



HAL
open science

Étude in vitro de la toxicité de l'uranium sur les cellules osseuses en vue de la recherche de nouveaux agents décorporants

Lucile Hurault

► To cite this version:

Lucile Hurault. Étude in vitro de la toxicité de l'uranium sur les cellules osseuses en vue de la recherche de nouveaux agents décorporants. Biologie moléculaire. COMUE Université Côte d'Azur (2015 - 2019), 2018. Français. NNT: 2018AZUR4106 . tel-02388506

HAL Id: tel-02388506

<https://theses.hal.science/tel-02388506>

Submitted on 2 Dec 2019

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 DE DOCTORAT

Etude *in vitro* de la toxicité de l'uranium
sur les cellules osseuses en vue de la
recherche de nouveaux agents
décorporants

Lucile HURALT

TIRO-MATOs UMR E4320

Présentée en vue de l'obtention

Du grade de docteur en Sciences de la vie
et de la Santé

Mention Interactions moléculaires et
cellulaires

De l'Université Côte d'Azur

Dirigée par : Dr. Georges Carle

Soutenue le : 30 Novembre 2018

Devant le jury, composé de :

Jaime Angulo Mora, Directeur de Recherche, CEA

Alain Cazoulat, Docteur, Service de Protection

Radiologique des Armées

Gaëlle Creff, Maître de conférences, UNS

Anny Cupo, Professeur, UNS

Jean Vacher, Professeur, Université de Montréal

Thèse de doctorat

Ecole doctorale Sciences de la Vie et de la Santé (ED85)

Présentée en vue de l'obtention
Du grade de docteur en Sciences de la Vie et de la Santé
Mention Interactions moléculaires et cellulaires
De l'Université Côte D'Azur

Par

Lucile HURAUULT

**Etude *in vitro* de la toxicité de l'uranium sur les
cellules osseuses en vue de la recherche de
nouveaux agents décorporants.**

Soutenance publique le 30 Novembre 2018

Devant le jury composé de :

Président du jury

Anny Cupo, Professeur, Université de Nice-Sophia Antipolis

Rapporteurs

Jaime Angulo Mora, Directeur de Recherche, Commissariat à l'Energie Atomique
Jean Vacher, Professeur, Université de Montréal

Examineurs

Alain Cazoulat, Docteur, Service de Protection Radiologique des Armées
Gaëlle Creff, Maître de Conférences, Université de Nice-Sophia Antipolis

Directeur de thèse

Georges Carle, Directeur de Recherche CNRS, Université de Nice-Sophia Antipolis

RESUME

Etude *in vitro* de la toxicité de l'uranium sur les cellules osseuses en vue de la recherche de nouveaux agents décorporants.

L'exposition à l'uranium, qu'elle soit naturelle ou accidentelle, est un sujet de préoccupation de santé publique. Cet actinide est utilisé dans de nombreuses applications civiles ou de défenses. Il est également présent de façon naturelle dans l'eau de boisson et dans l'alimentation. Sa toxicité chimique cible en majorité le rein, organe de stockage à court terme, et les tissus squelettiques, où l'uranium est retenu pendant des années. L'uranium induisant une perte osseuse à long terme, il est susceptible d'affecter les cellules impliquées dans le processus de remodelage osseux : les ostéoclastes (OCs) qui résorbent la matrice osseuse, les ostéoblastes (OBs), qui la reconstitue via la minéralisation, et les ostéocytes (OSTs), les capteurs mécano-sensibles, orchestrant le cycle de remodelage. Par ailleurs, aucune thérapie de chélation (comme il en existe pour d'autres métaux lourds) n'est véritablement efficace pour diminuer l'exposition interne et éliminer cet actinide en cas de contamination à l'uranium.

Dans l'optique de comprendre les mécanismes de toxicité mis en jeu sur les cellules osseuses, la première partie de cette thèse est ainsi consacrée à l'étude des effets moléculaires et fonctionnels d'une exposition aiguë et chronique à l'uranium sur une lignée ostéocytaire, les cellules MLO-A5. Nous avons d'abord montré que ces cellules présentent une IC50 plus élevée que les OCs et les OBs et qu'une exposition aiguë stimule le processus autophagique. Dans un second temps, nous avons analysé la réponse de ces cellules lors d'une exposition chronique à des concentrations sub-toxiques d'uranium, et observé une inhibition drastique de leur capacité de minéralisation, sans toutefois affecter leur viabilité.

Dans une seconde partie, nous nous sommes intéressés aux effets d'un décorporant potentiel de l'uranium, le 3,4,3-LI(1,2-HOPO), sur les OBs et les OCs, dans le but de mettre au point une méthode de criblage de nouveaux décorporants. Les résultats ont montré que le 3,4,3-LI(1,2-HOPO) permet une restauration partielle des capacités de différenciation et de résorption des OCs exposés à l'uranium. Ces résultats permettront d'adapter cette méthode pour le criblage de futurs décorporants dans une démarche de valorisation.

Ainsi, ces travaux ont permis d'accroître les connaissances de la toxicité chimique de l'uranium sur les cellules osseuses, et ont apporté de nouvelles données toxicologiques *in vitro* concernant les effets d'un agent décorporant, le 3,4,3-LI(1,2-HOPO), dans ces modèles cellulaires.

Mots clés : Uranium, ostéocytes, toxicité, décorporants, ostéoblastes, ostéoclastes, autophagie

SUMMARY

***In Vitro* study of uranium toxicity on bone cells in search of new decorporating agents.**

Natural or accidental uranium exposure is a health care concern. Uranium is a natural metal found in the environment and is both used for civil or military applications. It is also naturally present in food and water. It exhibits both a radiological and a chemical toxicity, the latter being considered largely predominant for natural uranium. Kidneys and bones are the main targeted organs of its toxicity. The skeleton is the storage organ of uranium and can be retained there for years, causing a long-term bone loss. Bone cells, osteoclasts cells in charge of bone resorption, osteoblasts involved in matrix production and mineralization, and osteocytes, considered the major orchestrators of bone remodeling, are therefore likely to exhibit impaired functions. Furthermore, current chelation therapy treatments failed to demonstrate a true decorporating efficiency after internal uranium contaminations.

The first part of this study describes molecular and cellular effects of acute and chronic uranium exposure on a murine osteocytic cell line MLO-A5. Acute exposure enhanced their autophagic process and CI50 determination shows less toxicity on osteocytes than on osteoclasts and osteoblasts. Moreover, mineralization capacity of these cells was strongly inhibited after a chronic exposure without affecting cell viability.

In a second part, we determined the *in vitro* effects of 3,4,3-LI(1,2-HOPO), a potential decorporating agent, on osteoclasts and osteoblasts with the intend to develop methods for decorporating agent screening. This molecule shows an ability to partly restore differentiation and resorption function of exposed osteoclasts to uranium. These results constitute a step forward in the development of screening methods to evaluate the potential of new decorporating agent.

Taken together, these results enhanced our knowledge of uranium toxicity mechanisms on bone cells and brought new toxicological data regarding the use of 3,4,3-LI(1,2-HOPO) in our cellular models.

Key words: Uranium, osteocytes, bone, toxicity, decorporating agents, osteoclasts, osteoblasts, autophagy

À mon grand-père,

REMERCIEMENTS

D'abord, je souhaite dire un grand merci au Dr. Georges Carle d'avoir dirigé ce travail de thèse. Cette thèse n'aurait pu voir le jour sans votre confiance, votre soutien et vos commentaires qui ont été sans cesse constructifs et rigoureux. Merci de m'avoir si bien accueillie et d'avoir toujours été à l'écoute, pédagogue et bienveillant. J'ai énormément appris à vos côtés autant humainement que scientifiquement lors de ces trois années.

Je remercie également les membres du jury, les Dr. Jaime Angulo Mora et Jean Vacher de me faire l'honneur d'évaluer mon travail en tant que rapporteurs, les Dr. Gaëlle Creff et Alain Cazoulat en tant qu'examineurs et le Pr. Anny Cupo d'avoir accepté d'être présidente de mon jury.

C'est l'occasion pour moi de remercier aussi toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce doctorat et à créer un environnement agréable pour que je puisse l'effectuer dans les meilleures conditions.

Bien entendu, je suis reconnaissante envers tous les membres de l'équipe qui m'ont accompagnée durant ces trois ans. Merci à Valérie Pierrefite-Carle et Sabine Santucci, qui ont su être disponibles pour m'apprendre, me conseiller et me guider. J'ai beaucoup appris à vos côtés. Je sais la chance que j'ai eue de pouvoir travailler avec des chercheuses aussi passionnées et déterminées que vous. Merci à Tatiana, doctorante au sein de l'équipe, pour tous ces « trucs et astuces » que tu m'as prodigués. Ce fut un réel plaisir de discuter et de travailler avec toi. Je ne doute pas que tu arriveras à finir ta thèse avec brio ! Merci aussi à Olivier pour ta bonne humeur et ta gentillesse. Enfin, il m'est impossible de ne pas citer Chantal, ma camarade de bureau, de pause-café. Tu as toujours su me soutenir. Tes conseils et ta bonne humeur ont été un réel pilier pour moi ; nos fous rires et nos conversations vont me manquer.

Je souhaite également remercier Gaëlle Creff, Sophie Pagnotta, et Agnès Hagège pour leurs collaborations qui furent très agréables et efficaces. Plus particulièrement, merci Gaëlle pour tes conseils et ta disponibilité ; la chimie est un peu moins mystérieuse pour moi grâce à toi.

Merci à tout le personnel de la tour Pasteur pour leurs conseils et les moments de détente.

Je remercie aussi toute l'équipe TIRO et particulièrement Colette pour son efficacité dans la gestion administrative des tracas quotidiens. Merci aussi Lun pour ta disponibilité, tes conseils et ton aide, même quand il s'agit de déménager mon appartement. Merci Julien pour tes conseils et les nombreuses conversations où tu as pu partager ta façon de voir les choses ; ce qui m'a beaucoup aidé au cours de cette thèse. Merci aussi de m'avoir fait découvrir les arts martiaux.

Merci à tous mes camarades du Kali. Pape, je me souviendrai longtemps de tes poings et de tes tibias en béton, mon coude et mon œil aussi. Mais je retiendrai surtout ta bonne humeur communicative. Jonas, merci pour tes encouragements autant pour la thèse que pour la boxe ; j'entends encore dans ma tête « Aller !!! Encore 10 pompes ! ». Merci Alain pour ta joie de vivre et tes playlists endiablées qui m'ont motivée comme jamais. Eloïse, mon binôme de boxe, partenaire de bleus. Je dois prendre ma revanche sur le dernier combat ! Merci à toi pour tes conseils, ton écoute et ton soutien. Merci à tous pour ces moments et ces fous rires. Ces heures ont été une bouffée d'oxygène ; de vrais moments de détente et de rigolade que j'attendais toujours avec impatience ! Ce fut un réel plaisir de découvrir ce sport avec vous.

Maha, je tiens vraiment à te remercier pour ton amitié et ton soutien indéfectible depuis le début de ma thèse. Tu as toujours répondu présent quand j'en avais besoin, même quand on ne se connaissait pas vraiment, je t'en serai toujours véritablement reconnaissante. Je n'oublierai pas non plus ces longues heures passées au téléphone à se soutenir pendant l'écriture de nos thèses. Tes conseils et tes encouragements ont été un vrai appui. Je retiens aussi les soirées jeux et les franches rigolades. J'espère qu'on saura garder cette amitié. Ta détermination t'emmènera là où tu le souhaites, j'en suis persuadée. Bonne chance pour la suite !

Ils ont su me supporter et me soutenir tout au long de cette thèse et tout cela n'aurait pas été possible sans eux, merci donc à tous mes proches. Un grand merci à mes amis qui m'ont toujours épaulée depuis des années, une véritable seconde famille. Ma chère Elodie, merci pour nos interminables heures de « babyphone ». La distance n'a rien enlevé à notre amitié, merci pour ta sincérité et ton soutien. Médéric, « bidouilleur » en tout genre, tu as toujours répondu présent même quand il s'agissait de faire 450 km pour un déménagement. Cédric, merci pour ton humour qui remonte à chaque fois le moral et Mathilde, pour tes conseils des plus sages et le temps que tu as consacré à corriger mes « également ».

Merci à mes amis niçois : Marina, Maxime, Stéphanie, Marion, Estella, Marion, Romane, Tom... Grâce à vous, ces années ont été pleines de rencontres, d'amitié et d'excellents moments. Je remercie aussi plus particulièrement Tim et Tom de m'avoir accueillie si gentiment chez Olim et de m'avoir laissée occuper leur terrasse des journées entières pour écrire une partie de cette thèse.

Enfin, un immense merci à ma famille. A Franck, frangin à l'écoute, de bons conseils et toujours présent quand il faut. A mes parents, à qui je dois tout. Vous m'avez toujours soutenue dans mes choix, même les plus aventureux. Vous avez toujours cru en moi et vous avez toujours su m'épauler. J'ai pu vivre mes études et ce doctorat le plus sereinement possible grâce à vous et votre soutien, merci encore.

Du fond du cœur, un énorme merci à tous.

SOMMAIRE

RESUME	3
REMERCIEMENTS	6
SOMMAIRE	8
TABLEAUX ET FIGURES	11
ABREVIATIONS	13
INTRODUCTION.....	16
ÉTAT DE L'ART.....	18
CHAPITRE I : L'URANIUM.....	18
I. GÉNÉRALITÉS.....	18
A. HISTORIQUE.....	18
B. PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES ET RADIOLOGIQUES.....	18
C. UTILISATIONS.....	21
II. L'URANIUM DANS L'ENVIRONNEMENT ET SITUATIONS D'EXPOSITIONS	22
A. EXPOSITION NATURELLE	22
B. EXPOSITIONS LIÉES AUX ACTIVITÉS HUMAINES.....	24
III. BIOCINÉTIQUE.....	25
A. ABSORPTION.....	25
B. DISTRIBUTION.....	26
C. METABOLISME.....	29
D. ÉLIMINATION	29
E. LE TRANSPORT SANGUIN DE L'URANIUM	30
CHAPITRE II : LE TISSU OSSEUX	32
I. GÉNÉRALITÉS.....	32
A. ORGANISATION	32
1. L'os compact	32
2. L'os spongieux.....	34
B. FONCTIONS DU TISSU OSSEUX.....	34
C. LA MATRICE OSSEUSE.....	35
II. LES CELLULES OSSEUSES	36
A. LES OSTÉOCLASTES.....	36
1. Modèles de résorption <i>in vitro</i>	37
B. LES OSTÉOBLASTES.....	38
C. LES OSTÉOCYTES.....	39
1. Morphologie.....	40
2. Mécano-transduction	42
3. Autres rôles des ostéocytes	43
(a) Homéostasie phospho-calcique	43

(b) Ostéolyse ostéocytaire	45
4. Différentiation ostéocytaire et marqueurs.....	45
5. Les différents modèles cellulaires.....	48
III. LE REMODELAGE OSSEUX.....	50
A. DIFFÉRENCIATION OSTÉOCLASTIQUE ET RÉSORPTION.....	51
B. LA MINÉRALISATION.....	54
C. ORCHESTRATION DU REMODELAGE	58
1. Régulation de la formation osseuse	58
2. Régulation de la résorption osseuse.....	58
3. Rôle de la mort des ostéocytes.....	58
D. ROLE DE L'AUTOPHAGIE.....	60
(a) Définition	60
(b) Mécanisme	61
(c) Rôle dans l'os	62
CHAPITRE III : TOXICITÉ DE L'URANIUM ET MÉTAUX LOURDS DANS L'OS	65
I. TOXICITÉ DE L'URANIUM	65
A. EFFETS SUR LE REIN	65
B. EFFETS SUR L'OS	67
1. <i>In vivo</i>	67
2. <i>In vitro</i>	68
C. EFFETS SUR LES AUTRES ORGANES	71
II. MÉTAUX LOURDS ET OS.....	72
III. LA DÉTOXIFICATION DE L'URANIUM	74
A. Le DTPA.....	74
B. LE 3,4,3-LI(1,2-HOPO).....	75
C. AUTRES DECORPORANTS	76
RESULTATS.....	79
CHAPITRE I : CONSEQUENCES DE L'EXPOSTION A L'URANIUM NATUREL SUR LES	
CELLULES OSTEOCYTAIRES MLO-A5	79
I. PRESENTATION.....	79
II. ARTICLE EN COURS DE SOUMISSION.....	79
<i>Sample preparation</i>	88
<i>Data acquisition, processing and analysis</i>	89
<i>References</i>.....	101
III. MATERIELS ET METHODES COMPLEMENTAIRES.....	113
A. ANALYSES QPCR	113
B. EXTRACTION PROTEIQUE ET ANALYSE PAR WESTERN BLOT	113
IV. RESULTATS COMPLEMENTAIRES	114
V. DISCUSSION ET CONCLUSION.....	122
CHAPITRE II : EVALUATION DE L'EFFET D'UN DECORPORANT POTENTIEL DE L'URANIUM,	
LE 3,4,3-LI(1,2-HOPO), SUR LES OSTEOBLASTES ET LES OSTEOCLASTES	127
I. PRESENTATION.....	127
II. MATERIELS ET METHODES.....	128
A. CULTURE CELLULAIRE.....	128
B. EXPOSITION A L'ACETATE D'URANYLE ET AU HOPO.....	129

C.	MINERALISATION ET COLORATION ALIZARINE	129
D.	TEST MTT	129
E.	MARQUAGE TRAP	130
F.	ANALYSE DE LA RESORPTION	130
G.	QUANTIFICATION DE L'URANIUM PAR ICP-MS.....	131
H.	STATISTIQUES	131
III.	RESULTATS	132
A.	EFFET DU HOPO SUR LES OSTEOCLASTES	132
B.	EFFET DE L'UA EN PRESENCE DE HOPO SUR LES OSTEOCLASTES	133
C.	FIXATION DE L'URANIUM SUR LES SUPPORTS BIO-MIMETIQUES	137
D.	EFFET DU HOPO SUR LES OSTEOBLASTES	138
IV.	DISCUSSION ET CONCLUSION	140
	DISCUSSION GENERALE	143
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	149
	BIBLIOGRAPHIE	154

TABLEAUX ET FIGURES

Figure 1 Chaîne de désintégration de ^{235}U .	20
Figure 2 Chaîne de désintégration de ^{238}U .	21
Figure 3 Carte représentant la quantité moyenne d'uranium dans les sols en France.	22
Figure 4 Autoradiographie de fémur de souris à 1 et 224 jours post-injection d' ^{233}U citrate.	28
Figure 5 Distribution élémentaire et intensité de la quantité d'uranium (jaune) et du calcium (gris) obtenue par micro-fluorescence à rayons X par radiation synchrotron (SR- μXRF)	29
Figure 6 Biocinétique de l'uranium à travers ses principaux organes cibles.	31
Figure 7 Structure multi-échelle du tissu osseux.	33
Figure 8 Organisation du collagène fibrillaire dans le tissu osseux.	36
Figure 9 La résorption osseuse par les ostéoclastes.	37
Figure 10 Photographies représentant le réseau ostéocytaire.	41
Figure 11 Représentation schématique des héli-canaux.	42
Figure 12 Implication des OSTs dans la régulation du métabolisme du phosphate et du calcium.	44
Figure 13 Marqueurs moléculaires de la différenciation ostéocytaire.	48
Figure 14 Le remodelage osseux.	51
Figure 15 Représentation schématique de la différenciation des ostéoclastes et principaux marqueurs des différentes phases.	52
Figure 16 Représentation du processus de minéralisation.	57
Figure 17 Schéma simplifié de la régulation du remodelage osseux par les OSTs.	60
Figure 18 Mécanisme de l'autophagie.	62
Figure 19 Photos de microscopie électronique à transmission d'UMR106, une lignée d'ostéosarcome de rat en minéralisation.	63
Figure 20 Photos de Microscopie Electronique à Transmission d'UMR 106 exposées pendant 24 h à du nitrate d'uranyle.	70
Figure 21 Structure moléculaire du 3,4,3-LI(1,2-HOPO).	76
Figure 22 Viabilité des MLO-A5 mesurée par MTS après 10 jours de minéralisation en présence d'UA.	115
Figure 23 Minéralisation des MLO-A5 après 7 ou 10 jours d'exposition à l'UA colorées à l'Alizarine.	116
Figure 24 Images de microscopie électronique à transmission de MLO-A5 après 7 jours d'exposition à l'UA pendant la minéralisation.	117
Figure 25 Images de microscopie électronique à transmission de MLO-A5 après 10 jours d'exposition à l'UA pendant la minéralisation.	118
Figure 26 Niveau d'expression génique des marqueurs ostéoblastiques ALP et BSP en fonction de la concentration d'exposition à l'UA après 7 jours de minéralisation.	119

<i>Figure 27 Niveau d'expression des marqueurs ostéoblastiques et ostéocytaires en fonction de la concentration d'exposition à l'UA après 10 jours de minéralisation.</i>	120
<i>Figure 28 Expression protéique de la BSP et de E11 après 7 jours d'exposition à l'UA au cours de la minéralisation.</i>	121
<i>Figure 29 Expression protéique de la BSP et de E11 après 10 jours d'exposition à l'UA au cours de la minéralisation.</i>	121
<i>Figure 30 Détermination de la taille des OCs en présence de HOPO.</i>	132
<i>Figure 31 Détermination de la taille des OCs en présence de 25 μM d'UA et de HOPO.</i>	134
<i>Figure 32 Détermination de la taille des OCs en présence de HOPO et d'UA 25 μM pendant 4 jours de jours de différenciation des RAW 264.7.</i>	135
<i>Figure 33 Détermination de la capacité de résorption des OCs en présence de 5 μM d'UA et de HOPO.</i>	136
<i>Figure 34 Dosage de l'uranium fixé par puits sur l'OsteoassayTM en présence de HOPO.</i>	137
<i>Figure 35 Activité métabolique des UMR-106 exposées au HOPO pendant les 5 jours de minéralisation mesurée par MTT.</i>	138
<i>Figure 36 Minéralisation des ostéoblastes (UMR-106) en présence de HOPO pendant 5 jours.</i>	139
<i>Figure 37 Schéma bilan : effets de l'uranium et du HOPO sur la fonction des cellules osseuses.</i>	150
<i>Tableau 1 Propriétés radiologiques et abondance naturelle de l'uranium.</i>	20
<i>Tableau 2 Concentration d'uranium dans l'eau.</i>	23
<i>Tableau 3 Distribution de l'uranium dans les principaux organes dans différentes études.</i>	28
<i>Tableau 4 Principaux marqueurs ostéoblastiques.</i>	39
<i>Tableau 5 Principaux marqueurs de la différenciation des OSTs.</i>	47
<i>Tableau 6 Résumé des effets de cytokines pro et anti-ostéoclastogéniques.</i>	53
<i>Tableau 7 Synthèse des IC50 de l'uranium dans différentes lignées cellulaires.</i>	69
<i>Tableau 8 Toxicité de métaux lourds sur les cellules osseuses.</i>	73
<i>Tableau 9 Synthèse des données d'efficacité de décorporation des principaux décorporants dans les différents organes.</i>	78

