-CFTR that causes cystic fibrosis. *Curr Opin Chem Biol* 17:353–360
 139. Van Goor F, Hadida S, Grootenhuus PD, Burton B, Stack JH, Straley KS, Decker CJ, Miller M, McCartney J, Olson ER, Wine JJ, Frizzell RA, Ashlock M, Negulescu PA (2011) Correction of the F508del-CFTR protein processing defect in vitro by the investigational drug VX-809. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:18843–18848
 140. Molinski S, Eckford PD, Pasyk S, Ahmadi S, Chin S, Bear CE (2012) Functional rescue of F508del-CFTR using small molecule correctors. *Front Pharmacol* 3:160
 141. Eckford PD, Ramjeesingh M, Molinski S, Pasyk S, Dekkers JF, Li C, Ahmadi S, Ip W, Chung TE, Du K, Yeger H, Beekman J, Gonska T, Bear CE (2014) VX-809 and related corrector compounds exhibit secondary activity stabilizing active F508del-CFTR after its partial rescue to the cell surface. *Chem Biol*
 142. He L, Kota P, Aleksandrov AA, Cui L, Jensen T, Dokholyan NV, Riordan JR (2013) Correctors of DeltaF508 CFTR restore global conformational maturation without thermally stabilizing the mutant protein. *Faseb J* 27:536–545
 143. Velard F, Delion M, Lemaire F, Tabary O, Guillaume C, Le Pimpec Barthes F, Touqui L, Gangloff S, Sernet-Gaudelus I, Jacquot J (2015) Cystic fibrosis bone disease: is the CFTR corrector C18 an option for therapy? *Eur Respir J* 45:845–848
 144. Ramsey BW, Davies J, McElvaney NG, Tullis E, Bell SC, Drevinek P, Griese M, McKone EF, Wainwright CE, Konstan MW, Moss R, Ratjen F, Sernet-Gaudelus I, Rowe SM, Dong Q, Rodriguez S, Yen K, Ordonez C, Elborn JS (2011) A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation. *N Engl J Med* 365:1663–1672

Annexe 2

Bone demineralization is improved by ivacaftor in patients with cystic fibrosis carrying the p.Gly551Asp mutation

Isabelle Sermet-Gaudelus¹, **Martial Delion**², **Isabelle Durieu**³, **Jacky Jacquot**², **Dominique Hubert**⁴

¹ INSERM U1151, Service de Pneumo-Pédiatrie, Hopital Necker, Université Paris Sorbonne, Paris. France

² EA 4691, Biomatériaux et Inflammation en site osseux, BIOS, Université Reims Champagne Ardenne, France

³ Service de Médecine Interne, Centre Hospitalier Lyon-Sud. Lyon. Université Lyon 1. France

⁴ Service de Pneumologie. Hôpital Cochin, Université Paris Sorbonne, Paris. France

Abstract

Low bone mineral density (BMD) is a common problem in adults with Cystic Fibrosis (CF), the etiology of which is multifactorial. In this study, we provide the first evidence that ivacaftor improves BMD in CF patients carrying the p.Gly551Asp mutation. Consistently, *in vitro* experiments with TNF- α -stimulated primary F508del-CFTR osteoblasts demonstrated that correction of p.Phe508del-CFTR markedly decreased RANKL protein production, a major factor of bone resorption. These clinical and fundamental observations suggest that rescue of mutated CFTR protein improves bone remodeling and support the link between CFTR and bone cell physiology. These findings represent a step forward in the development of potential new therapies for CF-related bone disease.