ABREVIATIONS

Ac	Actinium
ALP	Phosphatase alcaline
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messagers
ASARM	Acidic-Serine-Aspartate Rich MEPE associated
ATG	Autophagy related Gene
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
Bi	Bismuth
BMP2	Bone Morphogenic Protein 2
BSP	Sialoprotéine osseuse
CaBP	Calcium Binding Protein
Cd	Cadmium
Co	Cobalt
Coll1α	Collagène 1 α
CPC	Chlorure de cétypyridinium
Cr	Chrome
CTx	C-Terminal Telopeptides Type I collagen
Cx	Connexine
Cx43	Connexine 43
Dkk1	Dickkopf-related protein 1
DL50	Dose létale médiane 50
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMP1	Dentin Matrix Protein 1
DO	Densité optique
DTPA	Acide diéthylènetriaminepentaacétique
DU	Depleted Uranium
EDS	Energy dispersive spectroscopy
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
EXAFS	Extended x-ray absorption fine structure
FDA	Food and Drug Administration

FGF23	Fibroblast Growth Factor 23
GC	Glucocorticoïdes
Hh	Hedgehog
HMGB1	High Mobility Group Box 1
HOPO	3,4,3-LI(1,2-HOPO)
HSC	Cellules souches hématopoïétiques
IC50	Index Cytotoxique 50 %
ICP-MS	Spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif
ICP-OES	Spectrométrie à Emission Optique par torche à plasma
IL	Interleukine
INF	Interféron
IP3	Inositol Triphosphate
IRSN	Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire
LOAEL	Lowest Observed Adverse Effect Level
MCS-F	Macrophage colony-stimulating factor
MEM	Minimal essential medium
MEPE	Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein
MLO-A5	Murine like osteocyte clone A5
MMP	Métalloprotéase matricielle
MSC	Mesenchymal Stem cells
MT1-MMP	Membrane type 1 matrix metalloproteinase
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) tetrazolium
NFKB	Nuclear Factor kappa-B
NO	Nitric Oxyde / Oxide Nitrique
OBs	Ostéoblastes
OCN	Ostéocalcine
OCs	Ostéoclastes
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OPG	Ostéoprotégérine
OPN	Ostéopontine
OSTs	Ostéocytes
Pa	Protactinium
Pb	Plomb

PGs	Prostaglandines
PHEX	Phosphate-regulating neutral Endopetidase, X linked
Pi	Phosphate inorganique
PIXE	Particle induced x-ray emission
Po	Polonium
Ppi	Pyrophosphate inorganique
PTH	Parathyroid hormone
PTH1R	Parathyroid Hormone type 1 Receptor
RANK-L	Receptor Activator of Nuclear Factor kappa-B Ligand
Rn	Radon
ROS	Reactive Oxygen Species
RT-qPCR	Reverse transcriptase- quantitative polymerase chain reaction
RUNX2	Runt-related transcription factor 2
RyR	Ryanodine Receptor
SIBLINGs	Small Integrin-Binding Ligands with N-linked Glycosylation
SVF	Sérum de Veau Foetal
TEM	Microscopie électronique à Transmission
TFG-β	Transforming Growth Factor -β
Th	Thorium
TNF	Tumor Necrosis Factor
TRAP	Tartrate-resistant acid phosphatase
TRPV5	Transient Receptor Potential Vanilloide 5
U	Uranium
U(VI)	Uranium sous forme hexavalente
UA	Acétate d'uranyle
VDR	Vitamine D Receptor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

INTRODUCTION

L'uranium suscite de nombreuses questions en santé humaine. En effet, depuis la découverte de ses propriétés radiologiques et le développement de son utilisation aussi bien civile (centrales nucléaires...) que militaires (fabrication de blindages de chars et d'obus), le risque d'exposition à cet actinide n'a cessé de croître. Il est potentialisé par la présence naturelle de cet élément dans les roches et dans les sols, et par conséquent dans l'eau de boisson et la nourriture. En conséquence de l'exploitation de l'uranium, les militaires, les travailleurs du nucléaire ainsi que les populations environnantes de ces installations sont les populations les plus susceptibles d'être exposées accidentellement ou de manière prolongée à ce métal lourd, et d'en subir des effets délétères. Par ailleurs, des pays développent leur parc nucléaire, comme la Chine ou l'Inde, dont les besoins en électricité sont croissants, ou certains pays d'Afrique au sol uranifère, qui préparent l'après-pétrole. Avec ce développement, le nombre de travailleurs du nucléaire va s'accroître dans les années à venir. Or, même à l'état naturel, l'uranium constitue un danger potentiel à travers sa toxicité chimique et radiologique, bien que cette dernière soit considérée comme négligeable. La toxicité chimique est la principale responsable des conséquences physiologiques d'une intoxication à l'uranium non enrichi. Ses mécanismes de toxicité et les façons de prévenir cette toxicité ou de l'atténuer en cas d'exposition sont donc des sujets d'intérêt.

Dans le cas d'expositions aiguës à de fortes doses, l'uranium occasionne des dommages rénaux importants. Le squelette constitue l'organe de stockage de cet actinide puisqu'un peu plus d'un cinquième de la quantité d'uranium circulante va s'y emmagasiner très rapidement après la contamination. Il y demeure durant des années avant d'être relargué lentement dans la circulation sanguine. L'os assure des fonctions mécaniques et protectrices des organes vitaux mais il participe également activement à l'homéostasie phospho-calcique. Il se renouvelle en permanence grâce au remodelage osseux effectué par l'action coordonnée des différentes cellules osseuses. L'uranium se fixe de façon privilégiée sur l'os, notamment dans les zones de remodelage. Ses cellules sont donc une cible privilégiée de la toxicité de ce métal.

La toxicité *in vivo* et la radiotoxicité de l'uranium ont été très largement étudiées. Cependant, les mécanismes de toxicité chimique ne sont pas complètement élucidés. Des études ont été menées *in vitro* sur les cellules effectrices du remodelage osseux : les ostéoblastes (OBs) et les ostéoclastes (OCs), pour comprendre les mécanismes de toxicité de l'uranium sur le tissu osseux. Dans ce projet, une attention particulière est portée à évaluer la toxicité de l'uranium et ses effets sur la viabilité et les fonctions des ostéocytes (OSTs) en utilisant une lignée immortalisée d'ostéocytes murins (cellules MLO-A5). En effet, les OSTs jouent le rôle de chefs d'orchestre du remodelage. Ils constituent la plus grande partie des cellules osseuses et peuvent vivre des décennies contrairement aux OBs et aux OCs. Un impact à long terme est donc prévisible sur ces cellules en cas d'exposition à l'uranium et aucune étude à ce jour n'a exploré ses effets sur les ostéocytes. À terme, l'élucidation des effets de l'uranium sur les cellules osseuses permettra l'élaboration de tests *in vitro* qui aideront à l'identification de décorporants potentiels de l'uranium, des agents qui facilitent son élimination ou préviennent sa fixation dans les tissus cibles après contamination.

Dans cette même optique, une partie des travaux présentés dans ce manuscrit a consisté à évaluer la toxicité et la capacité de décorporation du 3,4,3-LI(1,2-HOPO), un décorporant potentiel de l'uranium, sur des OBs ou des OCs *in vitro*, en se basant sur des travaux précédemment effectués évaluant l'effet de l'uranium sur ces cellules osseuses.

Après avoir présenté dans un premier temps un état de l'art concernant l'uranium, le système osseux et les effets de l'uranium sur ce dernier, nous décrirons dans une première partie, l'article soumis pour publication et les résultats complémentaires décrivant les effets biologiques de l'uranium sur une lignée d'ostéocytes, les MLO-A5. Dans une seconde partie, les résultats obtenus concernant les effets du 3-4-3LI(1,2-HOPO) sur des ostéoblastes et des ostéoclastes seront décrits. Ces résultats seront discutés et replacés dans une perspective plus générale pour la suite du projet.

CHAPITRE I : L'URANIUM

I. GÉNÉRALITÉS

A. HISTORIQUE

C'est en analysant une roche apportée d'une mine que le chimiste et minéralogiste allemand Martin Heinrich Klaproth découvre le minerai d'uranium en 1789 (Milgram 2008). Ce minerai est baptisé Urane en hommage à la découverte de la planète Uranus quelques années plus tôt, puis il est renommé Uranium en 1790. Le métal en lui-même n'est isolé qu'en 1841 par le français Eugène Melchior Péligot qui établit la composition de l'oxyde d'uranium comme une association d'un atome de métal avec deux atomes d'oxygène. Les propriétés radioactives de l'uranium sont mises en évidence un demi-siècle plus tard, en 1896, par Henri Becquerel. Ce dernier remarque les sels d'uranium noircissaient des plaques photographiques sans aucune exposition à la lumière. Il découvre ainsi la radioactivité et appelle cela les « rayons uraniques ». Marie Curie observe quelques années plus tard le même phénomène à partir d'autres minerais comme le thorium et nomme ce phénomène la « radioactivité » (du latin *radius*, rayon). À partir des années 1940, la découverte de la fission nucléaire est exploitée à travers la production d'électricité et la fabrication d'armes nucléaires. La bombe A, fabriquée à partir d'uranium enrichi, est utilisée en 1945 par les Américains sur la ville d'Hiroshima au Japon. Depuis, l'utilisation à des fins civiles de l'uranium s'est répandue ; notamment en France où la filière de l'uranium constitue la plus grande partie de la production d'énergie électrique des centrales nucléaires.

B. PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES ET RADIOLOGIQUES

L'uranium, de symbole U et de numéro atomique 92, fait partie de la famille des actinides. Cette famille regroupe quinze métaux lourds radioactifs, du numéro atomique 89 (actinium) au numéro 103 (lawrencium). Seuls l'uranium et le thorium sont des actinides naturellement présents sur Terre, les autres étant des éléments résultants de transformations anthropiques.

L'uranium possède une masse volumique de 19 g/cm^3 , un point de fusion à 1135°C et un point d'ébullition à 4131°C . Ce métal est pyrophorique : il s'enflamme spontanément au contact de l'air sous l'action d'une légère friction comme un impact.

Trois isotopes de l'uranium sont retrouvés à l'état naturel : l' ^{238}U , ^{235}U , et ^{234}U sont présents respectivement à 99,275 %, 0,72 % et 0,0057 % (IRSN 2010). L' ^{234}U résulte de la désintégration naturelle de l' ^{238}U mais il est responsable de la moitié de la radioactivité de l'uranium naturel (**Tab. 1**). Alors que la majorité de la radioactivité de l'uranium consiste en l'émission de particules α , de rayonnements X de basse énergie et d'électrons, certains descendants de l'uranium émettent majoritairement des particules β comme le thorium (**Fig. 1 et 2**). Les désintégrations α consistent en l'émission de noyaux d'hélium. Ils sont arrêtés par une feuille de papier. Il est donc facile de s'en protéger. Cependant, ils sont très ionisants sur une courte distance, notamment lorsqu'il s'agit d'une contamination interne. Les rayonnements β sont des faisceaux d'électrons (β^-) ou de positons (β^+). Ils causent plus de dommages que les rayonnements α car ils sont chargés électriquement. Ils sont arrêtés par une feuille d'aluminium de quelques millimètres ou un écran de plexiglas d'un centimètre. Le rayonnement γ accompagne souvent une désintégration α ou β . C'est un rayonnement électromagnétique constitué de photons de haute énergie. Il présente un pouvoir pénétrant beaucoup plus important mais moins ionisant que les particules α et β . Ces rayonnements sont arrêtés par 6 cm de plomb ou 30 cm de béton (IRSN 2011).

Le radon, un gaz radioactif, est un des éléments issus de la désintégration de l'uranium et favorise l'apparition de cancers des poumons. Cependant, les périodes radioactives très longues de l'uranium combinées à son abondance naturelle font de lui un composé naturellement peu radioactif et dont la toxicité chimique est prédominante. L' ^{235}U étant fissile, l'uranium naturel est enrichi en ^{235}U pour son utilisation dans les centrales et les bombes nucléaires. On parle d'uranium hautement enrichi lorsque l' ^{235}U représente plus de 20 % des atomes et d'uranium enrichi quand la proportion de celui-ci est comprise entre 0,9 % et 20 %. Un sous-produit de cet enrichissement, l'uranium appauvri (DU, pour *Depleted Uranium* en anglais) est alors obtenu et contient moins de 0,7 % d' ^{235}U .

Tableau 1 Propriétés radiologiques et abondance naturelle de l'uranium.
(données IRSN, 2010).

	Abondance naturelle	Période radioactive	Contribution à l'activité radioactive
^{234}U	0,0057 %	246 000 ans	49,5 %
^{235}U	0,719 %	704 000 000 ans	2,3 %
^{238}U	99,275 %	4 470 000 000 ans	48,3 %

L'uranium, comme tous les éléments chimiques, possède différentes spéciations. En fonction de son environnement chimique (éléments et degré d'oxydation), il peut effectuer différents types de liaisons pour former un complexe donné avec les éléments environnants. La spéciation chimique conditionne le devenir d'un élément, favorisant ou non sa solubilité et son transport dans l'environnement ou dans un organisme. La valence de l'uranium varie de +2 à +6 à l'état naturel mais est retrouvée le plus communément à l'état hexavalent noté U(VI) associé à l'oxygène sous forme d'ion uranyle UO_2^{2+} (World Health Organization 2012).

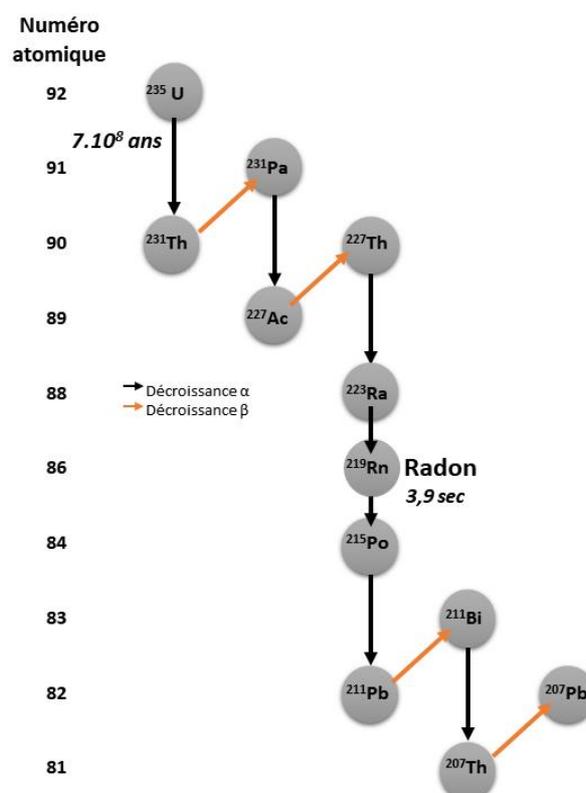


Figure 1 Chaîne de désintégration de l' ^{235}U .
Adapté de (IRSN, 2011)

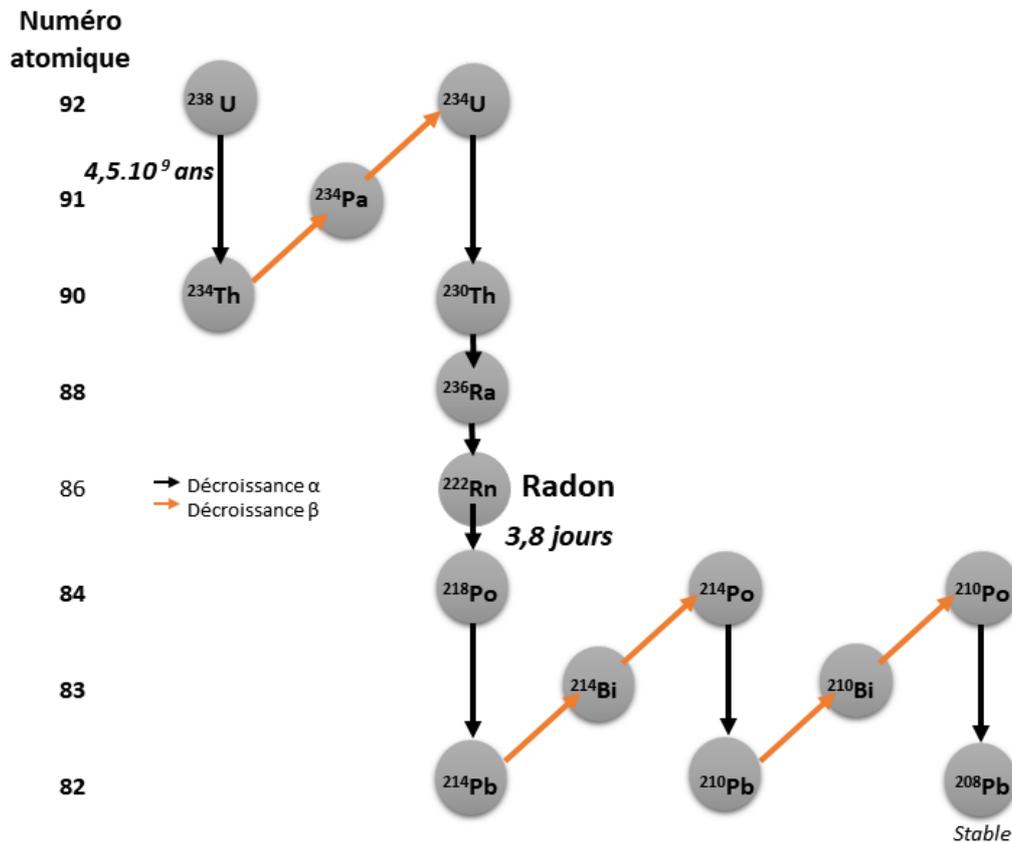


Figure 2 Chaîne de désintégration de l' ^{238}U .
Adapté de (IRSN, 2011)

C. UTILISATIONS

L'uranium a été utilisé dès l'Antiquité comme colorant pour le verre, les faïences et les céramiques, leur donnant une couleur verte ou jaune. Aujourd'hui, il est utilisé pour des applications tant bien militaires que civiles. L'uranium, et notamment l' ^{235}U qui est le seul uranium fissile, est exploité pour la production d'énergie de source nucléaire en France. Il possède aussi une densité presque deux fois plus élevée que le plomb ($19,1 \text{ g/cm}^3$ contre $11,4 \text{ g/cm}^3$). Grâce à cette propriété, on le retrouve pour des applications civiles dans les blindages anti-irradiations des appareils médicaux, dans les contrepoids de l'aéronautique, et comme produit de contraste en microscopie électronique. Par ailleurs, l'uranium appauvri est aussi employé dans le domaine militaire. Sa haute densité en fait un matériau de choix dans la composition des blindages des chars et de munitions perforantes capables de percer les blindages. De plus, l'uranium appauvri étant pyrophorique, cette propriété donne aux obus et aux munitions une capacité incendiaire.

II. L'URANIUM DANS L'ENVIRONNEMENT ET SITUATIONS D'EXPOSITIONS

A. EXPOSITION NATURELLE

Selon l'IRSN (Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire) et l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), la population générale ingère quotidiennement entre 1 et 4 μg d'uranium à travers l'eau de boisson principalement, et la nourriture. En effet, l'uranium est un élément naturel omniprésent dans l'environnement. Il est présent dans les roches, dans l'air et dans l'eau à des concentrations variables. On le retrouve en quantité importantes dans les roches d'origine volcanique telles que le granite, les sédiments phosphatés ou le schiste noir. La quantité d'uranium peut y atteindre localement des dizaines de milligrammes par kilogramme de roches (Ielsch et al. 2017; Santos-Francés et al. 2018). En Europe, et plus particulièrement en France, la concentration moyenne d'uranium dans les roches varie de 0,79 à 11 mg/kg (Santos-Francés et al. 2018) (Ielsch et al. 2017) (**Fig. 3**). Elle est plus élevée en

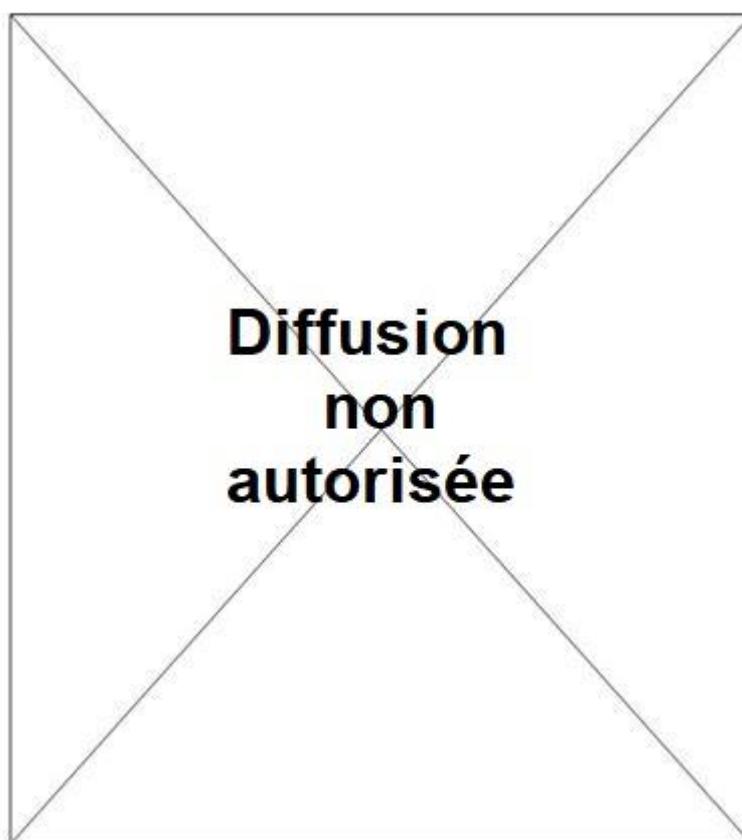


Figure 3 Carte représentant la quantité moyenne d'uranium dans les sols en France.

Figure 7 de l'article (Ielsch et al, 2017)

Espagne dans la région de Salamanque où la quantité d'uranium peut atteindre jusqu'à 102 mg/kg selon le type de sol. D'autres régions d'Europe sont aussi particulièrement riches en uranium comme le centre de l'Italie, l'est de la Suède et le Sud de la Finlande (Cinelli et al. 2018; Santos-Francés et al. 2018).

L'uranium est également présent dans les océans, les rivières et dans les eaux souterraines (**Tab. 2**). Sa présence résulte du ruissellement des eaux de pluies sur les sols, de sa dissémination par le vent et des activités humaines. Dans certaines zones de Finlande et du Canada où les roches sont particulièrement riches en uranium, les eaux souterraines peuvent atteindre jusqu'à 1920 µg/L correspondant à une ingestion d'environ 4 mg d'uranium par jour pour la population locale (Prat et al. 2009), alors que la concentration maximale d'uranium dans l'eau de boisson recommandée par l'OMS est fixée à 30 µg/L depuis 2011 (cette norme était de 2 µg/L en 1998 puis de 15 µg/L en 2004 (Prat et al. 2009)). Dans les rivières françaises, la concentration moyenne d'uranium s'étend de 0,02 à 6 µg/L et peut atteindre localement jusqu'à 11 voire 20 µg/L (IRSN 2010). Dans les milieux marins, la concentration moyenne s'élève à 3,3 µg/L (IRSN 2010).

Tableau 2 Concentration d'uranium dans l'eau.

Localisation	Type d'eau	Concentration d'Uranium (µg/L)	Publication
Tadjikistan	Eau de boisson (réseau publique)	17 à 124	(Zoriy et al. 2018)
Canada	Eau de boisson	2 à 781	(Limson Zamora et al. 1998)
Finlande	Eaux souterraines	6 à 3410	(Prat et al. 2009)
Kosovo	Eaux souterraines	0,012 à 166	(Berisha et Goessler 2013)
Sud Finlande	Eaux souterraines	0,001 à 1920	(Kurttio et al. 2002)
France	Rivière	0,02- 20	(IRSN 2010)
Mer	Eau de mer	Moy. 3,3	(IRSN 2010)

L'air contient une quantité faible d'uranium : de 0,08 à 1,5 ng/m³ mesurée en Pologne, de 0,07 à 0,4 ng/m³ aux USA ou de 0,02 à 0,14 ng/m³ en Allemagne (UNSCEAR 2000) soit entre 0,5 à 30 ng d'uranium inhalés par jour (pour un volume de 20 m³ quotidien). La fumée de cigarette, quant à elle, contribue à hauteur de 25 ng par jour d'uranium inhalés pour un fumeur consommant un paquet quotidiennement (World Health Organization 2012). Cependant, ces valeurs restent négligeables si on les compare à l'exposition quotidienne de la population via l'alimentation et l'eau de boisson.

B. EXPOSITIONS LIÉES AUX ACTIVITÉS HUMAINES

La présence de l'uranium dans l'environnement résulte aussi de son exploitation par l'Homme. En effet, les activités liées au cycle du combustible nucléaire ont contribué à contaminer les sols et les eaux de certaines zones du globe de façon durable dans le temps (Al-Qasmi et al. 2018). L'utilisation agricole massive d'engrais phosphatés (extraction à partir de sols riches en uranium) est une des causes de l'enrichissement des sols. En Allemagne, Liesch et al. ont montrés une élévation de 23 % (0,9 contre 0,7 µg/L) de la concentration d'uranium dans l'eau des zones agricoles en comparaison avec celle des zones non agricoles (Liesch et al. 2015). Des études ont également examiné l'isotopie de l'uranium retrouvé dans les sols et la nourriture au Kosovo, pays où près de 11 tonnes de munitions à l'uranium appauvri ont été utilisées lors de la guerre du Golfe à la fin des années 90 (Besic et al. 2017). Les auteurs ont relevé localement une élévation de la proportion d'uranium appauvri par rapport à l'uranium naturel, qui pourrait traduire une contamination des suites du conflit (Carvalho et Oliveira 2010; Besic et al. 2017).

De plus, une partie de la population est directement exposée à l'uranium par son activité professionnelle. Dès l'extraction du minerai, les travailleurs sont exposés à la toxicité de ce métal (Brugge et Buchner 2011) par les poussières d'uranium inhalées et par le radon, le gaz radioactif dérivant de la décroissance de l'uranium qui est libéré lors de l'extraction de la roche uranifère. L'utilisation militaire de l'uranium appauvri dans les munitions et obus est une source de contamination pour les forces armées. En effet, des vétérans de la guerre du Golfe vivent avec des éclats d'obus d'uranium appauvri dans leur organisme. Ces éclats deviennent par la suite une source de contamination chronique. Ils génèrent une contamination telle que, après la guerre, la quantité d'uranium excrétée dans les urines de ces soldats sur 10 ans peut atteindre 190 mg (Squibb et al. 2005) (à comparer aux 7,3 mg ingérés par une personne *lambda* (2 µg/jour) sur la même période).

III. BIOCINÉTIQUE

A. ABSORPTION

L'uranium pénètre dans l'organisme par trois voies différentes : il peut être ingéré, inhalé ou pénétrer par voie cutanée (**Fig. 6**).

Inhalation

Comme précédemment indiqué, la population inhale jusqu'à 30 ng d'uranium par jour. En cas d'exposition accidentelle, cette voie concerne majoritairement les travailleurs des mines ou les militaires potentiellement exposés lors de l'impact des munitions à l'uranium appauvri. Les poussières d'uranium peuvent être retenues très longtemps dans le poumon avant de rejoindre la circulation sanguine même si les particules inférieures à 100 nm passent très rapidement dans le sang ($T_{1/2}$, temps nécessaire pour que la moitié de la quantité inhalée passe dans le sang = 2,4 h contre 141,5 jours pour les particules de taille supérieure à 100 nm) (Petitot et al. 2013). Elles peuvent également remonter vers la bouche et rejoindre le système digestif grâce au système muco-ciliaire (Yue et al. 2018). Les macrophages pulmonaires contribuent aussi à la distribution de l'uranium (Batchelor et al. 1982).

Lésion cutanée

L'uranium peut pénétrer dans l'organisme par la peau. La quantité d'uranium qui passe dans le sang dépend de la concentration, du temps d'exposition à la contamination mais aussi de l'oxydation de l'uranium contaminant, sa forme U(VI) favorisant sa solubilité et, en conséquence, son passage dans la circulation (Yue et al. 2018). Chez le rat, alors que 0,4 % de l'uranium d'une solution de nitrate d'uranyle déposée sur la peau saine est absorbé après 24 h, c'est 38 % de l'uranium qui atteint la circulation dans le cas d'une peau écorchée (Petitot et al. 2007).

Ingestion

En ce qui concerne la population générale, l'ingestion d'eau ou de nourriture contaminée reste la voie d'exposition principale. L'absorption d'uranium varie selon plusieurs paramètres : l'espèce, la solubilité de l'uranium ou le régime alimentaire. Chez l'Homme, la fraction absorbée après ingestion au niveau de l'intestin est estimée entre 1 et 2 % pour l'U(VI) et de 0,2 % pour l'uranium insoluble (Leggett et Harrison 1995; Yue et al. 2018) (**Fig. 6**). Chez le rat,

il a été montré que cette absorption varie de 0,5 à 2,8 % et peut atteindre jusqu'à 6 %, en présence de formes très solubles de l'uranium comme le nitrate d'uranyle (état hexavalent) (Sullivan 1980; La Touche et al. 1987). Cette absorption s'effectue très rapidement puisque le pic d'uranium sérique (0,127 µg/mL) chez des rats intoxiqués au nitrate d'uranyle (^{235}U) par gavage est atteint en trente minutes après une ingestion de 6 mg par rat (La Touche et al. 1987). Une étude menée en 2005 montre que l'absorption de l'uranium s'effectue à travers le petit intestin à 80 % par voie transcellulaire, suggérant l'implication de transporteurs (Dublineau et al. 2005). Le régime alimentaire influence aussi l'absorption puisque des agents oxydants comme le fer augmentent l'absorption intestinale de l'uranium alors que des agents réducteurs présentent l'effet inverse (Sullivan et al. 1986). La fraction non absorbée par l'intestin est éliminée dans les fèces.

B. DISTRIBUTION

L'organisme contient en moyenne 90 µg d'uranium dont 66 % est retrouvé dans le squelette, 16 % dans le foie et 8 % dans le rein du fait de l'apport quotidien via l'alimentation, l'inhalation et l'eau de boisson (**Fig. 6**) (World Health Organisation 2001). Lorsque l'uranium a atteint la circulation générale, la distribution dans les tissus cibles est très rapide : en effet, dans les 20 minutes qui suivent une injection, 30 % de l'uranium a atteint le squelette de la souris, autant ont rejoint le rein, puis ces valeurs se stabilisent autour de 16 et 18 % respectivement à 24 h (Durbin 1997). Ces deux organes constituent les organes cibles majeurs fixant l'uranium. Dans la littérature, la part de l'uranium circulant se fixant dans le squelette varie de 2,5 à 42 % en fonction de l'étude, de l'espèce, du temps d'observation et du type d'uranium (**Tab. 3**). Cependant, le squelette reste toujours l'organe principal de stockage de l'uranium sur le long terme, et le rein, un organe cible majeur à court terme. On estime qu'en moyenne, l'os humain retient 20 à 25 % de l'uranium circulant (Igarashi et al. 1987; World Health Organization 2012; Yue et al. 2018) et 25 % se fixent dans les autres tissus mous comme le rein et le foie (Durbin 1997; Pellmar et al. 1999; Paquet et al. 2006). Le cerveau semble accumuler l'uranium sur le long terme en fonction de la dose et de la concentration d'intoxication. En effet, la présence d'uranium dans le cerveau après environ un an d'intoxication a été détectée chez des rats contaminés via l'eau de boisson contenant 40 mg/L d'uranium (Paquet et al. 2006). Dans une précédente étude, cette accumulation n'avait pas été observée chez le rat après trois mois d'exposition à 120 mg/L mais avait pu l'être pour ceux exposés à hauteur de 600 mg/L (Gilman et al. 1998a).

Dans le cas d'une exposition par voie cutanée ou par blessure, l'uranium présente une distribution particulière. En effet, des rats implantés avec des pastilles d'uranium appauvri dans les muscles ont présentés une accumulation d'uranium classiquement rénale et osseuse mais les données ont également révélées la présence d'uranium dans la rate et dans les nodules lymphatiques à proximité de l'implant (Pellmar et al. 1999). Cette présence y est alors expliquée par les auteurs par une infiltration de macrophages près de la blessure qui pourraient internaliser l'uranium et permettre ainsi son accumulation dans ces organes.

Enfin, des données indiquent que le sexe des animaux influence la rétention de l'uranium dans l'organisme. En effet, une fixation moins importante de 80 % dans le rein et de 24 % dans les os des femelles lapins par rapports aux mâles intoxiquées chroniquement par l'eau de boisson a été observée. La même tendance a été décrite chez le rat (A. P. Gilman et al., 1998; A. P. Gilman, Moss, et al., 1998; A. P. Gilman, Villeneuve, et al., 1998).

Dans le tissu osseux, l'uranium se fixe de façon hétérogène. Plusieurs études montrent que l'uranium est présent préférentiellement en surface dans les premières heures d'exposition. Il a également une forte affinité pour les zones de croissance osseuse, comme les métaphyses, les plaques de croissance ou les zones à proximité des vaisseaux sanguins (**Fig. 4-5**) (Priest et al. 1982; Ellender et al. 1995; Bourgeois et al. 2015). Cette répartition n'est pas figée puisqu'au cours du temps, l'accumulation de l'uranium est présente plus en profondeur (**Fig. 4**) suggérant une remobilisation de l'uranium par les ostéoclastes puis une refixation, probablement au cours de la minéralisation (Priest et al. 1982; Ellender et al. 1995).

Tableau 3 Distribution de l'uranium dans les principaux organes dans différentes études.
(NC : Non Communiqué)

Isotopie et complexation de l'uranium	Espèce	Exposition	Temps de mesure post-exposition	% de la fraction sérique ou injectée :			Source
				os	rein	foie	
^{233}U : nitrate d'uranyle	Souris	iv	24 h	16 %	18 %	NC	Durbin 1997
^{233}U : nitrate d'uranyle	Souris	ip	24 h	13 %	5 %	0,2 %	Ellender 1995
			28 jours	5 %	0,16 %	0,05 %	
			448 jours	2,5 %	0,11 %	0,01 %	
^{233}U : nitrate d'uranyle	Rat	Per os	7 jours	28 %	2,9 %	0,6 %	Sullivan 1986
^{233}U : citrate d'uranyle	Rat	iv	24 h	30 %	7 %	0,3 %	Priest 1982
			30 jours	20 %	0,6 %	0,08 %	
Uranium naturel	Homme	Exposition naturelle	-	20 %	0,3 %	1 %	Igarashi 1987
Uranium naturel : Nitrate d'uranyle	Rat	Per os	8 h	42 %	53 %	NC	La Touche 1987
			48 h	42 %	35 %	NC	
			10 jours	31 %	9 %	NC	

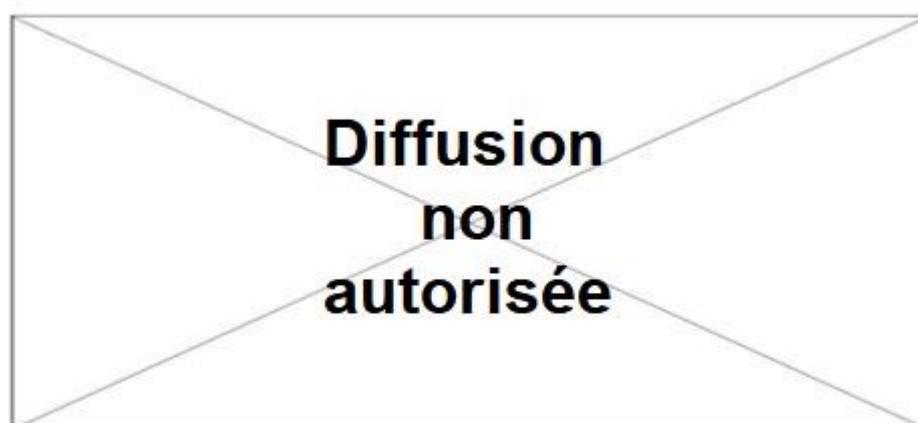


Figure 4 Autoradiographie de fémur de souris à 1 et 224 jours post-injection d' ^{233}U citrate.
A 24 h post-injection, la distribution de l'uranium est inégale, avec une plus forte présence en surface de l'os, dans le périoste et dans l'endoste. Après 224 jours, peu d'activité est détectée dans la moelle et on observe la présence d'uranium enfoui sous la surface de l'os. Figures 10 et 11 de l'article (Ellender et al, 1995)

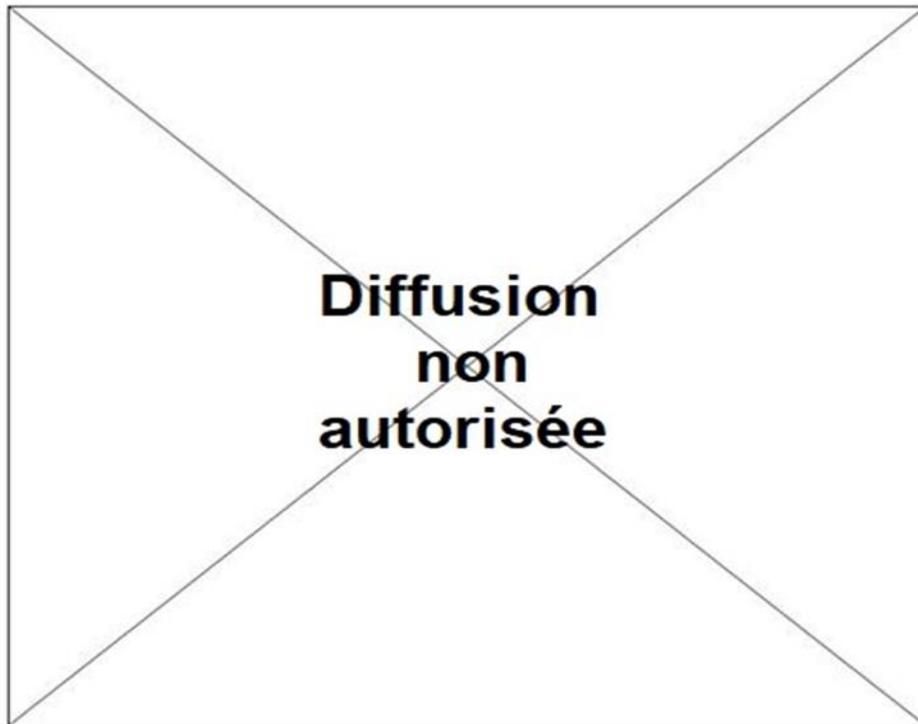


Figure 5 Distribution élémentaire et intensité de la quantité d'uranium (jaune) et du calcium (gris) obtenue par micro-fluorescence à rayons X par radiation synchrotron (SR- μ XRF)

(a) à la bordure de l'os cortical et autour des vaisseaux sanguins (section de 8 μ m d'épaisseur) et (b) le long de travées osseuses de rats ayant été injectés en iv avec 5mg/kg de nitrate d'uranyle naturel et sacrifié 24 h après. Figure 2 de l'article (Bourgeois et al., 2015)

C. METABOLISME

L'uranium peut être modifié par son environnement chimique et changer d'état d'oxydation ou modifier sa complexation. De plus, il a été montré qu'une exposition chronique à l'uranium peut modifier le métabolisme d'autres molécules comme le paracétamol (Guéguen et al. 2007) ou la vitamine D (Tissandie et al. 2006). En effet, le nitrate d'uranyle administré de façon chronique chez le rat modifie l'activité de cytochromes ce qui laisse penser que l'uranium peut interférer avec le métabolisme d'un grand nombre de xénobiotiques (Gueguen et al. 2014).

D. ÉLIMINATION

Une fois passé dans la circulation sanguine, la majorité de l'uranium sanguin est éliminée dans les urines dont 50 % dans les premières 24 h (Leggett et Pellmar 2003). Les 50 % restant sont retenus dans les organes cibles comme l'os, où l'uranium présente une demi-vie biologique variant de 40 à 200 jours (Priest et al. 1982; Ellender et al. 1995; Souidi et al. 2009; Larivière

et al. 2013). Une fois piégé dans l'os, l'uranium est relargué progressivement dans la circulation générale grâce à l'action des ostéoclastes qui solubilisent la matrice osseuse contenant l'uranium. Ce dernier peut ainsi être soit éliminé dans les urines, soit redistribué ailleurs dans l'os ou dans un autre organe.

E. LE TRANSPORT SANGUIN DE L'URANIUM

Lorsque l'uranium atteint la circulation sanguine, il se complexe dans le sang sous différentes formes, majoritairement avec des carbonates (60 %) ou des protéines (30 %) alors que le reste est adsorbé sur les globules rouges (Montavon et al., 2009). Parmi les protéines sériques, les ions uranyles possèdent une grande affinité pour l'albumine et la transferrine (Montavon et al. 2009). La transferrine est une protéine qui fixe de façon physiologique deux fers et la fixation de ces ions engendre une modification de sa conformation permettant sa fixation à son récepteur, celui-ci étant ensuite internalisé. La transferrine peut également fixer deux ions uranyles. Une hypothèse est donc née de ces observations proposant que l'uranium soit transporté par la transferrine dans le sang et les tissus et internalisé par ce biais. Cependant, la fixation de ces deux ions uranyles engendre une modification conformationnelle de la transferrine non compatible avec sa fixation à son récepteur, rejetant ainsi la théorie selon laquelle l'uranium serait internalisé dans la cellule via la transferrine et son récepteur (Vidaud et al. 2007). En 2013, une autre étude a montré une affinité plus importante de la fétuine-A, une protéine sérique bovine, analogue à l'alpha-2-HS humaine, avec l'uranium (trois ions uranyle par fétuine, Kd de 30 nM contre 10-20 μ M pour l'albumine et 2,8 μ M pour la transferrine) (Basset et al. 2013). Cette protéine, bien que présente en quantité moindre dans le sang par rapport à l'albumine et à la transferrine, fixerait ainsi 80 % de l'uranium contre 7 % pour l'albumine et 2 % pour la transferrine (Basset et al. 2013). La fétuine est d'autant plus intéressante qu'elle joue un rôle de contrôle de la minéralisation osseuse en empêchant notamment la précipitation du phosphate de calcium en conditions saturante et donc la formation de calcifications ectopiques (capacité conservée *in vitro* lorsque l'uranium y est fixé)(Basset et al. 2013). Elle est également incluse en grande quantité dans la matrice osseuse (Schinke et al. 1996; Jahnen-Dechent et al. 2011). Il se peut donc que l'uranium transporté soit lié à cette protéine dans le sang.