Keywords: Cystic fibrosis; bone density; CFTR corrector; RANKL

1. Introduction

Ivacaftor strongly improves respiratory function and nutritional status in patients with cystic fibrosis (CF) carrying gating the p.Gly551Asp gene mutation [1]. This beneficial effect is due to functional restoration of the CFTR protein as assessed by the correction of CFTR dependant defective chloride transport in sweat glands and nasal epithelium after treatment of patients with ivacaftor [2]. Low bone mineral density (BMD) is a common problem in adults with CF, the etiology of which is probably multifactorial [3]. Emerging data suggest a direct role of CFTR in bone formation [4,5]. We reviewed retrospectively BMD of the lumbar spine in patients treated with ivacaftor to investigate the impact on bone mineralization. Moreover, to link molecular CFTR functional restoration to bone cell physiology, we studied whether CFTR correction in human primary CF osteoblasts modified the production of the receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL), a major factor involved in the bone resorption.

2. Methods

BMD measurements

Change in BMD was assessed before and after at least 1 year of treatment with ivacaftor by Dual energy X-ray absorptiometry (DXA) at the L2-L4 lumbar spine (LS), and expressed as a LS Z-score according to local normative data.

Osteoblast primary cultures

We used a model of primary human osteoblast culture previously established in our laboratory from rib bone fragments obtained from CF patients undergoing lung transplants (Professor F Barthes, Hôpital Européen Georges Pompidou). Bone samples were obtained after patient informed consent. Primary human osteoblasts derived from 14 days-confluent culture were validated according to the main specific markers of osteoblastic phenotype as previously reported [6]. Levels of RANKL production were assessed in cell lysates using DuoSet® ELISA kits (R&D systems, Lille, France) according to the manufacturer's instructions. They were assessed at basal state or after 24 h incubation with tumour necrosis factor alpha (TNF- α) 20 ng/ml, in the presence or absence of 20 μ M C18 for 24 hours. C18 is a chemical analog of the CFTR corrector VX-809, also known as VRT-534. All the results were normalized to the amount of total protein content by using the BCA kit (Pierce BCA Protein Assay Kit - Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France).

3. Results

Patients

Seven patients, all pancreatic insufficient, with a median age of 37 years (26-52 years) had been treated for 1 to 3 years with ivacaftor. One patient was p.Gly551Asp homozygous and the 6 others were p.Gly551Asp compound heterozygotes either with p.Phe508del (n=3), or p.Ser492Phe, p.Arg347His and p.Asp1152His respectively. Those patients displayed different status of disease severity as assessed by the Forced Expiratory Volume in one second (FEV₁), ranging from 20 to 93% predicted (**Table 1**). All the patients had a normal 25(OH) vitamin D level.

Bone mineralization

Results are shown in **Table 1**. LS Z-score improved significantly by a mean of 0.9 (0.1-2.5) after a mean of 1.7 years-treatment (p=0.04; Wilcoxon Rank Test). None of the patients had been treated with biphosphonates or sex steroid hormone, nor experienced changes in vitamin D supplementation. There was no correlation between bone mineralization improvement and genotype (i.e the patient homozygous for p.Gly551Asp did not improve better). As expected, treatment with ivacaftor led to significant nutritional and respiratory improvements. Increase in bone mineralization was not statistically related to changes in respiratory function, weight, antibiotic courses or 25(OH) vitamin D blood level.

Table 1

| | Pre-ivacaftor | Post-ivacaftor* | p** |
|------------------------------|---------------|-----------------|------|
| LS Z-score | -1.1(0.7) | -0.4(0.3) | 0.04 |
| FEV1% predicted | 48(9) | 59(9) | 0.02 |
| Weight (Kg) | 60(2) | 64(4) | 0.04 |
| Number of antibiotic courses | 1.3(0.4) | 1(0.6) | 0.4 |
| 25(OH)vit D level (mmol/l) | 62(10) | 71(8) | 0.6 |

* last evaluation available

** Wilcoxon test

Primary osteoblasts

We investigated primary osteoblasts from 5 p.Phe508del homozygous patients [median age 18 (range 13-37) years]. We assessed the RANKL production in TNF- α stimulated osteoblasts treated for 24 h with 20 μ M C18 in comparison to non-treated cells (**Figure 1**). TNF- α stimulation significantly increased RANKL production compared to non-stimulated osteoblasts. In the presence of the corrector C18, we observed a statistical significant decrease of RANKL production in both basal and TNF- α -stimulated conditions (p<0.008).

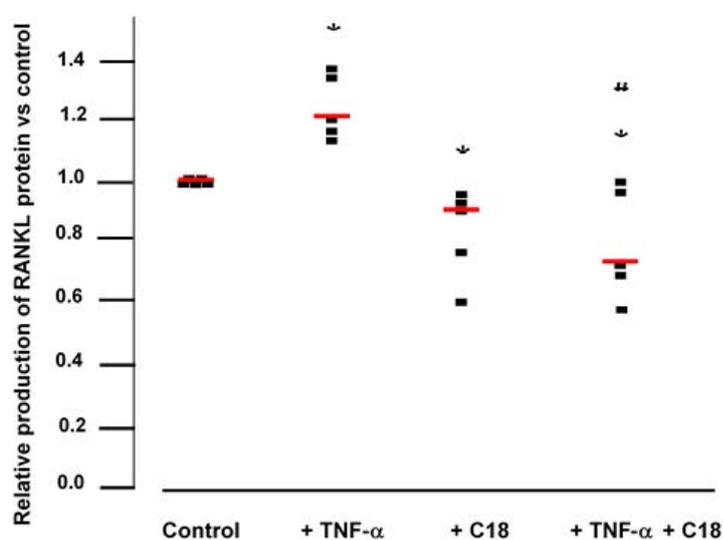
**Figure 1**

Figure 1

Relative production of receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) protein after 24 h treatment with 20 ng/ml TNF- α , in the presence or absence of 20 μ M C18 from 14 days-culture of confluent osteoblasts. Data were obtained from 5 CF patients homozygous for the p.Phe508del mutation. Each square represents one donor value; the red bar represents the median value. * p < 0.01 versus control, # p < 0.01 versus + TNF- α .

4. Discussion

Our findings provide the first evidence that ivacaftor improves CFTR related bone disease in patients with the p.Gly551Asp mutation and more generally that restoration of CFTR function can provide benefits in bone remodeling.

This improvement can be obviously partly related to the benefits observed in the nutrition and infection status of CF patients. However, although we can not exclude a defect in statistical power because of the small sample, the fact that the bone mineralization change was not related to BMI nor FEV₁ increase, suggests that improvement in BMD Z-Score may be linked to a direct effect of ivacaftor on CFTR activity in bone cells. This hypothesis is supported by the fact that such considerable improvement in bone mineralization has never been reported in CF after clinical improvement alone.

To investigate further this hypothesis, we assessed the effect of CFTR activity correction in human primary osteoblasts. We did not have any bone samples from patients carrying the p.Gly551Asp mutation (very few patients in France, and none recently transplanted), but were able to get bone samples from p.Phe508del patients.

Bone metabolism is tightly regulated by a number of growth factors, cytokines, prostaglandins and hormones which control both the bone formation and the résorption processes [5-9]. Among those, RANKL is one of the main inducer of osteoclast formation and activity and therefore regulates bone résorption.

Our *in vitro* experiments first show on the one hand an enhanced RANKL production in TNF- α -stimulated p.Phe508del osteoblasts and thus support a link between the high levels of pro-inflammatory cytokines produced during CF exacerbations and bone résorption. This was recently suggested by clinical data reporting high serum TNF- α production in patients with a decreased bone density [10]. Serum levels of RANKL were also found elevated in CF adults, and an increase of production of osteoclasts precursors in peripheral blood was found associated with a bone loss during pulmonary infections [8]. Very importantly, we show here that the CFTR corrector C18 significantly decreased the RANKL protein production, even under pro-inflammatory condition. This result confirms our previous observation that C18 reduces RANKL transcript level in resting CF osteoblasts [11].