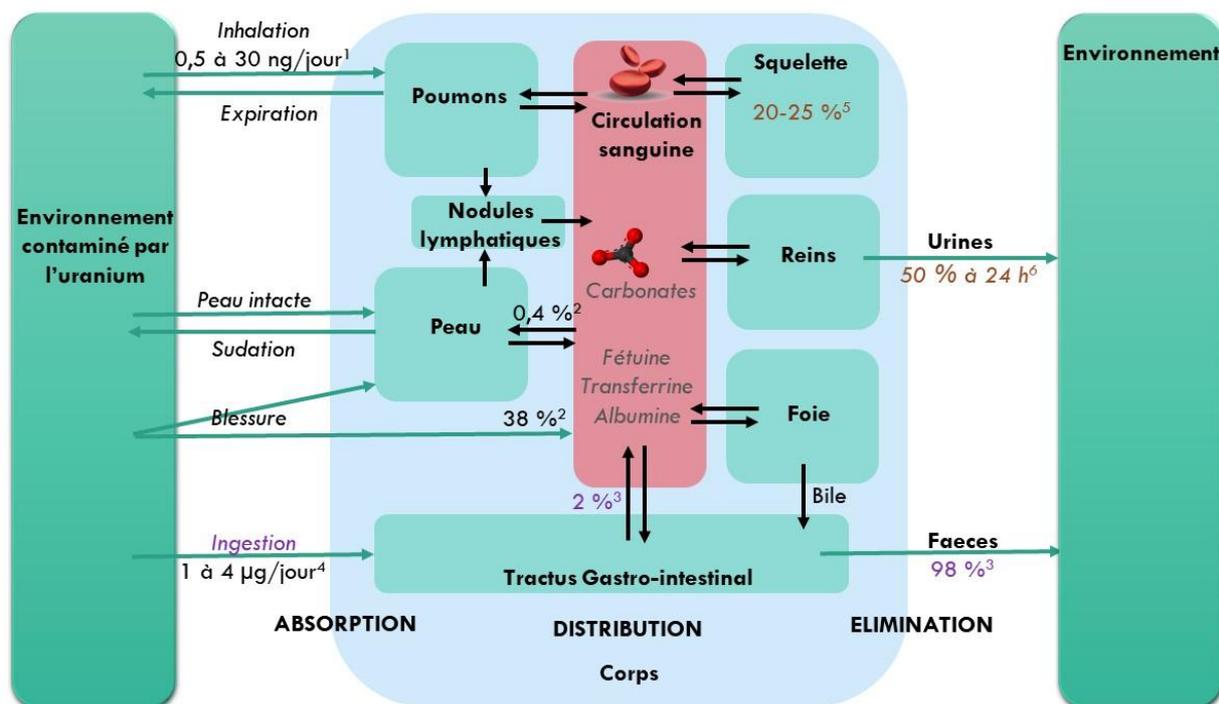


Figure 6 Biocinétique de l'uranium à travers ses principaux organes cibles.

Schéma inspiré et modifié de Yue et al 2018. ¹UNSCEAR, 2000 ; ²Yue et al, 2018 (données sur le rat) ; ³Leggett et Harrison, 1995, Yue et al 2018. ; ⁴World Health Organization, 2012 ; ⁵Igarashi et al, 1987 ; World Health Organization, 2012 ; ⁶Leggett et al, 2003

La biocinétique de l'uranium est donc très complexe (**Fig. 6**) et malgré des modèles pharmacocinétiques établis, ceux-ci ne semblent pas suffisants pour représenter toute la complexité de la cinétique de l'uranium selon les différents modes de contaminations et les adaptations éventuelles de l'organisme en cas de contamination chronique. En effet, une étude souligne qu'une ingestion chronique conduit à un profil cinétique irrégulier présentant des phases de pics d'élimination ou d'accumulation de l'uranium au cours du temps (Paquet et al. 2006). En conséquence, après une phase d'absorption, de distribution et d'élimination très rapide de la majorité de l'uranium, la fraction retenue dans les organes est éliminée lentement et de façon irrégulière. De plus, cette cinétique particulière implique une longue rétention d'uranium dans les os, même dans le cas d'une intoxication aiguë, qui est susceptible de nuire aux cellules osseuses sur le long terme. Le chapitre suivant décrit donc le tissu osseux et son fonctionnement.

CHAPITRE II : LE TISSU OSSEUX

I. GÉNÉRALITÉS

A. ORGANISATION

Le corps humain est composé de 206 os à l'âge adulte permettant le soutien de l'appareil locomoteur. L'os est un tissu solide mais léger et composé d'une matrice extracellulaire minérale et organique. On distingue plusieurs types d'os : les os longs, les os courts et les os plats. Les os longs, comme le fémur ou le tibia, sont décomposés en trois parties : une partie allongée centrale que l'on appelle la diaphyse, et ses extrémités, plus volumineuses, appelées les épiphyses (**Fig. 7**). On retrouve les métaphyses à l'interface de ces deux parties. La diaphyse renferme la cavité médullaire qui abrite la moelle osseuse circulant autour des travées osseuses de l'os trabéculaire (également appelé os spongieux). L'os compact (aussi appelé os lamellaire ou os cortical), plus résistant et plus dense que l'os spongieux, est lui-même tapissé à l'extérieur d'une fine membrane vascularisée nommée périoste. Les épiphyses sont composées d'os spongieux recouvert de cartilage. Les os courts (carpes, tarses...) et les os plats (sternum, clavicules...) sont composés d'os spongieux recouverts d'os compact mais sont dépourvus de cavité médullaire.

1. L'os compact

Comme son nom l'indique, l'os compact est le plus dense et constitue une réserve importante de minéraux pour l'organisme. Il est organisé en ostéons, des structures cylindriques concentriques orientées parallèlement à l'axe de la diaphyse (**Fig. 7**). Au centre de chaque ostéon, le canal de Havers, plus ou moins ouvert selon les ostéons, regroupe les vaisseaux sanguins, les vaisseaux lymphatiques et des nerfs qui permettent la vascularisation et l'innervation du tissu osseux. Des lamelles successives de matrices osseuses concentriques se succèdent et renferment le réseau lacuno-canaliculaire, lequel s'est formé autour des ostéocytes.

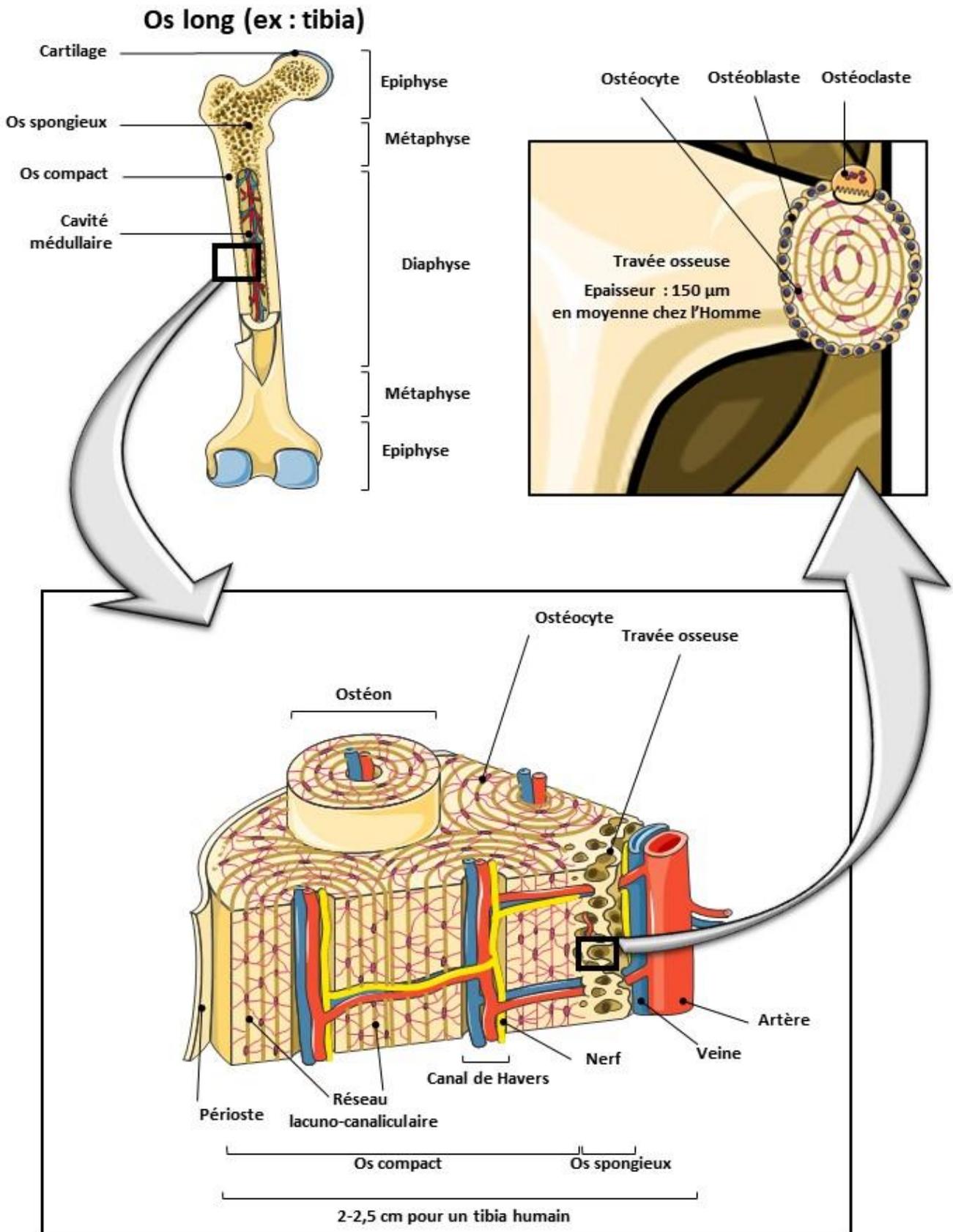


Figure 7 Structure multi-échelle du tissu osseux.
Inspiré du Larousse. Utilisation des images Servier.

2. L'os spongieux

L'os spongieux est recouvert par l'os compact. Il est constitué de travées osseuses dont la structure lamellaire est assez similaire à un ostéon fermé, sans canal central (**Fig. 7**). Les ostéoblastes recouvrent les travées et c'est aussi le lieu de positionnement des ostéoclastes en cas de résorption. La moelle rouge, qui constitue le siège de l'hématopoïèse, circule autour des travées osseuses dans l'os spongieux des épiphyses et des os plats ou courts. La cavité médullaire des os longs est constituée d'os spongieux entouré de moelle jaune, dont la composition est plus riche en tissu adipeux. Cette structure spongieuse permet une très grande surface d'échange avec le système circulatoire et facilite la mobilisation rapide de minéraux.

B. FONCTIONS DU TISSU OSSEUX

Le squelette permet le maintien des muscles et de l'organisme. Les os de la cage thoracique, le crâne et les vertèbres ont un rôle de protection des organes vitaux et du système nerveux central contre les chocs. Ce rôle de protection est assuré grâce à l'assemblage des différentes structures de l'os qui lui donne à la fois une solidité grâce à l'os cortical, mais aussi une légèreté et une élasticité grâce à l'os spongieux. Ces caractéristiques le rendent capable de résister à des contraintes mécaniques tout en évitant la fracture. Une modification de cette structure engendre des maladies qui vont avoir pour conséquences des fractures plus fréquentes, que ce soit lorsque la densité osseuse est trop élevée (ex : ostéopétrose) ou dégradée (ex : ostéoporose).

L'os est un organe essentiel pour l'homéostasie phosphocalcique. Le squelette représente presque 99 % du calcium et 80 % du phosphore de notre organisme. Ces minéraux sont vitaux pour de nombreux mécanismes cellulaires. Enfin, l'os est le siège de l'hématopoïèse puisque les cellules sanguines telles que les hématies, les plaquettes et les cellules immunitaires sont fabriquées en son sein. La forte vascularisation du tissu osseux permet le passage de ces cellules vers la circulation sanguine.

C. LA MATRICE OSSEUSE

Malgré une pluralité de structures et d'organisations, la matrice osseuse qui constitue les os reste la même dans tout le squelette. Elle est composée d'une phase minérale (70 %) et d'une phase organique (30 %) (Boskey 2015). La matrice minérale est formée de cristaux phosphocalciques d'hydroxyapatite de formule $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, dont le ratio molaire de Ca/P est de 1,7 (avec un rapport de masse de 2,2). On peut y retrouver également du sodium, du magnésium, des carbonates et du potassium. Ces cristaux se déposent sur les fibres de collagènes qui constituent 85 à 90 % de la phase organique (collagène I à plus de 95 %, collagène V pour environ 5 % et du collagène III, X et XIII)(Peter G. Bullough 2010). Le collagène I est un collagène fibrillaire : il est organisé en faisceau de fibres collagéniques, qui sont elles-mêmes constituées de fibrilles composées de polypeptides de collagène organisés en triple hélice (**Fig. 8**). Ce collagène I est synthétisé principalement par les ostéoblastes sous forme de procollagène dont les extrémités C-terminales et N-terminales sont ensuite clivées par des protéases avant de pouvoir s'assembler en triple-hélices (Kane et Ma 2013). La phase organique comprend aussi les cellules osseuses et des protéines non collagéniques (ostéocalcine, ostéopontine, ostéonectine, sialoprotéines osseuses, protéoglycanes, fibronectine, protéases, phosphatase alcaline...). Malgré leur faible abondance dans la matrice, ces protéines non-collagéniques sont importantes pour la physiologie de l'os (Gehron Robey 2008; Bouleftour et al. 2016). Parmi elles, on retrouve les SIBLINGs (Small Integrin-Binding Ligands with N-linked Glycosylation) dont l'ostéopontine, DMP1 et la BSP font partie. Ces protéines présentent une séquence RGD (Arginine-Glycine-Acide aspartique) qui permet l'attachement des cellules via la reconnaissance des intégrines. Elles possèdent également un motif ASARM (Acidic Serine-Aspartate Rich MEPE associated) (à l'exception de la BSP) qui favorise la fixation au minéral et qui est impliqué dans l'inhibition de la minéralisation (Bouleftour et al. 2016).



Figure 8 Organisation du collagène fibrillaire dans le tissu osseux.

L'os est composé de fibres de collagènes triple hélices renforcées par les nanocristaux d'hydroxyapatite en motifs semi-réguliers et d'autres composants tels que les protéines minoritaires et les facteurs de croissances. Le collagène minéralisé est organisé en fibrilles, qui se combinent en fibres de quelques microns de diamètres et longues de plusieurs millimètres. Dans l'os trabéculaire, les fibres minéralisées sont semi-organisées alors que dans l'os cortical, les fibres d'une lamelle d'ostéon sont alignées. Figure 1 de l'article (Kane and Ma, 2013)

II. LES CELLULES OSSEUSES

A. LES OSTÉOCLASTES

Les ostéoclastes (OCs) permettent la dégradation de l'os âgé ou endommagé en conditions physiologiques, participant ainsi à son renouvellement. Ces cellules de 50 à 100 μm *in vivo* peuvent atteindre une taille de l'échelle du millimètre *in vitro*. Elles ont une durée de vie de quelques jours seulement et peuvent être mobiles (Jurdic 2009). Ce sont des cellules polarisées dont la zone de contact avec la matrice forme alors une bordure plissée qui est scellée de façon étanche en périphérie appelée ceinture de podosomes. Cette ceinture formée d'actine et de protéines d'adhésions (Vinculine, Paxilline, Dynamine, Intégrines...) délimite une lacune de résorption aussi nommée lacune de Howship (Uehara et al. 2018). Pour résorber la matrice osseuse, les OCs acidifient ce compartiment de résorption en sécrétant des protons grâce à la V-ATPase. Ils sécrètent également des enzymes de dégradation de la

matrice comme la cathepsine K (collagénase) ou les métalloprotéases telles que la Phosphatase Acide Tartrate Résistante (TRAP) (Uehara et al. 2018) (**Fig. 9**).



Figure 9 La résorption osseuse par les ostéoclastes.

L'ostéoclaste est une cellule polarisée. A la surface de l'os, la ceinture de podosomes délimite la bordure en brosse des ostéoclastes où la résorption osseuse a lieu. La bordure en forme de brosse résulte du trafic des endosomes. Des protons sont sécrétés grâce à la V-ATPase dans la lacune de résorption, favorisant la dissolution du minéral. Les protéases sécrétées dans la lacune permettent la dégradation de la matrice organique. Simultanément, les produits de dégradation sont récupérés par les OCs et relargués par transcytose vers le domaine fonctionnel de sécrétion, à l'autre pôle de la cellule. Figure 1 de l'article (Georgess et al. 2014)

1. Modèles de résorption *in vitro*

Pour étudier l'impact de xénobiotiques, de toxiques ou de modifications génétiques sur la fonction des ostéoclastes, il existe plusieurs modèles de résorption *in vitro*. Pour cela, on utilise généralement des ostéoclastes primaires ou issus de lignées comme la lignée murine RAW 264.7 de monocytes/macrophages (Raschke et al. 1978) qui se différencie en 3 à 5 jours en ostéoclastes sous l'action de RANK-L exogène. Ces cellules sont cultivées sur des supports mimant la matrice osseuse. Ainsi, la dentine, l'os bovin ou l'ivoire taillés en fines lamelles sont largement utilisés. Après avoir cultivés les OCs sur ces lamelles, les cellules sont enlevées puis la résorption est généralement visualisée par une coloration au bleu de Coomassie permettant

de distinguer et de quantifier les zones résorbées. Il existe également des modèles commerciaux Osteoassay™ de plaques de culture dont le fond est recouvert d'un matériau minéral résorbable. Ces matrices sont plus fines, plus reproductibles et les zones de résorption ne nécessitent pas de coloration pour la visualisation. Cependant, elles ne présentent pas de composants organiques. Plus récemment, il a été montré que l'on peut faire synthétiser *in vitro* par des OBs des matrices qui, une fois décellularisées, peuvent être utilisées pour étudier la résorption (Lutter et al. 2010).

B. LES OSTÉOBLASTES

Les ostéoblastes (OBs) sont des cellules mononuclées de 30 à 50 µm, de forme cuboïde et que l'on retrouve alignées en surface de l'os ostéoïde (os nouvellement formé, non minéralisé). Les OBs ont une durée de vie estimée à 3 mois chez l'homme et de 10 à 20 jours chez la souris (Rocheffort et al. 2010). Ils jouent un rôle majeur dans la synthèse de la matrice osseuse à travers la production et la sécrétion de collagène I et la minéralisation de la matrice ostéoïde nouvellement formée (Eriksen 2010). Au cours de la minéralisation, ces cellules peuvent avoir des destins différents : alors que 60 à 80 % d'entre elles entrent en apoptose, 5 à 20 % s'emmurent progressivement dans la matrice néosynthétisée et se différencient en ostéocytes. Les autres restent en surface pour devenir des cellules bordantes séparant les travées osseuses de la zone médullaire (Dallas et Bonewald 2010; Chen et al. 2018).

Les OBs dérivent de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses (MSC) sous l'activation du facteur de transcription RUNX2 qui initie l'expression de protéines impliquées dans la synthèse osseuse (Lest et al. 2007). De nombreuses voies de signalisation entrent aussi en jeu dans la différenciation ostéoblastique comme la voie Wnt et Hedgehog (Hh) qui favorisent la différenciation ostéoblastique et bloquent la voie chondrogénique (Rodda 2006). La voie Wnt joue un rôle essentiel pour la survie des OBs, la minéralisation et stimule l'expression de RUNX2 (Almeida et al. 2005; Gaur et al. 2005; Baron et Kneissel 2013). Les ostéoblastes expriment alors des gènes (**Tab. 4**) codant pour des enzymes impliquées dans la synthèse de la matrice osseuse comme l'ALP (Phosphatase Alcaline), ainsi que des protéines entrant dans la composition de la matrice comme le collagène I (Coll1α), la sialoprotéine osseuse (BSP), l'ostéocalcine (OCN) et l'ostéopontine (OPN)(Chen et al. 2018).

Tableau 4 Principaux marqueurs ostéoblastiques.*Adapté de (Chen et al., 2018)*

Nom(s) de la protéine	Nom(s) du gène	Code UniProtKB	Rôle dans l'os
Coll1α : collagène 1 alpha	Humain : COL1A1 Murin : Col1a1	P02452 P11087	Impliqué dans la synthèse de la matrice organique, protéine de la matrice organique osseuse
ALP ou TNAP : Phosphatase alcaline	Humain : ALPL Murin : Alpl ou Akp2	P05186 P09242	Marqueur de l'ostéogénèse précoce, régule le transport et la génération du phosphate, favorise la minéralisation de la matrice
RUNX2 : Runt-related transcription factor 2	Humain : RUNX2 ou OSF2 Murin : Runx2 ou Osf2	Q13950 Q08775	Facteur de transcription majeur impliqué dans la différenciation ostéoblastique et est nécessaire à l'ostéogénèse
BSP ou BSP2 : Sialoprotéine osseuse	Humain : IBSP Murin : Ibsp	P21815 Q61711	Se lie à l'hydroxyapatite et favorise la minéralisation de la matrice, protéine de la matrice organique osseuse
OPN : Ostéopontine	Humain : SPP1 ou OPN Murin : Spp1	P10451 P10923	Régule la minéralisation. Protéine de la matrice organique osseuse
OCN : Ostéocalcine	Humain : BGLAP Murin : Bglap	P02818 P86546	Se lie à l'hydroxyapatite. Marqueur de l'ostéoblaste mature, favorise la minéralisation et constitue 1 à 2 % des protéines osseuses.

C. LES OSTÉOCYTES

Au cours du processus de minéralisation par les ostéoblastes, une partie de ces derniers s'emmurent dans la matrice qu'ils viennent de synthétiser et se différencient alors peu à peu en ostéocytes. Les ostéocytes représentent la majorité des cellules osseuses puisqu'elles constituent 95 % des cellules de l'os avec une densité de 31900 à 93200 cellules/mm³ dans l'os bovin ou murin (Mullender et al. 1996; Rochefort et al. 2010). Chez l'homme, ils ont une durée de vie qui atteint parfois plusieurs décennies. Leur rôle a longtemps été inconnu ou négligé et ce n'est que depuis une vingtaine d'année que l'on s'intéresse vraiment à ces cellules. De plus, il est difficile d'isoler les OSTs primaires en nombre suffisant pour de nombreux types d'analyses et pendant longtemps, il n'y avait pas de lignées cellulaires disponibles ni de promoteurs spécifiques des ostéocytes connus afin d'utiliser des approches transgéniques. Le laboratoire du Pr. Linda Bonewald, qui a créé des lignées d'ostéocytes (Kato et al. 2001, 2010) à la fin des années 90, a largement contribué à faciliter leur étude. Depuis,

de nombreux travaux ont mis en évidence le rôle de ces cellules dans l'orchestration du remodelage osseux (Bonewald 2011; Komori 2013; O'Brien et al. 2013; Schaffler et al. 2014; Chen et al. 2015). En effet, les ostéocytes sont les principales cellules responsables de la mécano-transduction et dirigent le remodelage via la communication intercellulaire ou la sécrétion de facteurs vers les OBs et les OCs. La décharge (par exemple : l'apesanteur) et donc la diminution de la stimulation mécanique, provoque une perte osseuse chez la souris. En l'absence d'ostéocytes, cet effet n'est pas observé, démontrant bien le rôle des OSTs dans la mécano-transduction (les souris sont injectées avec la toxine diphtérique et expriment le récepteur à la toxine sous le promoteur DMP1 spécifique des OSTs, ce qui permet d'induire une toxicité spécifique sur les OSTs) (Tatsumi et al. 2007). Ces cellules participent également à la régulation du métabolisme du phosphate et du calcium (Dallas et al. 2013).

1. Morphologie

Les OBs changent radicalement de morphologie au cours de leur différenciation en OSTs. Ils perdent 70 % de leur volume (Dallas et al. 2013) et prennent progressivement une morphologie étoilée caractéristique des ostéocytes, reconnaissable à sa ressemblance à un réseau de neurones (**Fig. 10a**). En effet, les OSTs émettent chacun entre 40 et 100 fins prolongements dendritiques (Chen et al. 2015) à travers le réseau lacuno-canaliculaire qu'ils creusent dans la matrice (**Fig. 10c**). Alors que les corps cellulaires des OSTs demeurent dans les lacunes du réseau (autrement appelées ostéoplastes ; 15 à 20 μm de diamètres), leurs dendrites s'étendent dans les canalicules (250 à 300 nm de diamètre) (**Fig. 10b**) (Chen et al., 2015). Ces prolongements sont attachés aux parois des canalicules grâce à des éléments d'attaches (**Fig. 10d**). Les cellules baignent dans un fluide appelé glycocalyx qui communique avec la circulation générale et qui les alimente en oxygène et en nutriments. Les OSTs communiquent avec les autres OSTs environnants ainsi qu'avec les OBs et les OCs en surface grâce à des gap junctions localisées aux extrémités des prolongements. Ces gap junctions permettent un échange direct de petites molécules inférieures à 1 kDa, d'ions ou de seconds messagers comme le glucose, des acides aminés ou des vitamines. Ces jonctions ont aussi un rôle dans le passage de molécules du cytosol des OSTs vers le fluide extra-cellulaire du réseau lacuno-canaliculaire (Chen et al. 2015). Elles sont formées de plusieurs hémi-canaux constitués de 6 monomères de connexines (Cx) à la membrane des cellules (**Fig. 11**). Ceux-ci s'alignent avec les hémi-canaux des cellules voisines pour former des canaux fonctionnels,

fermés à l'état basal. Pour les ostéocytes, la connexine 43 (Cx43), principale connexine exprimée dans l'os, est indispensable à la survie des OSTs. Elle permet, chez les souris la surexprimant, de résister aux modifications osseuses induites par l'âge (perte osseuse induite par l'activation des ostéoclastes et par la réduction de la formation osseuse) (Davis et al., 2018) et elle joue un rôle dans la protection contre le stress oxydatif (Kar et al. 2013). À l'inverse, avec l'âge, l'expression de la Cx43 diminue et une délétion de cette protéine induit l'apoptose des OSTs (Davis et al., 2017). La diminution de Cx43 pourrait également être à l'origine du phénotype osseux dans la maladie de Gaucher (densité osseuse réduite, ostéonécrose et lésions ostéolytiques) (Bondar et al., 2017).



Figure 10 Photographies représentant le réseau ostéocytaire.

*a : Image confocal d'un réseau d'ostéocytes. b-d : photo TEM montrant la lacune ostéocytaire (L), les prolongements ostéocytaires (P) et les canalicules (C). Les ostéocytes (os) sont connectés ensemble ainsi qu'avec les ostéoblastes (ob) en surface. Des éléments d'attache (T) relient les prolongements ostéocytaires à la paroi des canalicules. *: ostéocyte en apoptose. Figure 1 de l'article (Chen et al. 2015)*

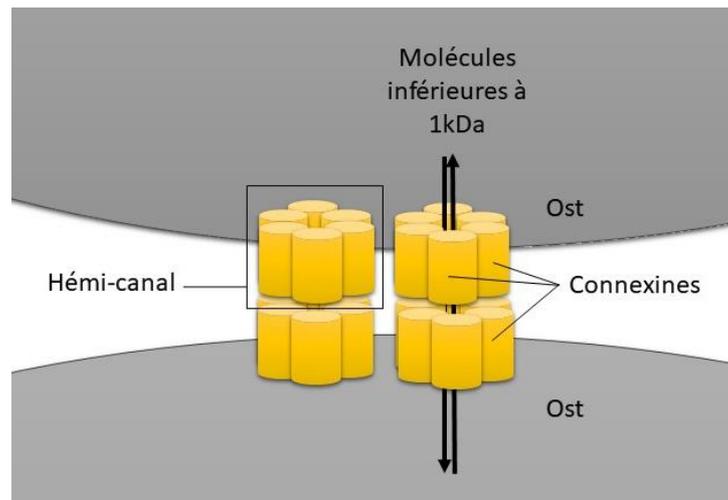


Figure 11 Représentation schématique des hémicanaux.

Les hémicanaux formés de 6 connexines s'alignent avec ceux de la cellule voisine pour former des canaux à travers lesquels de petites molécules inférieures à 1 kDa peuvent circuler d'une cellule à une autre.

2. Mécano-transduction

S'il est clair que les stimuli mécaniques sont intégrés principalement par les ostéocytes, le mécanisme qui permet aux OSTs de ressentir cette charge est moins bien caractérisé. Les OSTs intègrent les signaux de modification de charge par une déformation de la matrice osseuse ou une modification du flux intra-canaliculaire (Bonewald 2013; Chen et al. 2015; Uda et al. 2017). Ces mouvements entraînent une déformation des cellules qui pourraient ainsi prendre part à la transduction du signal (Ajubi et al. 1996; Pavalko et al. 2003). Des études indiquent que les intégrines participent dans la mécano-sensation et sont connectées au cytosquelette de la cellule et à la matrice extra-cellulaire. Elles interagissent en effet avec la Cx43 et le flux intra-canaliculaire modifie la signalisation en aval des intégrines en déclenchant l'ouverture des hémicanaux des ostéocytes (Batra et al. 2012). On observe alors une rapide augmentation intra-cellulaire de la concentration de calcium, d' Adénosine triphosphate (ATP) et d'oxyde nitrique (NO) (Uda et al. 2017), suivie d'un relargage de prostaglandines (PGs) dont la synthèse est également favorisée par les mouvements du fluide (Ajubi et al. 1996; Cherian et al. 2003). Les PGs agissent de façon autocrine puisqu'elles sont nécessaires avec l'ATP et le NO à l'augmentation du calcium intra-cellulaire des OSTs, cette dernière étant elle-même indispensable à la mécano-transduction (Lu et al. 2012; Jing et al. 2014). Les PGs induisent aussi l'élévation du nombre de gap junction fonctionnelles et l'expression de Cx43 (Cherian et

al. 2003). Ces mécanismes conduisent ensuite à la synthèse de molécules régulatrices du remodelage (Uda et al. 2017). En effet, la charge mécanique déclenche la synthèse de protéines telle que DMP1 (Gluhak-Heinrich et al. 2003) ou E11 (Zhang et al. 2006). Au contraire, la décharge mécanique favorise la synthèse de sclérostine (Lin et al. 2009) et RANK-L (Xiong et al. 2011). De plus, une récente étude a démontré la colocalisation de canaux calcium CaV3.2-1, de la pannexine et du récepteur P2X7R à proximité d'intégrines β 3, suggérant l'existence de complexes spécifiques de mécano-transduction puisque ces protéines sont impliquées dans les mouvements calciques et d'ATP (Cabahug-Zuckerman et al. 2018). Enfin, le relargage de lysosomes contenant des molécules régulatrices comme RANK-L, OPG et la sclérostine par une lignée d'ostéocytes est diminué après le blocage de la signalisation calcique par la néomycine (Morrell et al. 2018). Les variations de calcium intracellulaire sont donc importantes pour l'encodage des signaux mécaniques et la régulation du remodelage osseux.

3. Autres rôles des ostéocytes

(a) Homéostasie phospho-calcique

Les OSTs sont les principales cellules productrices de FGF23 (Fibroblast Growth Factor 23) (Ubaidus et al. 2009). Le FGF23 et la Parathormone (PTH) sont des acteurs majeurs de la régulation de l'homéostasie du phosphate (**Fig. 12**). Ce dernier joue un rôle crucial pour l'organisme puisqu'il est indispensable pour de nombreux mécanismes cellulaires, de signalisation, de métabolisme ou pour la minéralisation osseuse. Le FGF23 est sécrété par les ostéocytes dans la circulation générale et agit sur les cellules tubulaires rénales et les glandes parathyroïdes. Dans le rein, le FGF23 inhibe l'activité des transporteurs impliqués dans la réabsorption du phosphate résultant en une phosphaturie et une hypophosphatémie (Chen et al. 2015). Dans la maladie d'hypophosphatémie liée à l'X, une mutation du gène PHEX, dont la fonction est de réguler le FGF23, conduit à une sécrétion excessive de FGF23 par les OSTs. La maladie se manifeste alors par une hypophosphatémie et un rachitisme (Francis et al. 1995). En effet, un excès de FGF23 diminue l'expression d'une hydroxylase requise pour la conversion de la vitamine D en vitamine D active dans le rein (Shimada et al. 2004). Or la vitamine D active est impliquée dans l'absorption du phosphate dans l'intestin (Miyamoto et al. 2005). Ces observations expliquent alors les symptômes d'hypophosphatémie. Enfin, la synthèse de FGF23 par les ostéocytes est stimulée par la vitamine D active, témoignant d'une

boucle de régulation (Dallas et al. 2013). De plus, la vitamine D active favorise la survie ostéocytaire et la minéralisation (Yang et al. 2015; Rolvien et al. 2017). Dans la glande parathyroïde, le FGF23 inhibe l'expression de la PTH. La PTH, dont la synthèse est stimulée dans le cas d'une réduction du calcium sérique, favorise la résorption osseuse des OCs et la production de RANK-L, relarguant ainsi le calcium manquant dans la circulation (Yavropoulou et al. 2017). Lorsqu'elle se fixe sur son récepteur PTHR des ostéocytes, elle stimule la synthèse de FGF23. La PTH et le FGF23 sont donc dans une boucle de feed-back négatif et se régulent mutuellement (Chen et al. 2015).

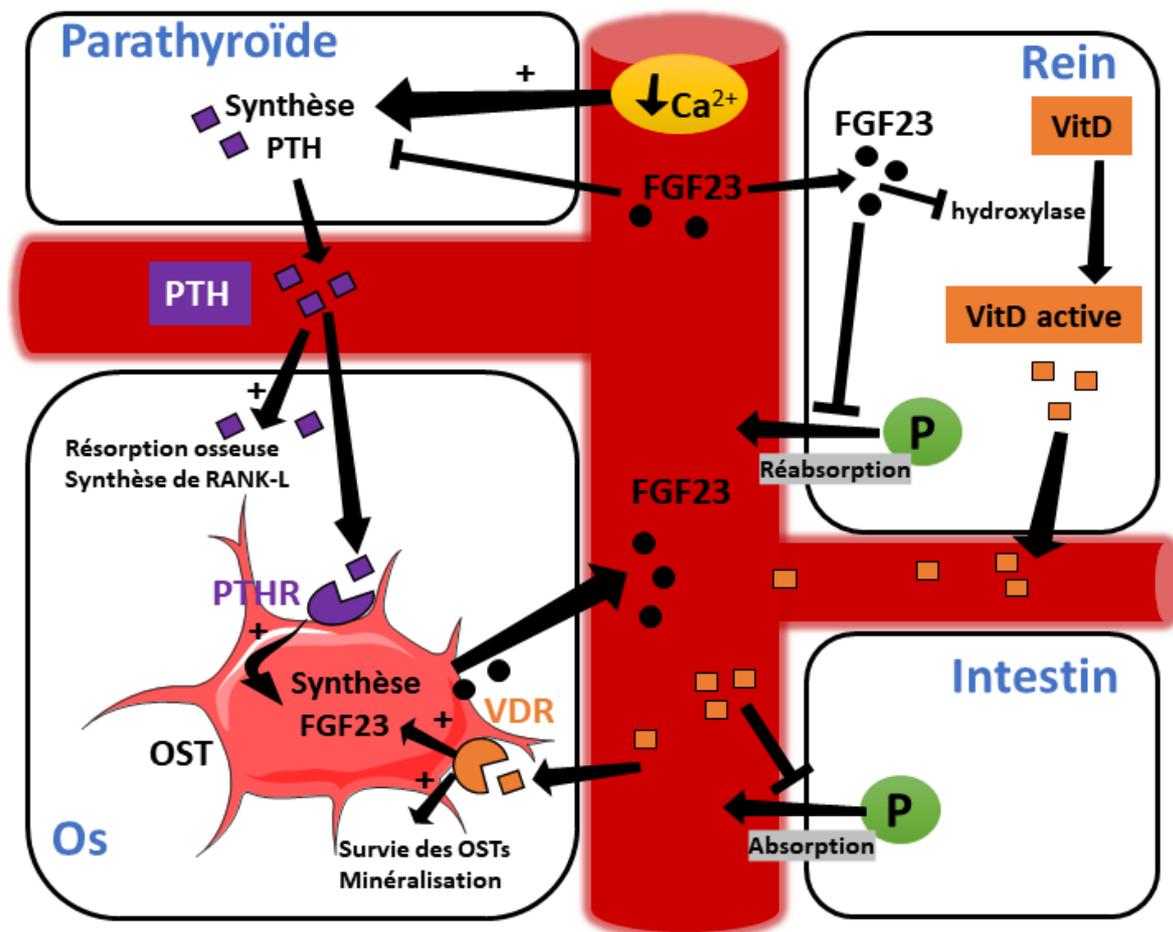


Figure 12 Implication des OSTs dans la régulation du métabolisme du phosphate et du calcium.

Lors de la diminution de la calcémie, la synthèse de PTH favorise la résorption osseuse et la synthèse de RANK-L. La synthèse de la PTH subit alors un rétrocontrôle négatif. La PTH stimule la synthèse de FGF23 par les OSTs en se fixant sur son récepteur PTHR. Le FGF23 inhibe alors la synthèse de la PTH dans les parathyroïdes. Le FGF23, surexprimé dans l'hypophosphatémie liée à l'X inhibe également la réabsorption du phosphate dans le rein et la transformation de la vitamine D en sa forme active. Le FGF23 est donc une boucle de régulation négative avec la Vitamine D. Le FGF23 inhibe la synthèse de vitamine D active ce qui réprime l'activation de la synthèse de FGF23 par les OSTs sous l'action de la vitamine D sur son récepteur (VDR). La vitamine D sous forme active inhibe l'absorption intestinale du phosphate et favorise la survie des ostéocytes et la minéralisation.

(b) Ostéolyse ostéocytaire

Les ostéocytes sont capables d'ostéolyse ostéocytaire. En effet, il a été montré que la MT1-MMP (MT1-Matrix Métalloprotéase) et la MMP1, des métalloprotéases matricielles capables de cliver le collagène I, sont nécessaires à la formation des dendrites des OSTs et à l'acquisition du phénotype ostéocytaire (Holmbeck et al. 2005). De plus, la présence de ces métalloprotéases est observée dans les zones péri-lacunaires et canaliculaires chez la souris (Tang et al. 2012). L'expression d'autres métalloprotéases, MMP2, MMP14, Cathepsine K et TRAP, des protéines plus caractéristiques des OCs sont également exprimées dans les OSTs de souris traitées au TGF- β , un facteur qui favorise la résorption osseuse (Dole et al. 2017) ou chez la souris en période de lactation (Qing et al. 2012). En effet, pendant la lactation, la demande en calcium est fortement accrue (300 à 400 mg de calcium par jour sont produits dans le lait chez la femme). Ce phénomène entraîne une perte osseuse très importante, (1 à 3 % de perte de masse par mois), équivalent au taux annuel de perte après la ménopause (Wysolmerski 2013). Chez la souris, la taille des lacunes ostéocytaires dans les vertèbres et le tibia est alors élargie temporairement pendant cette période et un retour à la taille normale est observé une semaine après sevrage (Qing et al. 2012). Chez la femme, la masse osseuse est complètement rétablie entre six mois et un an après la fin de l'allaitement (Wysolmerski 2013). L'administration de PTH, la restriction en calcium ainsi que l'hypogravité augmentent également la taille de ces lacunes (Wysolmerski 2013). Tous ces résultats confortent la théorie selon laquelle les OSTs participent à la mobilisation du calcium par l'ostéolyse et pourraient avoir un rôle direct dans le maintien de l'homéostasie osseuse et calcique.

4. Différenciation ostéocytaire et marqueurs

Plusieurs études ont montré que la différenciation ostéocytaire est favorisée par la minéralisation de la matrice, la stimulation mécanique, l'hypoxie, l'activité collagénolytique, et certaines molécules exogènes comme l'oncostatine M (Chen et al. 2018). La rigidité de matrice influence aussi la différenciation des OST (Mullen et al. 2013). La différenciation ostéocytaire implique une réorganisation morphologique et des modifications d'expressions géniques : les marqueurs ostéoblastiques diminuent progressivement alors que les marqueurs ostéocytaires augmentent (**Fig. 13, Tab. 5**). Cependant, la population ostéocytaire est hétérogène. Les ostéocytes précoces (ostéocytes ostéoïdes) expriment fortement E11, tandis que les ostéocytes plus matures et plus profondément incorporés dans la matrice produisent

la sclérostine, produit du gène SOST, en grande quantité. E11 est spécifiquement exprimée dans les OSTs dans l'os (Zhang et al. 2006). C'est une protéine membranaire nécessaire à l'élongation des dendrites (Staines et al. 2017) et son expression est dépendante de la minéralisation de la matrice extra-cellulaire (Prideaux et al. 2012). SOST est un inhibiteur de la voie Wnt (voie nécessaire à la minéralisation dans les OBs) synthétisé par les ostéocytes, et constitue un acteur majeur de la régulation du remodelage. Les OSTs expriment d'autres gènes beaucoup plus fortement que les OBs tels que DMP1 (Toyosawa et al. 2001). DMP1 est une SIBLINGs sécrétée par les OSTs dans la matrice extra-cellulaire qui facilite la déposition des cristaux d'hydroxyapatite sur le collagène I (He et George 2004). Le promoteur de DMP1 est largement utilisé pour déléter de façon spécifique des gènes dans les ostéocytes. La délétion de DMP1 chez la souris résulte en un rachitisme similaire à celui des souris KO pour PHEX. En effet, il inhibe la synthèse de FGF23 et joue donc un rôle dans l'homéostasie du phosphate (Martin et al. 2011). PHEX, est une phosphoprotéine essentielle à la minéralisation fortement exprimée par les OSTs. Sa mutation est responsable de l'hypophosphatémie liée à l'X puisque PHEX exerce une activité régulatrice sur la synthèse du FGF23 (Rowe 2012). D'autres protéines sont aussi exprimées très fortement dans les OSTs comme MEPE, une phosphoprotéine clivée par des métalloprotéinase qui libère un motif ASARM, celui-ci étant inhibiteur de la minéralisation. L'expression de MEPE augmente au cours de la différenciation et est plus importante chez les OST matures (Bonewald 2013). Pareillement, le marqueur CD44 est retrouvé plus fortement dans les OSTs que dans les OBs (Rochefort et al. 2010). Cette glycoprotéine transmembranaire favorise l'adhésion cellules-cellules et cellules-matrices (Hughes et al. 1994). Enfin, on retrouve l'expression d'enzymes de dégradation de la matrice tel que MT1-MMP ou MMP13 qui permettent aux ostéocytes de creuser le réseau lacuno-canaliculaire et dont l'activité de clivage du collagène I est nécessaire à la formation des dendrites des OSTs murins (Holmbeck et al. 2005).