Altogether, those results provide evidence for the first time for a physiopathological link between CFTR activity, defective osteoblast metabolism [12] and bone résorption activity in CF patients. We previously showed in the murine model that pharmacological correction of CFTR, as assessed by cAMP activated chloride conductance, led to improved bone formation rate, bone mass and microarchitecture in F508del mice, highlighting the interest of such a strategy to reduce bone loss in CF patients [13].

These clinical and fundamental observations suggest that rescue of mutated CFTR protein improves bone remodeling. These findings represent a step forward in the development of potential new therapies for CF-related bone disease.

Acknowledgments

This research was funded in part by research grants from French Cystic Fibrosis Association, Vaincre la Mucoviscidose (RF2015051235 to JJ), France. C18 was provided by Vertex Pharmaceuticals (Boston, MA, USA).

References

1. Ramsey BW, Davies J, McElvaney NG, Tullis E, Bell SC, Drevinek P, Griese M, McKone EF, Wainwright CE, Konstan MW, Moss R, Ratjen F, Sermet-Gaudelus I, Rowe SM, Dong Q, Rodriguez S, Yen K, Ordonez C, Elborn JS: A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation. *N Engl J Med* 2011;365:1663-1672.
2. Accurso FJ, Rowe SM, Clancy JP, Boyle MP, Dunitz JM, Durie PR, Sagel SD, Hornick DB, Konstan MW, Donaldson SH, Moss RB, Pilewski JM, Rubenstein RC, Uluer AZ, Aitken ML, Freedman SD, Rose LM, Mayer-Hamblett N, Dong Q, Zha J, Stone AJ, Olson ER, Ordonez CL, Campbell PW, Ashlock MA, Ramsey BW: Effect of VX-770 in persons with cystic fibrosis and the G551D-CFTR mutation. *N Engl J Med* 2010;363:1991-2003.
3. Sermet-Gaudelus I, Bianchi ML, Garabédian M, Aris RM, Morton A, Hardin DS, Elkin SL, Compston JE, Conway SP, Castanet M, Wolfe S, Haworth CS. European cystic fibrosis bone mineralisation guidelines. *J Cyst Fibros* 2011;10 Suppl 2:S16-23.
4. Le Henaff C, Mansouri R, Modrowski D, Zarka M, Geoffroy V, Marty C, Tarantino N, Laplantine E, Marie PJ: Increased NF-kappaB Activity and Decreased Wnt/beta-Catenin Signaling Mediate Reduced Osteoblast Differentiation and Function in DeltaF508 Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Mice. *J Biol Chem* 2015;290:18009-18017.
5. Jacquot J, Delion M, Gangloff S, Braux J, Velard F: Bone disease in cystic fibrosis: new pathogenic insights opening novel therapies. *Osteoporos Int* 2016;27:1401-1412.
6. Le Heron L, Guillaume C, Velard F, Braux J, Touqui L, Moriceau S, Sermet-Gaudelus I, Laurent-Maquin D, Jacquot J: Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) regulates the production of osteoprotegerin (OPG) and prostaglandin (PG) E(2) in human bone. *J Cyst Fibros* 2010;9:69-72.
7. Baron R, Kneissel M: WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat Med* 2013;19:179-192
8. Shead EF, Haworth CS, Barker H, Bilton D, Compston JE: Osteoclast function, bone turnover and inflammatory cytokines during infective exacerbations of cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2010;9:93-98.
9. Ambroszkiewicz J, Sands D, Gajewska J, Chelchowska M, Laskowska-Klita T: Bone turnover markers, osteoprotegerin and RANKL cytokines in children with cystic fibrosis. *Adv Med Sci* 2013;58:338-343.
10. Shmarina G, Pukhalsky A, Petrova N, Zakharova E, Avakian L, Kapranov N, Alioshkin V: TNF gene polymorphisms in cystic fibrosis patients: contribution to the disease progression. *J Transl Med* 2013;11:19.
11. Velard F, Delion M, Lemaire F, Tabary O, Guillaume C, Le Pimpec Barthes F, Touqui L, Gangloff S, Sermet-Gaudelus I, Jacquot J: Cystic fibrosis bone disease: is the CFTR corrector C18 an option for therapy? *Eur Respir J* 2015;45:845-848.
12. Velard F, Delion M, Le Henaff C, Guillaume C, Gangloff S, Jacquot J, Tabary O, Touqui L, Barthes F, Sermet-Gaudelus I: Cystic fibrosis and bone disease: defective osteoblast maturation with the F508del mutation in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Am J Respir Crit Care Med* 2014;189:746-748.
13. Le Henaff C, Hay E, Velard F, Marty C, Tabary O, Marie PJ, Jacquot JP: Enhanced F508del-CFTR channel activity ameliorates bone pathology in murine cystic fibrosis. *Am J Pathol* 2014;184:1132-1141.