Tableau 5 Principaux marqueurs de la différenciation des OSTs.*Adapté de (Chen et al., 2018)*

Nom(s) de la Protéine	Nom(s) du gène	Code UniProtKB	Rôle dans l'os
E11 ou Podoplanine	Humain : PDPN ou GP36 Murin : Pdpn ou Gp38	Q86YL7 Q62011	Protéine membranaire marqueur des ostéocytes précoces, formation des prolongements dendritiques, adhésion
PHEX: Phosphate-regulating neutral endopeptidase	Humain : PHEX ou PEX Murin : Phex, Hyp ou Pex	P78562 P70669	Régulation de l'homéostasie du phosphate, favorise la minéralisation
DMP1 : Dentin Matrix acidic phosphoprotein 1	Humain : DMP1 Murin : Dmp1 ou Dmp	Q13316 O55188	Protéine de la matrice organique, régulation de l'homéostasie du phosphate, favorise la minéralisation
FGF23 : Fibroblast Growth Factor-23	Humain : GF23 ou HYPF Murin : Fgf23	Q9GZV9 Q9EPC2	Régulation du métabolisme du phosphate, régulation de la parathormone et du métabolisme de la vitamine D
SOST : Sclérostine	Humain : SOST Murin : Sost	Q9BQB4 Q99P68	Marqueur des OSTs matures, inhibition de l'ostéoblastogénèse, inhibition de la minéralisation, protéine de la matrice organique
Cx43 ou GJA-1: Connexine 43 ou Gap Junction alpha-1	Humain : GJA1 ou GJAL Murin : Gja1 ou Cxn-43	P17302 P23242	Protéine membranaire qui forme les héli-canaux des gap junctions, communication intercellulaire, survie ostéocytaire, réponse au stimuli mécanique
CD44 :	Humain : CD44 Murin : Cd44	P16070 P15379	Antigène membranaire, médiation des interactions cellule-cellule et cellules-matrice, adhésion cellulaire
MEPE : Matrix Extracellular phosphoglycoprotein	Humain : MEPE Murin : Mepe	Q9NQ76 Q8K4L6	Protéine de la matrice organique, Régulation de la minéralisation et régulation de l'homéostasie du phosphate

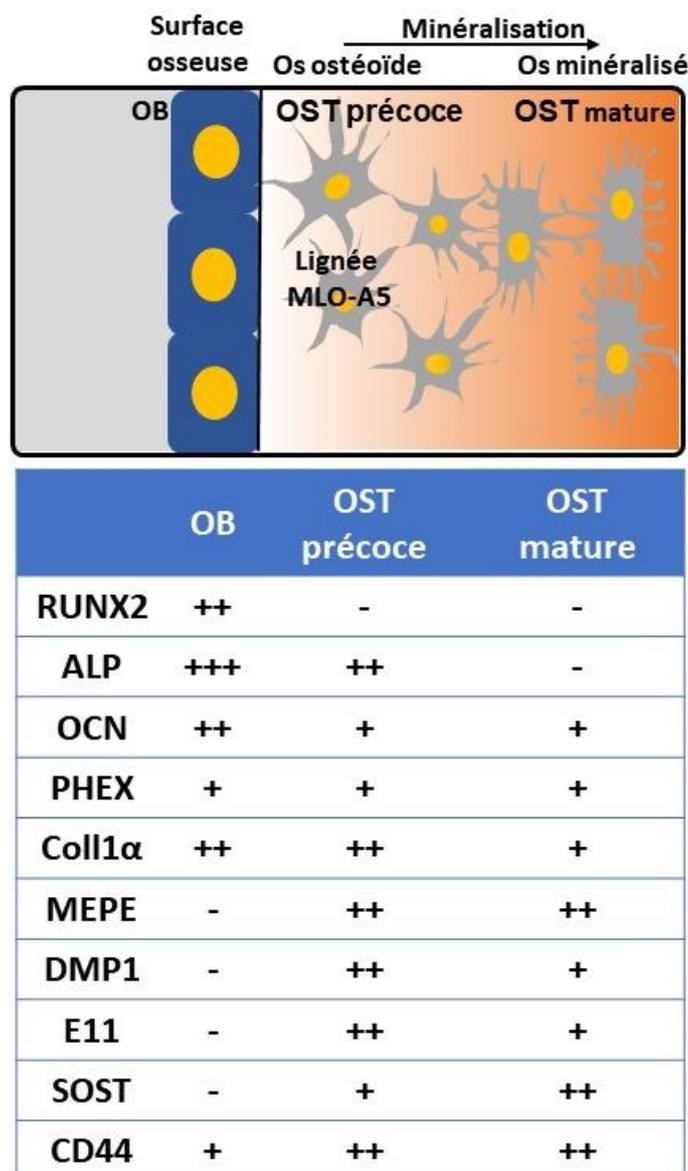


Figure 13 Marqueurs moléculaires de la différenciation ostéocytaire.

- : absent, + : présent. La lignée MLO-A5 modélise le stade précoce de différenciation des OSTs. Adapté de (Dallas and Bonewald, 2010; Kato et al., 2001; Rochefort et al. 2010)

5. Les différents modèles cellulaires

Il existe à ce jour quatre lignées cellulaires d'ostéocytes : les MLO-Y4, les MLO-A5, les IDG-SW3 et les HOP-01-C1.

Le laboratoire du Pr. Linda Bonewald a créé les trois premières. Les plus utilisées parmi ces quatre lignées dans la littérature sont les MLO-Y4 et les MLO-A5 (251 et 47 articles respectivement sur PubMed) (Kato et al. 2001, 2010). Alors que les MLO-Y4 constituent une lignée cellulaire d'ostéocytes terminaux différenciés, les MLO-A5 modélisent un stade intermédiaire entre les ostéoblastes et les ostéocytes : les ostéocytes ostéoides ou ostéocytes

précoces (Bonewald 2013). Après isolation d'ostéocytes primaires de souris, ces cellules ont ensuite été immortalisées grâce à l'antigène-T du virus SV-40 exprimé sous le promoteur de l'ostéocalcine. Elles sont cultivables en milieu liquide comme en culture 3D, un mode de culture qui est plus proche des conditions physiologiques de l'environnement des ostéocytes. Les MLO-A5 sont de grandes cellules (100 μm de diamètre) et minéralisent en 7 jours en l'absence de source extérieure de phosphate. L'ajout de β -glycérophosphate dans le milieu accélère ce processus. Cette minéralisation s'effectue en feuillets de façon similaire aux cellules primaires (et non en nodules comme pour de nombreuses lignées d'OBs), et elle induit la formation des dendrites. Les MLO-A5 expriment les marqueurs des ostéocytes précoces tels qu'une forte expression de l'ALP, de la BSP, du PTH1R (parathyroid hormone type 1 receptor) et de l'ostéocalcine. Elles expriment au cours de la mise en minéralisation les marqueurs ostéocytaires tels que E11 et DMP1 (Kato et al. 2001; Bonewald 2013).

Les MLO-Y4 sont utilisées majoritairement pour étudier la fonction des OSTs. Elles présentent les propriétés ostéocytaires telles que la forte expression de l'OCN, une faible expression de l'ALP, et une forte expression de E11 et de la Cx43. Elles ont une morphologie dendritique (Kato et al. 2010).

La lignée IDG-SW3 tient son nom du croisement entre des ImmortoMouse et des souris DMP-GFP-SW3 (Woo et al. 2011). Il s'agit donc de cellules ostéocytaires isolées à partir d'os long de souris exprimant la GFP sous le promoteur de DMP1 (marqueur sélectif des OSTs). Elles expriment l'antigène T thermolabile et sous un promoteur inductible à l'interféron gamma (INF- γ). Ainsi, en présence d'INF- γ et à 33°C, l'expansion des cellules est facilitée par l'expression de l'antigène T. A 37°C et sans INF- γ , les cellules retrouvent leurs caractéristiques initiales de prolifération et se différencient en milieu de minéralisation d'un stade précoce vers un stade terminal de différenciation. Ces cellules sont capables de minéraliser et expriment alors progressivement le marqueur E11. Elles expriment également MEPE et PHEX comme les OBs tardifs mais aussi SOST et FGF23 comme les OSTs en différenciation terminale. Les HOP-01-C1 sont des cellules humaines isolées d'os spongieux grâce à des digestions par des protéases, et infectées avec le virus SV40 leur permettant alors d'exprimer de façon thermolabile l'antigène T (elles prolifèrent à 34°C et arrêtent de proliférer à 39°C). Ce sont des ostéocytes précoces qui possèdent des prolongements dendritiques, une faible expression de l'ALP, une forte expression de l'OCN et de CD44 (Bodine et al. 1996). Cependant, on retrouve très peu la trace de l'utilisation de cette lignée dans la littérature.

III. LE REMODELAGE OSSEUX

L'os assure des fonctions essentielles à l'organisme et son maintien tout au long de la vie est assuré grâce à sa capacité de se remodeler au gré des contraintes métaboliques et mécaniques en évitant l'accumulation de micro-dommages. L'intégralité du squelette est ainsi renouvelée environ tous les 10 à 20 ans chez l'Homme puisque 4 à 10 % du squelette est renouvelé chaque année (Rochefort et al. 2010). Les OBs, les OCs et les OSTs forment avec les cellules bordantes et l'apport sanguin par les capillaires ce que l'on dénomme l'unité fonctionnelle de remodelage osseux. Le cycle de remodelage débute par une phase d'initiation qui comprend la destruction de la matrice osseuse via le recrutement, la différenciation des OCs et leur activité de destruction de la matrice osseuse (**Fig. 14**). Ensuite vient la phase reverse durant laquelle les OCs meurent et où le recrutement et la différenciation des OBs débute. Enfin, la phase terminale du remodelage (la plus longue) forme la nouvelle matrice osseuse par les ostéoblastes. Un cycle dure environ 200 jours dans l'os spongieux chez l'Homme, dont les trois quarts sont dédiés à la formation osseuse (Kular et al. 2012). L'orchestration de ce remodelage est effectuée par les ostéocytes. De plus, de nombreux autres facteurs influencent la mise en place de ce remodelage.

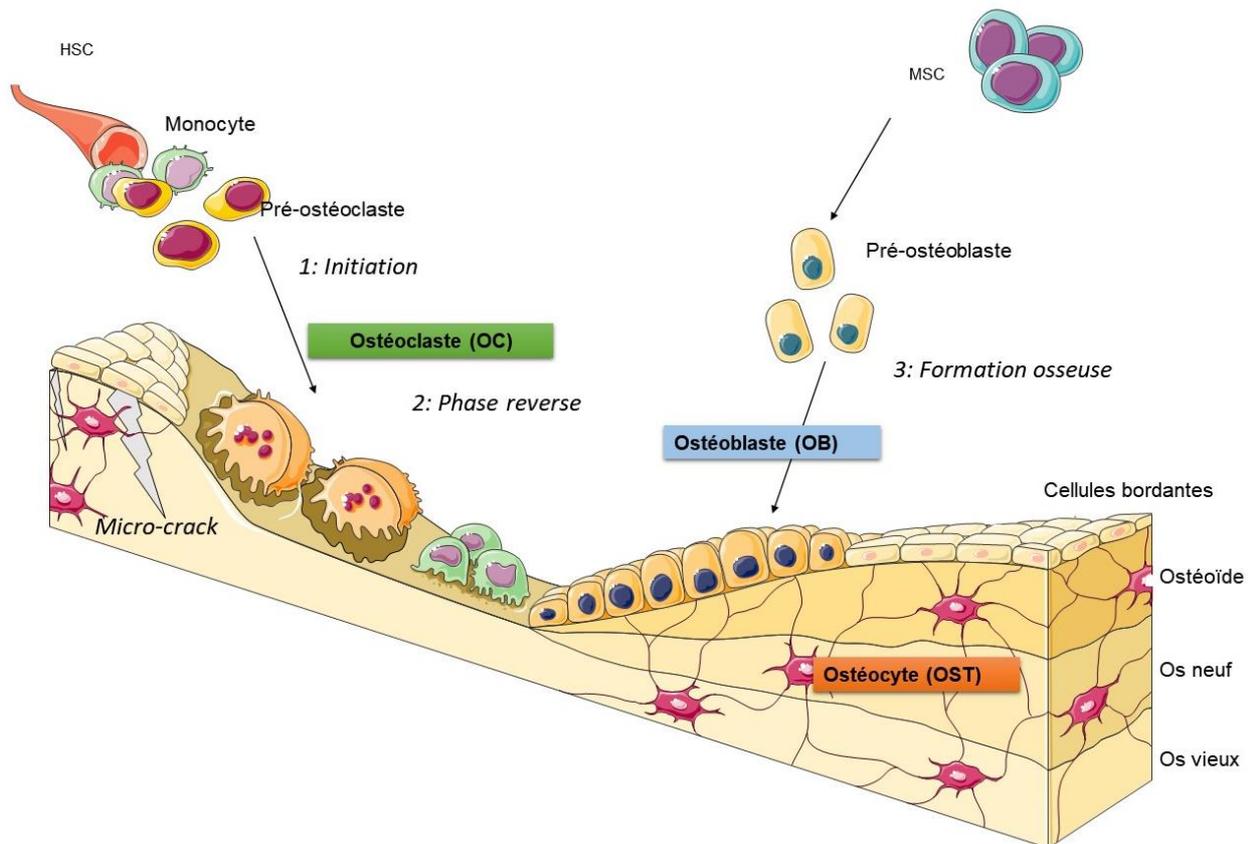


Figure 14 Le remodelage osseux.

1. *Initiation* : Les ostéoclastes se différencient à partir des cellules souches hématopoïétiques. Ils résorbent la matrice osseuse vieillissante ou endommagée par une microfissure ou un micro-crack. 2. *Phase reverse* : Les ostéoclastes meurent et les ostéoblastes se différencient à partir des cellules souches mésenchymateuses. 3 : Les ostéoblastes synthétisent la nouvelle matrice osseuse. Une partie des OBs s'emmure et se différencie en ostéocytes. Utilisation des images Servier Medical ART.

A. DIFFÉRENCIATION OSTÉOCLASTIQUE ET RÉSORPTION

La régulation de la résorption s'effectue par la régulation de la différenciation des OCs. La différenciation en OCs (**Fig. 15**) s'effectue sous le contrôle des ostéoblastes et des ostéocytes qui sécrètent des cytokines comme le ligand du récepteur activateur de NF κ B (RANK-L) et le MCS-F (Macrophage colony-stimulating factor). Ces deux cytokines sont essentielles à la différenciation et se fixent à leur récepteurs RANK et C-Fms, présents à la surface des précurseurs des OCs (Amarasekara et al. 2018). Après une phase de prolifération, les pré-ostéoclastes fusionnent les uns aux autres pour devenir des ostéoclastes plurinucléés (3 noyaux ou plus). La différenciation ostéoclastique est contrôlée par de nombreuses cytokines (**Tab. 6**) comme des cytokines pro (TNF- α , IL-1 β ...) ou anti-inflammatoires (interférons...). L'ostéoprotégérine (OPG) agit comme un leurre pour la fixation de RANK-L au détriment de

son récepteur RANK. RANK-L est également une cytokine clé puisque c'est le ratio RANK-L/OPG qui détermine l'entrée ou non des OCs en différenciation (Amarasekara et al. 2018).



Figure 15 Représentation schématique de la différenciation des ostéoclastes et principaux marqueurs des différentes phases.

Les HSC se différencient en précurseurs ostéoclastiques en présence de PU.1 et des facteurs de transcription MITF activés par la voie de signalisation du M-CSF. La différenciation des précurseurs en cellules mononucléées et multinucléées est ensuite modulée par RANK-L et M-CSF. Atp6v0d2, v-ATPase subunit d2; DC-STAMP, dendritic cell-specific transmembrane protein; HSCs, hematopoietic stem cell; MITF, microphthalmia transcription factor; OSTM1, osteopetrosis-associated transmembrane protein 1; TRAP, Tartrate-Resistant Acid Phosphatase; NTAfc1, Nuclear Factor of Activated T cells 1. Figure 1 de l'article (Amarasekara et al. 2018)

Tableau 6 Résumé des effets de cytokines pro et anti-ostéoclastogéniques.*Adapté de (Amarasekara et al. 2018)*

Cytokine	Action	Références
Cytokines ostéoclastogéniques		
RANK-L	Induit la différenciation, la survie, la prolifération et la maturation des OCs	(Takayanagi 2007)
M-CSF	Induit la différenciation, la survie, la prolifération et la maturation des OCs	(Takahashi et al. 1991)
TNF-α	Induit l'expression de RANK et RANK-L, stimule la différenciation des OCs	(Azuma et al. 2000)
IL-1α	Induit l'expression de RANK-L et de marqueurs des OCs, active l'induction de MITF	(Kim et al. 2009)
IL-1β	Induit l'expression de RANK-L et la différenciation des OCs	(Wei et al. 2005)
IL-6	Induit l'expression de RANK-L et de marqueurs des OCs	(Kudo et al. 2003)
IL-7	Induit l'expression de RANK-L et du TNF- α , stimule la différenciation des OCs	(Torraldo et al. 2003)
IL-8	Induit l'activation de RANK médiée par NFATc1	(Bendre et al. 2003)
IL-11	Induit la différenciation des OC, Augmente le nombre de cellules progénitrices des OCs	(Kudo et al. 2003)
IL-15	Induit l'expression de TNF- α et de RANK-L, stimule la différenciation des OCs	(Okabe et al. 2017)
IL-17	Induit l'expression de TNF- α ; IL-1, IL-6 et de RANK-L	(Lubberts et al. 2003; Hwang et al. 2004)
IL-23	Induit l'expression de RANK et de RANK-L, stimule la production d'IL-17	(Chen et al. 2008)
IL-34	Induit la différenciation des OCs	(Hwang et al. 2012)
Cytokines anti-ostéoclastogéniques		
OPG	Inhibe la différenciation des OCs (Récepteur leurre de RANK-L)	(Bucay et al. 1998)
INF-α	Diminue l'expression de c-Fos	(Xiong et al. 2016)
INF-β	Inhibe la différenciation des OCs médiée par RANK et TLR5	(Hayashida et al. 2014)
INF-γ	Inhibe la différenciation des OCs induite par RANK-L et TNF- α , stimule l'apoptose des OCs	(Kohara et al. 2011)
IL-3	Diminue l'expression de c-Fms, PU.1, C-Fos et TNFR	(Yogesha et al. 2005)
IL-4	Inhibe l'induction de RANK-L induite par NFATc1, diminue l'expression de TNF- α , IL-1, IL-6 et RANK-L	(Cheng et al. 2011)
IL-10	Diminue l'expression de NFATc1, IL-1, TNF- α et la production d'IL-6. Induit l'expression de l'OPG	(Liu et al. 2006)
IL-12	Inhibe la différenciation des OCs induite par RANK-L et TNF- α	(Nagata et al. 2003)
IL-27	Inhibe les cascades de signalisation induites par RANK-L. Diminue la différenciation induite par l'IL-17	(Kalliolias et al. 2010)
IL-33	Inhibe la différenciation des OCs induite par RANK-L, induit l'apoptose des OCs	(Zaiss et al. 2011)

B. LA MINÉRALISATION

Même si les ostéoblastes assurent en majorité la fonction de minéralisation osseuse, les ostéocytes possèdent aussi cette capacité tout comme les chondrocytes dans le cadre de l'ossification endochondrale (transformation du cartilage en os mature lors de la croissance osseuse). D'autres types cellulaires expriment des caractéristiques ostéoblastiques et sont capables de minéralisation dans des conditions pathologiques (i.e. lorsque des calcifications ectopiques sont observées) (Lest et al. 2007).

Pour induire la minéralisation, l'environnement doit être propice à la précipitation du calcium et du phosphate pour former l'hydroxyapatite. Elle est permise par plusieurs facteurs : une élévation locale de la concentration en calcium et/ou de phosphate, une augmentation de facteurs facilitant cette précipitation ou une diminution de ceux qui l'inhibent (Lest et al. 2007). Plusieurs mécanismes de minéralisation sont décrits dans la littérature. La minéralisation peut s'effectuer dans le milieu extra-cellulaire ou être initiée à l'intérieur des cellules dans des vésicules.

Dans les deux cas, l'augmentation de la concentration en phosphate est nécessaire à la minéralisation et est possible grâce à l'action de la phosphatase alcaline (ALP) sur les esters de phosphates (**Fig. 16**). Les phosphates inorganiques (Pi) obtenus induisent l'expression d'autres gènes impliqués dans la minéralisation (Beck 2003). Ils favorisent aussi l'expression de transporteurs facilitant à leur tour l'entrée de Pi dans la cellule, résultant alors en une boucle de régulation positive (Lundquist et al. 2007). A l'inverse, les pyrophosphates inorganiques (PPi) inhibent la minéralisation (Addison et al. 2007). En effet, cette action se traduit par une diminution de la croissance minérale en se fixant sur la surface osseuse. D'autre part, ils induisent l'expression de l'ostéopontine, une protéine qui inhibe la minéralisation (Singh et al. 2018). Enfin, en étant un substrat de l'ALP, les PPi empêchent le clivage d'autres esters de phosphates par compétition, même si le clivage du PPi lui-même libère du Pi et favorise la minéralisation (Lest et al. 2007). La minéralisation est ensuite effectuée dans des vésicules matricielles de 20 à 200 nm se formant par bourgeonnement à la membrane des OBs. Ces vésicules matricielles présentent une activité accrue de l'ALP (Anderson 1995). Elles possèdent des transporteurs dépendant du sodium, favorisant l'acheminement du Pi vers ces vésicules (Montessuit et al. 1995; Hasegawa 2018). Il y a alors une concentration des Pi intra-vésiculaire. De plus, la surface de ces vésicules matricielles est

enrichie en annexine V et en phosphatidylsérine qui conduisent à l'entrée de calcium dans les vésicules matricielles (Hasegawa 2018). L'élévation parallèle des concentrations en calcium et en Pi entraîne la formation de complexe Phosphatidylsérine- CaPO_4^{3-} à la surface intérieure de la membrane (Hasegawa 2018). La minéralisation débute (**Fig. 16**).

La mort cellulaire est aussi un processus nécessaire lors de la minéralisation puisque la réduction de l'apoptose inhibe la minéralisation (Lest et al. 2007). La mort des cellules et les débris cellulaires permettraient la nucléation de la minéralisation. De plus, l'externalisation des phosphatidylsérines, une étape précoce de l'apoptose, pourrait expliquer ce rôle dans les calcifications ectopiques, celles-ci ayant une forte affinité pour le calcium (Lest et al. 2007).

Comme indiqué précédemment, la minéralisation peut être initiée à l'intérieur de la cellule puisqu'il est montré que les cristaux de calcium/phosphates amorphes peuvent être directement synthétisés puis sécrétés par les OBs par exocytose (Rohde et Mayer 2007; Mahamid et al. 2011) ou par le biais de vésicules autophagiques (Nollet et al. 2014). Il existe également une minéralisation extracellulaire qui s'effectue par la sécrétion cellulaire de protéines qui permettent de réguler de la minéralisation. L'expression des SIBLINGs (MEPE, DMP1, OPN, BSP...) est augmentée avant et pendant la minéralisation. Du fait de leurs motifs affins pour la matrice osseuse et les intégrines, ces protéines servent à la communication entre les cellules et la matrice. La BSP, exprimée quasi exclusivement dans les tissus minéralisés, se fixe de façon spécifique au collagène et à l'hydroxyapatite (Tye et al. 2003; Baht et al. 2008). Elle joue un rôle dans la minéralisation de l'os nouvellement formé (Monfoulet et al. 2010). MEPE, exclusivement exprimée dans les OBs, les OSTs et les odontoblastes, est un régulateur de la concentration en phosphate en inhibant la minéralisation, l'expression de PHEX, et en favorisant l'expression du FGF23 (Liu et al. 2007). DMP1 est une phosphoprotéine qui est hautement exprimée dans les ostéocytes après une stimulation mécanique (Yang et al. 2005). Elle change de conformation en fixant le calcium, le séquestre et facilite la nucléation de la minéralisation, tout en contrôlant la précipitation spontanée du phosphate de calcium (He et al. 2005). En effet, l'état de phosphorylation contrôle l'action de DMP1. La forme native phosphorylée inhibe la minéralisation alors que la forme non phosphorylée, après clivage du Pi par l'ALP (Tartaix et al. 2004), est un inducteur de la minéralisation en facilitant la fixation de l'hydroxyapatite sur le collagène I (He et George 2004) (**Fig. 16**). L'ostéopontine est retrouvée dans les tissus minéralisés et inhibe la minéralisation osseuse à l'état phosphorylé ce qui n'est plus le cas une fois déphosphorylée

par l'ALP (Gericke et al. 2005). La surface osseuse est enrichie en ostéopontine non clivée, ce qui permet l'adhésion des OCs et facilite la résorption osseuse (Shapses et al. 2003). D'autres protéines non SIBLINGs sont impliquées dans la minéralisation comme l'ostéocalcine qui est la protéine non collagénique la plus abondante dans la matrice osseuse sécrétée par les OBs. L'OCN se lie à l'hydroxyapatite et son accumulation est hautement corrélée à la minéralisation osseuse (Lest et al. 2007). L'ostéonectine est une glycoprotéine qui lie le calcium et le collagène de type I et favorise la minéralisation, la différenciation des OBs et des OCs (Rosset et Bradshaw 2016). On retrouve également la fétuine A dans la matrice et dans le sang. Elle empêche la minéralisation et joue un rôle dans l'inhibition des calcifications ectopiques (Schinke et al. 1996; Jahnen-Dechent et al. 2011).

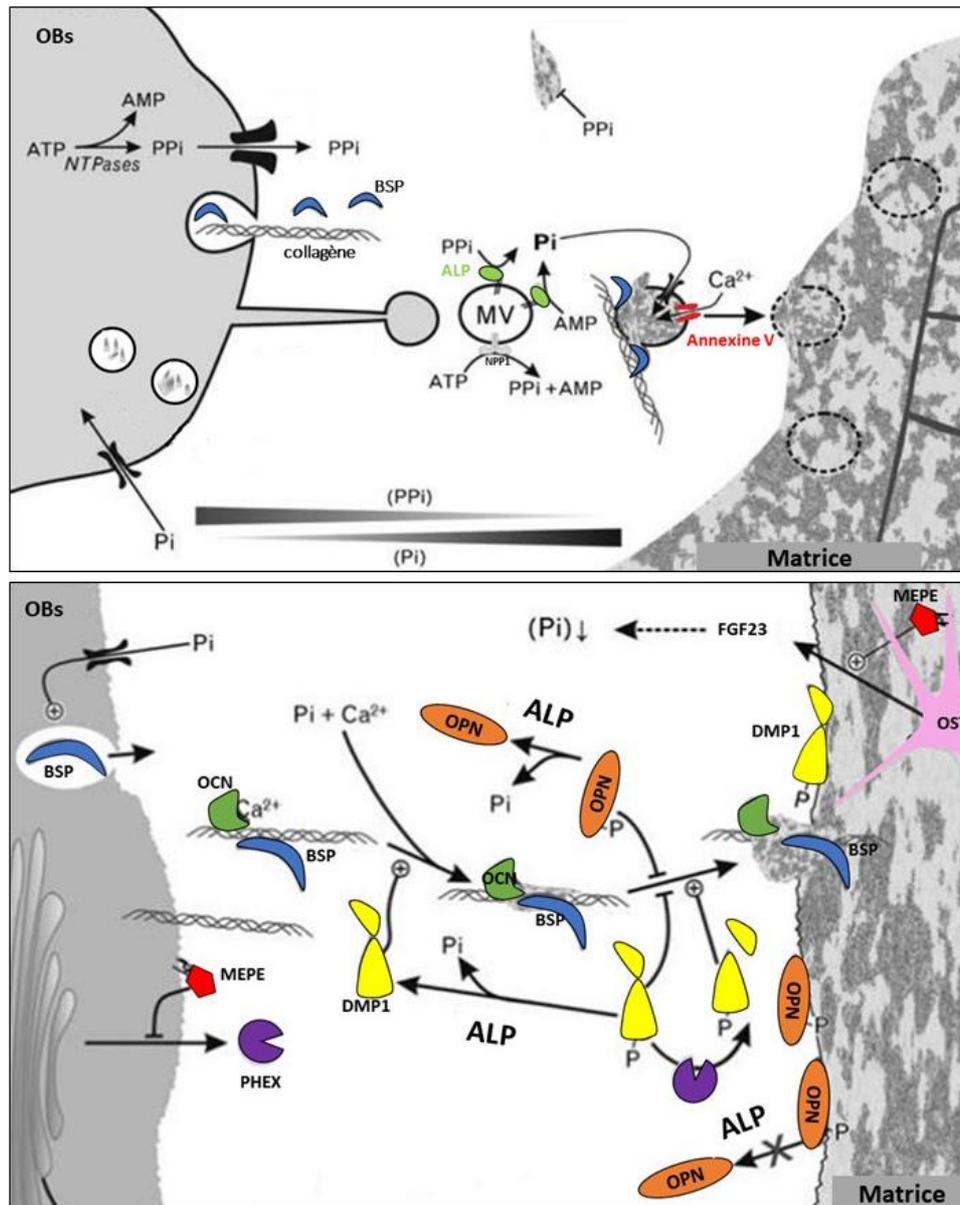


Figure 16 Représentation du processus de minéralisation.

Minéralisation à l'aide des vésicules matricielles (partie supérieure) : Le bourgeonnement des vésicules matricielles (MV) à la membrane des ostéoblastes est stimulé par l'élévation de la concentration en phosphate inorganique (Pi). A l'inverse, le pyrophosphate inorganique (Ppi) inhibe la minéralisation. Le Ppi est clivé par l'ALP présente à la surface des MV. Un gradient de Pi s'instaure vers la zone de dépôt de la matrice. Les MV se fixent sur le collagène synthétisé par les OBs, internalisent du Ca^{2+} grâce aux Annexine V situées à la surface membranaire et incorporent du Pi via un transporteur. L'augmentation de la concentration intra-vésiculaire de Pi et Ca^{2+} favorise la formation des cristaux d'hydroxyapatite. La croissance de ces cristaux continue sous le contrôle de protéines régulatrices. Des cristaux de phosphate de calcium sont aussi formés dans des vésicules autophagiques et dans des exosomes. Partie inférieure : Les Pi favorisent l'expression de protéines comme la BSP et l'OCN. Ces protéines initient la minéralisation en interagissant avec le collagène, le Ca^{2+} et le Pi. La propagation de la minéralisation est inhibée par DMP1 et l'OPN sous formes phosphorylées. Déphosphorylées par l'ALP ou PHEX, elles favorisent la minéralisation. MEPE régule la concentration en Pi en inhibant PHEX et en induisant l'expression de FGF23.

Adapté de (Lest et al. 2007).

C. ORCHESTRATION DU REMODELAGE

1. Régulation de la formation osseuse

Les OSTs sont les cellules orchestratrices du remodelage et régulent activement l'activité des OBs et des OCs. Elles contrôlent l'activité anabolique des ostéoblastes notamment par la sécrétion de facteurs tels que la sclérostine ou Dkk1 (Dkkopf1) vers le réseau lacuno-canaliculaire. Ces deux protéines sont des inhibiteurs de la voie Wnt nécessaires à la différenciation et à la minéralisation par les OBs (Almeida et al. 2005; Rodda 2006; Burgers et Williams 2013). Suite à un stress mécanique, l'expression de ces deux protéines est diminuée ce qui permet la formation osseuse (Robling et al. 2008; Bonewald 2011). Au contraire, la décharge induit l'effet inverse (Spatz et al. 2015).

Les ostéocytes sécrètent également du NO (Oxyde Nitrique) et des prostaglandines (PGs) en réponse à la stimulation mécanique (Dallas et al. 2013). Le NO favorise la formation osseuse et inhibe la résorption osseuse (Tan et al. 2008). Les PGs induisent aussi la formation osseuse et la synthèse des protéines impliquées dans la minéralisation comme DMP1.

2. Régulation de la résorption osseuse

Les OSTs sont responsables de la régulation de résorption osseuse. Il a longtemps été admis que les OBs soient les principales sources de RANK-L et contrôlent ainsi la résorption osseuse (Suda et al. 1999). Cependant, la délétion spécifique de RANK-L dans les ostéocytes induit chez la souris un phénotype ostéopétrotique. De plus, la perte osseuse associée à la décharge mécanique est médiée par la production de RANK-L ostéocytaire puisque les souris KO pour RANK-L dans les ostéocytes ne présentent plus ce phénotype osseux (Xiong et al. 2011; Nakashima et al. 2011). Les ostéocytes expriment également l'OPG, le récepteur leurre de RANK-L (Ikeda et al. 2001; Morrell et al. 2018). Cependant, la régulation de l'ostéoclastogénèse par les ostéocytes s'effectue majoritairement par leur mort cellulaire.

3. Rôle de la mort des ostéocytes

La mort des ostéocytes joue un rôle clé dans l'initiation du remodelage (**Fig. 17**). Les ostéocytes ont une durée de vie longue mais le renouvellement de cette population de cellules est nécessaire pour assurer la qualité du tissu osseux.

De plus, la mort ostéocytaire peut être induite par d'autres facteurs tels que :

- la chute des œstrogènes et androgènes (comme dans le cas de la ménopause) (Thompson et al. 1997; Manolagas et Parfitt 2010) ;
- une diminution de la stimulation mécanique (Aguirre et al. 2006) ;
- l'âge (qui va généralement de pair avec une réduction de l'activité physique) ;
- une interruption du réseau lacuno-canaliculaire par les micro-cracks (Verborgt et al. 2000) ;
- une synthèse endogène ou une prise excessive de glucocorticoïdes (Weinstein et al. 2000; Manolagas 2010; Ueda et al. 2015) (**Fig. 17**).

La plupart de ces effets ont pour conséquence un stress oxydatif, induisant à terme l'apoptose des OSTs (Manolagas 2010; Yin et al. 2018) et l'augmentation de la synthèse de RANK-L (Yu et al. 2017). L'induction de l'apoptose des ostéocytes a alors un effet régulateur sur les OCs et est aussi un facteur clé du déclenchement de la résorption osseuse (Cardoso et al. 2009). Les OCs sont en effet localisés dans les zones de mort ostéocytaire (Verborgt et al. 2000; Cerri et al. 2003; Aguirre et al. 2006). Kennedy et al. ont montré que les OST en apoptose sont localisés dans les 100 µm autour d'un micro-dommage chez le rat. Dans la zone distante de 100 à 300 µm du dommage, les OST expriment RANK-L et le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) de façon plus importante alors que la zone du dommage montre un marquage réduit pour l'OPG (Kennedy et al. 2012). Le remodelage induit par les micro-dommages est donc contrôlé de façon spatiale par les OSTs, et passe par une modification du ratio OPG/ RANK-L. Des études suggèrent aussi l'implication de HMGB1 (High Mobility Group Box 1), une protéine nucléaire ubiquitaire régulant l'expression de protéines, dans la communication entre les ostéocytes en apoptoses et les cellules environnantes. En effet, les OSTs relarguent HMGB1 lors de l'apoptose (Yang et al. 2008) et l'inhibition de l'apoptose des OSTs prévient ce relargage (Davis et al. 2017). Or, l'ajout de HMGB1 dans le milieu de culture d'OBs primaires augmente le ratio d'ARN RANK-L/OPG ainsi que la sécrétion de TNFα et d'IL-6, des cytokines pro-ostéoclastogéniques (Yang et al. 2008). Cependant, la littérature n'indique pas à ce jour si les OSTs réagissent de la même manière que les OBs à HMGB1. Enfin, alors que la mort des ostéocytes initie le remodelage osseux, la stimulation mécanique à un niveau suffisant pour activer la formation osseuse prévient l'apoptose ostéocytaire (Noble et al. 2003; Mann et al. 2006). La mort ou la survie des OSTs est donc un facteur très important dans la régulation du remodelage osseux (**Fig. 17**).

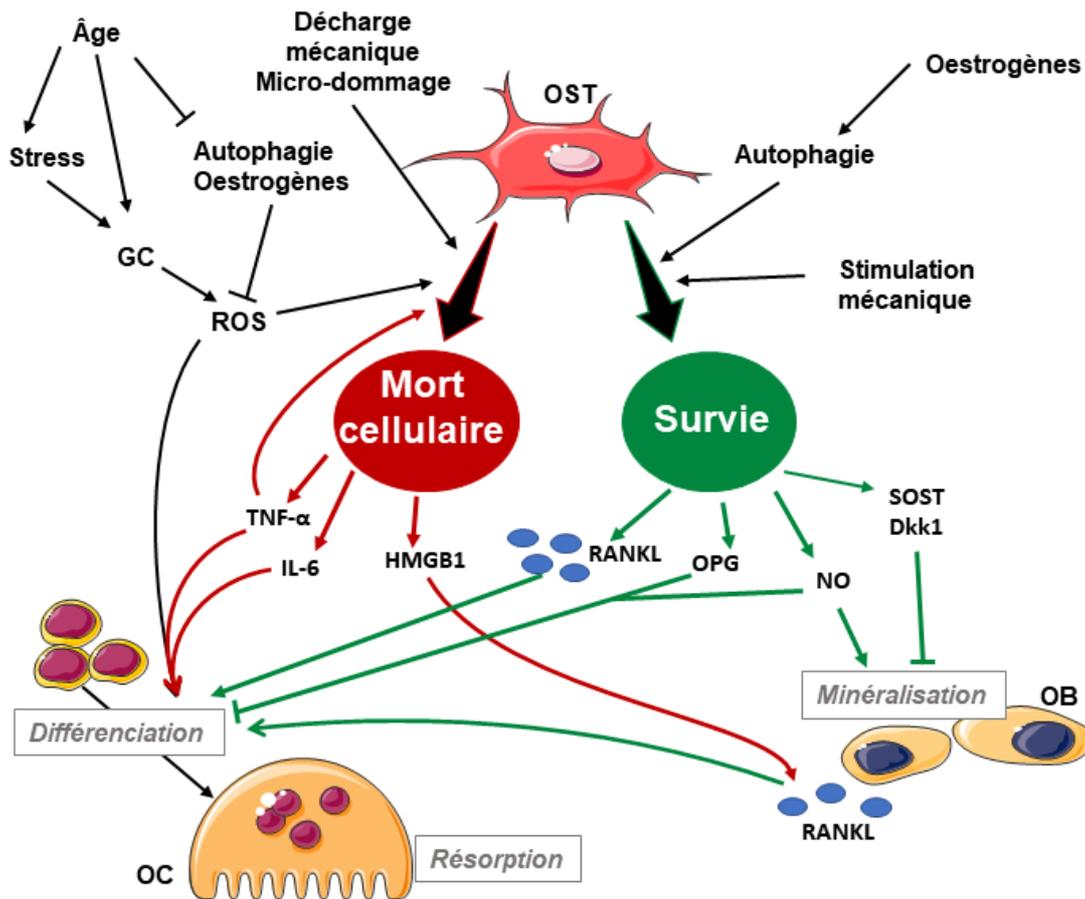


Figure 17 Schéma simplifié de la régulation du remodelage osseux par les OSTs.

La stimulation mécanique, les œstrogènes et l'autophagie favorisent la survie des OSTs. Les œstrogènes et l'autophagie ont notamment un effet protecteur contre le stress oxydatif induit par les ROS. Les OSTs vivants sécrètent des molécules régulatrices du remodelage. Avec l'âge ou le stress, la synthèse endogène de glucocorticoïdes (GC) est augmentée. Les GCs endogènes ou exogènes induisent la production de ROS. Or, les ROS ainsi que les dommages osseux ou l'absence de stimulation mécanique provoquent la mort des OSTs. Ces derniers relarguent alors des molécules qui favorisent la différenciation ostéoclastiques (IL-6, TNF- α), la synthèse de RANK-L par les OBs (HMGB1) et la mort des OSTs (TNF- α). La mort ostéocytaire initie le remodelage osseux.

D. ROLE DE L'AUTOPHAGIE

(a) Définition

L'autophagie tient son nom du grec *αυτο* : « soi-même », et *φαγειν* « manger ». Il s'agit d'un processus physiologique identifié en 1992 dans la levure (Takeshige et al. 1992). Très conservé au cours de l'évolution, l'autophagie se déroule dans tous les types cellulaires eucaryotes, et permet la dégradation et le « recyclage » du matériel cytoplasmique à l'intérieur même de la cellule (Mizushima et Komatsu 2011). Il existe trois types d'autophagie : la macroautophagie (la forme majoritaire, appelée simplement autophagie par la suite dans ce manuscrit), la microautophagie et l'autophagie médiée par les protéines chaperonnes. Elle est intensifiée

pour favoriser la survie des cellules en réponses à différentes sources de stress cellulaire : la privation ou la restriction en nutriments ou en oxygène, un stress du réticulum endoplasmique, une infection ou un stress oxydatif (Kroemer et al. 2010). L'autophagie permet de recycler les organelles et les protéines mal repliées, participant ainsi à l'homéostasie cellulaire. En particulier, l'autophagie dégrade les organelles endommagées comme par exemple les mitochondries à la suite d'un stress oxydatif, ou bien des protéines ubiquitinylées et donc adressées vers une voie de dégradation.

La dérégulation de ce processus est impliquée dans de nombreuses pathologies inflammatoires et auto-immunes (Arbogast et Gros 2018), dans des pathologies liées à l'âge (Kroemer 2015) ou neurodégénératives comme les maladies d'Alzheimer, de Parkinson (Nah et al. 2015) ou de Huntington (Croce et Yamamoto 2018). Cependant, plus qu'un mécanisme de défense et de dégradation, l'autophagie participe également à la sécrétion de protéines (Deretic et al. 2012; Ponpuak et al. 2015) et au remodelage osseux (Hocking et al. 2012; Pierrefite-Carle et al. 2015)

(b) Mécanisme

L'autophagie se décompose en plusieurs étapes (**Fig. 18**). Lors de l'initiation du processus, le phagophore ou pré-autophagosome, une membrane isolée, se forme dans le cytoplasme. La formation du phagophore s'effectue à partir de la membrane du réticulum endoplasmique, de la mitochondrie ou du Golgi (Tooze et Yoshimori 2010) et requiert le recrutement séquentiel de plus d'une quinzaine de protéines ATG (Autophagy related Gene)(Pierrefite-Carle et al. 2015). En l'absence de nutriments, la voie mTOR (mammalian Target of Rapamycin) est inhibée, levant l'inhibition de la formation du complexe ULK1, et favorise le recrutement d'autres protéines pour former le complexe comprenant ATG5 et ATG12 (Mizushima et Komatsu 2011). Ce dernier complexe est ensuite nécessaire à la lipidation de LC3-I en LC3-II, aboutissant à son insertion dans la membrane et contribuant à l'élongation et la maturation du pré-autophagosome. Le phagophore s'allonge alors peu à peu et isole une partie du contenu cytoplasmique pour créer une vésicule à double membrane dénommée autophagosome. Cette vésicule fusionne ensuite avec un lysosome pour devenir un autolysosome. Les enzymes lysosomales ainsi que son contenu à pH acide permettent alors la dégradation du contenu cytoplasmique. Certaines protéines adaptatrices telles que p62 permettent l'adressage de protéines ubiquitinylées vers LC3-II et l'autophagosome (Gammoh et Wilkinson 2014; Katsuragi et al. 2015).

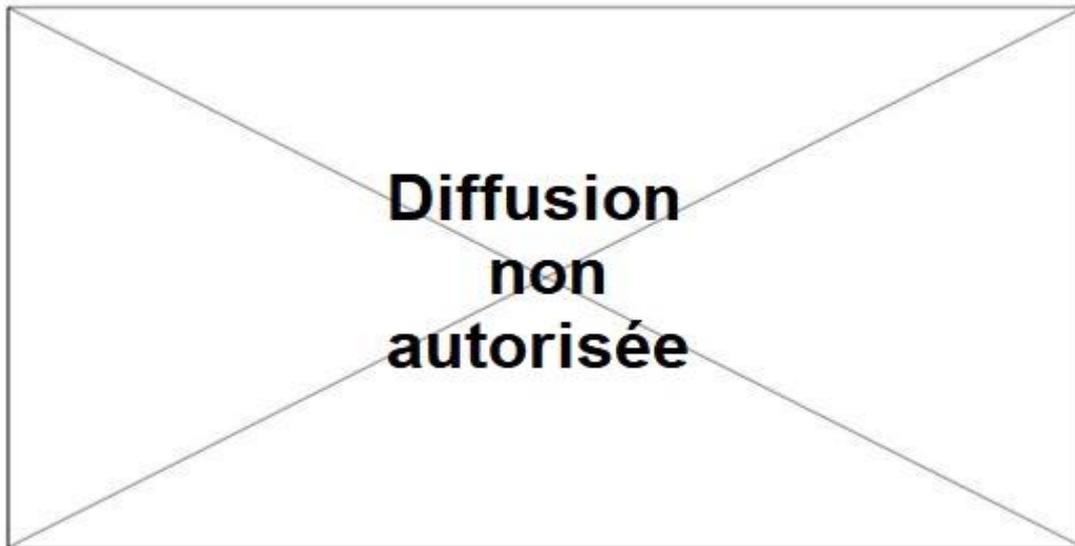


Figure 18 Mécanisme de l'autophagie.