CORRECTION DU DÉFICIT OSSEUX DANS LA MUCOVISCIDOSE

La maladie osseuse est une complication sévère pour les patients atteints de mucoviscidose (Cystic Fibrosis, CF). Les fractures vertébrales et costales impactent les capacités pulmonaires et la clairance du mucus bronchique. La meilleure prise en charge des symptômes des patients CF a permis l'amélioration de leurs qualité et espérance de vie. Cependant malgré l'optimisation de facteurs impactant le métabolisme osseux aucune amélioration notable n'a été observée dans la fragilité osseuse. Plus de 80% des patients CF sont porteurs de la mutation F508del du gène CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) sur au moins un allèle. L'implication directe de la mutation F508del dans la maladie osseuse a été montrée, bien que son rôle dans le dysfonctionnement du métabolisme osseux reste encore à élucider. Notre travail a permis de mettre en évidence que la mutation F508del portée par les ostéoblastes humains est responsable d'une dérégulation importante de la voie de signalisation RANK/RANKL/OPG aboutissant à un ratio RANKL/OPG élevé, potentiateur de l'ostéoclastogénèse et de la résorption osseuse. Nous avons également mis en évidence que le contexte inflammatoire chronique de la pathologie pourrait exacerber la perte osseuse, les cellules CF étant plus sensibles à ces stimulations. Par ailleurs, nous avons montré que l'utilisation de molécules pharmaceutiques comme des correcteurs et potentiateurs de CFTR, actuellement utilisés en essais cliniques, permettent une normalisation au moins partielle des dérégulations observées des ostéoblastes CF, et apparaissent comme des nouvelles stratégies thérapeutiques.

Ostéoblaste ; mucoviscidose ; RANKL/OPG ; correcteur de CFTR ; PGE2 ; F508del.

CORRECTION OF BONE LOSS IN CYSTIC FIBROSIS

Bone disease is a serious complication for patients with Cystic Fibrosis (CF). Rib and vertebral fractures worsen lung function and mucus clearance. Better care of CF patient's symptoms enable an improvement in life quality and expectancy. Despite optimization of factors impacting bone metabolism no improvement was observed in bone loss of patients with CF. More than 80% CF patients carried the F508del mutation on the CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) gene on at least one allele. The role of the F508del mutation in the dysfunction of bone metabolism is yet unclear, but its involvement has been already shown in clinical studies and mouse models. Our work shown that F508del mutation on human osteoblasts causes a dysregulation in the RANK/RANK-L/OPG signalling leading to a high RANK-L to OPG ratio that may improve osteoclastogenesis, and thus the bone resorption. We also show that chronic inflammatory status of CF patients could exacerbate bone loss because of a high sensitivity of osteoblasts with the F508del-CFTR mutation. In addition, we demonstrate that the use of drugs as CFTR correctors and potentiators cause an improvement of the dysregulation observed and seems to be a promising therapeutic strategy.

Osteoblast; Cystic Fibrosis; F508del; RANKL/OPG; CFTR correctors; PGE2.

Discipline : PHARMACIE

Spécialité : Biologie cellulaire