1) Nucléation : elle requiert le recrutement de protéines ATGs 2) Maturation : Lipidation de LC3-I en LC3-II qui s'insère dans la membrane de l'autophagosome en formation. Le pré-autophagosome isole une partie du cytoplasme contenant du matériel cytosolique à « recycler ». Certaines protéines adaptatrices telles que p62 dirigent spécifiquement des protéines vers l'autophagosome en interagissant avec LC3-II 3) Fusion : l'autophagosome fusionne avec le lysosome et forme alors un autolysosome. 4) Dégradation : le contenu du lysosome (protéases, protons...) permet la dégradation du contenu de l'autolysosome et le recyclage des acides aminés, ATP... Figure 1 de l'article (Gammoh et Wilkinson 2014)

(c) Rôle dans l'os

L'autophagie est un des processus impliqués dans la fonction des cellules osseuses. *In vivo*, la déficience en autophagie altère la capacité de résorption des OCs notamment via la réduction de l'adressage des lysosomes délivrant les enzymes de dégradation de la matrice vers la bordure plissée des OCs (DeSelm et al. 2011). De plus, une étude *in vitro* a montré que l'inhibition de l'autophagie par l'everolimus, un analogue de la rapamycine, affecte la résorption et l'expression de la cathepsine K (Kneissel et al. 2004). L'autophagie est aussi nécessaire à la différenciation des ostéoclastes soumis à la microgravité (Sambandam et al. 2014) et à l'hypoxie (Zhao et al. 2012).

Dans les OBs, il a été montré que l'autophagie participe à la minéralisation des cristaux d'hydroxyapatite. En effet, des formes cristallines de phosphate de calcium en formes d'aiguilles (**Fig. 19**) sont observées dans des autophagosomes d'OBs en minéralisation (Nollet et al. 2014). Ces travaux démontrent que l'inhibition de l'autophagie altère la capacité de

minéralisation de ces cellules *in vitro*. De même, *in vivo*, la délétion spécifique d'ATG5 ou d'ATG7 dans les OBs induit une perte osseuse et une augmentation du stress du réticulum endoplasmique (Nollet et al. 2014; Li et al. 2018). De plus, l'action protectrice des œstrogènes contre l'apoptose des OBs est médiée par l'autophagie (Yang et al. 2013) ce qui pourrait expliquer la diminution accrue de l'activité autophagique observée chez les femelles par rapport aux mâles avec l'âge (Camuzard et al. 2016). Enfin, l'autophagie participe également à la différenciation et à la prolifération des OBs *in vitro* (Weng et al. 2018) et à la différenciation ostéoblastique *in vivo* en réponse à une stimulation mécanique (Zhou et al. 2018).

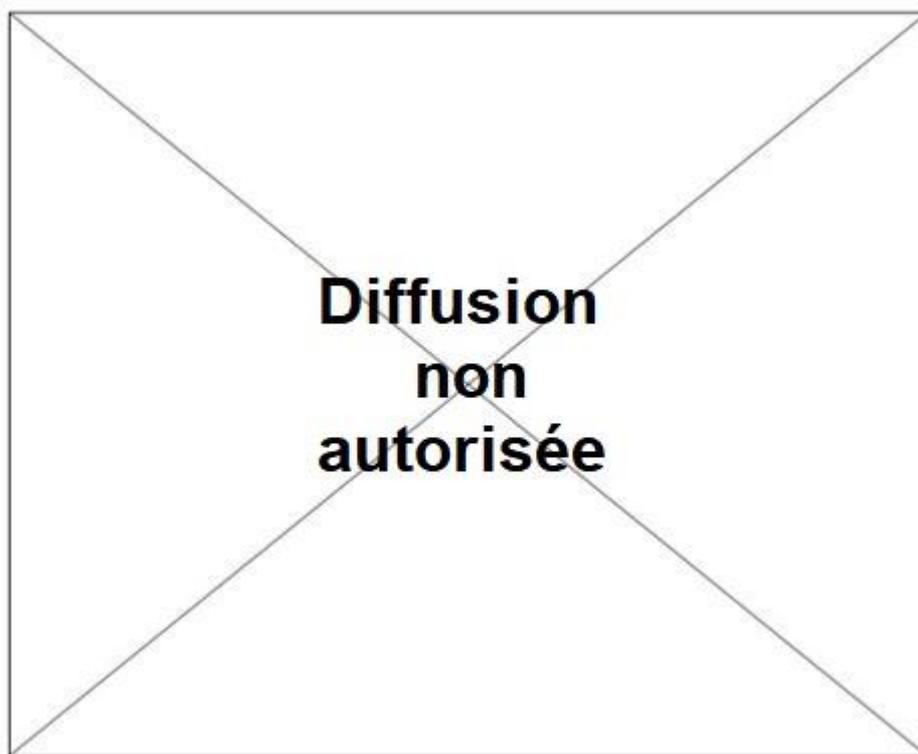


Figure 19 Photos de microscopie électronique à transmission d'UMR106, une lignée d'ostéosarcome de rat en minéralisation.

Les flèches blanches indiquent les vésicules autophagiques alors que les flèches noires indiquent les structures cristallines en forme d'aiguilles caractérisées comme du phosphate de calcium. Figure 1C de l'article de (Nollet et al. 2014)

Dans les OSTs, l'autophagie régule leur action sur le remodelage et l'acquisition du phénotype ostéocytaire. Chez la souris, la délétion d'ATG7 dans les OSTs mime le vieillissement osseux (Onal et al. 2013). Réciproquement, l'avancement dans l'âge chez le rat provoque une diminution du niveau d'autophagie ostéocytaire qui semble être corrélée à la perte osseuse (Chen et al. 2014). De plus, l'ovariectomie de rats induit l'autophagie dans les ostéocytes et

est corrélée à la perte osseuse (Yang et al. 2014). *In vitro*, l'administration de PTH protège en partie les MLO-Y4 de l'apoptose induite par le traitement à la dexaméthasone, un glucocorticoïde, via une augmentation de l'autophagie (Zhu et al. 2017). Une étude *in vitro* suggère également que l'autophagie, induite dans les ostéocytes au contact de particules de prothèses de hanches, soit responsable de la réduction de l'expression de l'INF- β . Elle favoriserait l'ostéoclastogénèse et expliquerait l'ostéolyse induite lors de la pose de prothèse de hanche (Wang et al. 2017). De plus, la délétion de ATG7 dans les cellules de la lignée ostéoblastique modifie le réseau ostéocytaire en réduisant le nombre de dendrites (Piemontese et al. 2016). Enfin, une récente étude utilisant la lignée MLO-Y4 indique que le stress mécanique par *fluid shear stress* induit l'autophagie dans les OSTs (Zhang et al. 2018). L'autophagie joue donc un rôle crucial pour la fonction des OSTs.

Le rôle de l'autophagie dans le tissu osseux a été mis en évidence dans certaines pathologies osseuses. En effet, une mutation de la protéine p62 impliquée dans l'autophagie est responsable de la maladie de Paget qui se caractérise par une augmentation de la résorption et des déformations osseuses (Goode et Layfield 2010). La mutation de certains gènes impliqués dans l'ostéoporose (PLEKHM1, V-ATPase a3) affecte l'activité autophagique des OCs *in vitro* et pourrait jouer un rôle dans la maladie (Ochotny et al. 2013; Bo et al. 2016).

Le tissu osseux est donc un organe dont l'homéostasie est très complexe. Une dérégulation chez un des acteurs peut déstabiliser l'équilibre physiologique et engendrer des atteintes osseuses. Le chapitre suivant décrit les conséquences et les mécanismes de toxicité de l'uranium dans l'os mais aussi dans ses autres tissus cibles. De plus, une partie détaille les principaux décorporants de l'uranium. Enfin, d'autres métaux lourds affectent également le tissu osseux, c'est pourquoi une partie est dédiée à la description de leurs mécanismes de toxicité.

CHAPITRE III : TOXICITÉ DE L'URANIUM ET MÉTAUX LOURDS DANS L'OS

I. TOXICITÉ DE L'URANIUM

L'uranium présente une double toxicité ; une toxicité chimique par sa nature de métal lourd et une toxicité radiologique. Cependant, la toxicité de l'uranium naturel et de l'uranium appauvri est principalement chimique due à leur période de décroissance qui est très longue. De plus, la spéciation de l'uranium affecte sa toxicité (Brugge et Buchner 2011). Comme indiqué dans le chapitre I, les organes de rétention de l'uranium étant principalement le rein et les os, ce sont les principales cibles de sa toxicité même si d'autres organes sont affectés.

A. EFFETS SUR LE REIN

L'uranium est un néphrotoxique. Le rein est l'organe touché en premier lors d'une intoxication aiguë à l'uranium naturel et ce sont les dommages occasionnés sur cet organe qui entraînent une léthalité des suites de nécroses tubulaires et glomérulaires (Domingo et al. 1987; Souidi et al. 2009). De nombreuses études révèlent un effet toxique de l'uranium sur le rein que ce soit par intoxication aiguë ou chronique (Kurttio et al. 2002; Souidi et al. 2009; Arzuaga et al. 2010). Dans le cas d'une intoxication aiguë à l'acétate d'uranyle (UA), la DL50 chez le rat est de 204 mg/kg par administration orale et de 8,3 mg/kg en injection sous-cutanée. Pour la souris, ces valeurs sont respectivement de 242 et 20,4 mg/kg (acétate d'uranyle) (Domingo et al. 1987). Chez l'Homme, une ingestion de 5 grammes est nécessaire pour atteindre la DL50 (Kathren et Burklin 2008). Néanmoins, des intoxications plus faibles génèrent tout de même des atteintes rénales. Une injection de 2 mg/kg chez le lapin est suffisante pour altérer dans les 15 heures les paramètres biochimiques de la fonction rénale. Alors que la clairance rénale de la créatinine est diminuée de 55 % après 15 heures, elle est réduite à presque zéro 5 jours après injection. De plus, des modifications morphologiques des cellules rénales sont observées. Cependant, ces altérations sont réversibles puisqu'elles ont disparu 15 jours après l'intoxication (Kobayashi et al. 1984). Les effets de l'uranium dans ce cas sont temporaires mais s'expliquent sûrement par la durée d'exposition. En effet, dans le cas d'une intoxication de trois mois à 600 mg/L d'uranium naturel dans l'eau de boisson de lapins, des lésions tubulaires et glomérulaires sont observées et la majorité d'entre elles persistent après une période de récupération de trois mois (Gilman et al. 1998b, c). De plus, ces études ont révélé

une toxicité plus prononcée chez les mâles (LOAEL (*Lowest Observed Adverse Effect level*) = 0,96 mg/L) que chez les femelles (LOAEL= 4,8 mg/L).

Chez l'Homme, l'étude de la toxicité de l'uranium est plus complexe. En effet, les études qui permettent d'observer les effets de l'uranium sont épidémiologiques. L'ingestion d'uranium doit atteindre des niveaux très élevés pour voir apparaître des atteintes rénales (Kurttio et al. 2006). Chez une population de Finlandais ingérant une eau contenant plus de 300 µg/L d'uranium, une corrélation est établie entre la concentration urinaire d'uranium et l'élévation de l'excrétion de calcium, de phosphate et de glucose (+20 à 30 %), synonymes de dysfonctions tubulaires (Kurttio et al. 2002).

In vitro, de nombreux travaux se sont intéressés à déterminer les mécanismes de la toxicité de l'uranium sur les cellules rénales (Arzuaga et al. 2010; Yue et al. 2018). L'un des mécanismes évoqués est l'augmentation du stress oxydatif (Daraei et al. 2012; Shaki et al. 2012; Shaki et Pourahmad 2013). De surcroît, la génotoxicité de l'uranium est également démontrée puisque le nitrate d'uranyle appauvri génère des cassures chromosomiques entraînant l'apoptose des cellules rénales NRK-52^E dès 300 µM (Thiébaud et al. 2007). Certaines études indiquent que la toxicité de l'uranium serait médiée par une modification de l'homéostasie du calcium. En présence d'acétate d'uranyle, le récepteur à la ryanodine (RyR) localisé à la membrane du réticulum endoplasmique et dont le rôle physiologique est de mobiliser le calcium vers le cytosol, est moins sensible à son ligand, l'IP₃, ce qui engendre un flux de calcium vers le cytosol inférieur à la normale (Ondrias et al. 2008). Les auteurs observent aussi une hausse de l'expression de IP₃R2 (IP₃ Receptor 2) et SERCA (sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase), d'autres récepteurs impliqués dans le relargage de calcium vers le cytosol. Ils expliquent que l'augmentation de l'expression de ces récepteurs serait une réponse à l'activité déficiente des RyR. Or, dans une autre étude, le rôle de ces mêmes récepteurs IP₃R2 dans l'apoptose des cellules HEK 293, induite ou non par l'uranium (dès 50 µM), est mis en évidence (Kopacek et al. 2009). L'exposition à l'uranium pourrait donc augmenter l'apoptose cellulaire via l'expression de ces IP₃R2. Cette modification de l'homéostasie du calcium est aussi soulignée par la modification de nombreux gènes (notamment par une élévation des ARNm des IP₃ kinases) lors d'une étude transcriptomique sur les HEK293 exposées à l'uranium (Prat et al. 2005).

Enfin, l'uranium modifie le métabolisme de la vitamine D dans le rein (Tissandie et al. 2006, 2007). Lors d'une exposition aiguë par gavage (rat, 204 mg/kg), une diminution du 50 % du

phosphate, de plus de 90 % de la PTH et de plus de 60 % de la vitamine D plasmatique est observée après 3 jours. Lors d'une exposition chronique (40 mg/L), l'uranium réduit également la concentration en vitamine D plasmatique mais sans modification du calcium et du phosphate sérique. Une diminution de l'expression du récepteur à la vitamine D est aussi mesurée dans le rein.

B. EFFETS SUR L'OS

1. *In vivo*

Le squelette constitue l'organe de stockage de l'uranium. En conséquence, les cellules osseuses sont exposées durablement à l'uranium. Ce dernier occasionne des dommages cellulaires et fonctionnels sur le tissu osseux.

De nombreuses études chez la souris et chez l'Homme soulignent une inhibition de la formation osseuse suite à une exposition à l'uranium (Guglielmotti et al. 1985; Ubios et al. 1991; Sylvester et al. 2002; Bozal et al. 2005; Fukuda et al. 2006; Wade-Gueye et al. 2012; Arzuaga et al. 2015). Chez le jeune rat exposé de façon chronique à 40 mg/L dans l'eau de boisson pendant ses 9 premiers mois de vie, un amincissement de l'os cortical et un épaissement de l'os trabéculaire en formation (ostéoïde) sont observés (Wade-Gueye et al. 2012). Ces modifications morphométriques s'accompagnent d'une expression réduite de gènes impliqués dans la différenciation des ostéoblastes (RUNX2), dans le remodelage osseux (TRAP, OCN), dans la minéralisation (BSP, OPN ou DMP1) et dans le transport du calcium (TRPV5), ainsi que le récepteur à la vitamine D (VDR). Les marqueurs sériques du remodelage CTx (marqueur de la résorption, produit de la dégradation du collagène) et OCN (marqueur de la minéralisation) sont également augmentés. En revanche, ces modifications ne sont pas observées chez le rat adulte, mettant ici en évidence l'effet de l'uranium sur l'os en croissance. Ces observations peuvent être expliquées par le tropisme de l'uranium pour les zones de remodelage (Bourgeois et al. 2015). Chez l'Homme, des modifications du métabolisme osseux sont aussi observées. Dans une population ingérant en moyenne 235 µg d'uranium par jour via l'eau de boisson, une hausse des marqueurs de remodelage CTx et OCN dans le sang est retrouvée exclusivement chez les hommes (Kurttio et al. 2005). Cette différence d'effets entre les hommes et les femmes semblent conforter les observations *in vivo* chez le rat et le lapin montrant une plus forte sensibilité des mâles à la toxicité de l'uranium (Gilman et al. 1998a, c).

2. *In vitro*

In vitro, l'uranium est cytotoxique pour les OBs (**Tab. 7**) et diminue leur capacité de minéralisation (Pierrefite-Carle et al. 2016), justifiant la perte osseuse observée *in vivo* en cas d'intoxication à l'uranium par un défaut de minéralisation. L'IC50 de l'uranium sur les ostéoblastes varie de 175 μ M à 725 μ M selon la lignée et la spéciation utilisée, démontrant une nouvelle fois l'importance de la complexation de l'uranium pour sa toxicité et les mécanismes mis en jeu. En effet, l'expression des gènes tels que la BSP et l'OCN semble varier différemment selon la spéciation de l'uranium déterminée *in silico* dans différentes conditions. Alors que l'uranium complexé à des carbonates entraîne une augmentation de la transcription de la BSP et ne modifie pas l'OCN, l'uranium complexé à la transferrine engendre une répression de l'expression de ces mêmes gènes (Milgram et al. 2008a, b).

Les auteurs démontrent que les ostéoblastes sont capables d'accumuler différentes quantités d'uranium dans leur cytoplasme selon sa spéciation. Les spéciations les moins toxiques (complexé à des carbonates ou au citrate) présentent les plus fortes accumulations intracellulaires d'uranium, dans les cellules ROS17/2.8 comme dans les NHOst. Cette accumulation se présente sous formes de cristaux en aiguilles localisées majoritairement dans des lysosomes (Milgram et al. 2008a, b). Ces aiguilles sont visibles dans des vésicules autophagiques et caractérisées comme de la méta-autunite (cristaux de phosphate d'uranyle) dans des lignées ostéoblastiques de rats UMR-106 (Pierrefite-Carle et al. 2016) exposées à du nitrate d'uranyle (**Fig. 20**). Des cellules rénales et des bactéries exposées à de l'uranium ont aussi présenté des aiguilles intra-cellulaires (Ghadially et al. 1982; Muller et al. 2008; Theodorakopoulos et al. 2015). L'accumulation intra-cellulaire sous formes d'aiguilles minérales est uniquement observée pour les spéciations les moins toxiques dans les OBs (Milgram et al. 2008a). La formation de ces aiguilles pourrait donc être un moyen pour la cellule d'atténuer la toxicité de l'uranium.

Tableau 7 Synthèse des IC50 de l'uranium dans différentes lignées cellulaires.

Type cellulaire	IC50	Test de Viabilité utilisé	Forme chimique de l'uranium	Référence	
HFOB1.19 (lignée ostéoblastique humains)	Non atteinte (100 μ M dose max)	MTT	Uranium naturel	Tasat 2007	
NHOst (ostéoblastes primaires humains)	725 μ M	MTT	Uranium naturel - bicarbonates	Milgram 2008	
	460 μ M	MTT	Uranium naturel- Bicarbonate transferrine		
ROS17/2.8 (lignée d'ostéoblastes de rats)	393 μ M	MTT	Uranium naturel - bicarbonates		
	253 μ M	MTT	Uranium naturel- Bicarbonate citrate		
	280 μ M	MTT	Uranium naturel- Bicarbonate transferrine		
	175 μ M	MTT	Uranium naturel- Bicarbonate calcium		
UMR-106 (lignée d'ostéoblastes de rats)	390 μ M	MTT	Uranium naturel- nitrate d'uranyle		Pierrefitte-Carle 2016
RAW 264.7 (lignée de monocytes macrophages)	285 μ M	MTT	Uranium naturel- acétate d'uranyle		Gritsaenko 2017
HK2 (lignée humaine de cellules de rein)	50 μ M	ATP intra-cellulaire	Uranium naturel- bicarbonate		Prat 2009
A549 (cellules humaines d'épithélium pulmonaire)	1000 μ M	ATP intra-cellulaire	Uranium naturel- acétate d'uranyle		
HEK (cellules embryonnaires humaines de rein)	500 μ M	ATP intra-cellulaire	Uranium naturel- acétate d'uranyle	Prat 2005	
NRK-52^E (cellules rénales de rat)	550 μ M	MTT	Uranium appauvri- nitrate d'uranyle	Thiebault 2007	

L'uranium induit également un stress oxydatif chez les ostéoblastes humains hFOB1.19, se traduisant par une élévation de la production de ROS (*Reactive Oxygen Species*) dès 10 μ M d'uranium naturel (Tasat et al. 2007). Ces ROS pourraient conduire à terme à l'apoptose de ces cellules, ayant pour conséquence un défaut de minéralisation même si aucune baisse de viabilité n'a été observée dans cette étude jusqu'à 100 μ M. Par ailleurs, un blocage de l'autophagie dans les OBs explique également les perturbations induites par l'uranium. En effet, l'autophagie est augmentée après 3 h d'exposition puis bloquée à 24 h lorsque la concentration en uranium (300 μ M) est proche de l'IC50 dans les UMR-106 (Pierrefite-Carle

et al. 2016). Or, il se trouve que ce processus est impliqué dans la minéralisation (Nollet et al. 2014) et permet la résistance au stress oxydatif. Enfin, l'uranium transforme les OBs HOS (ostéoblastes humains immortalisés) vers un phénotype cancéreux (expansion indépendante de l'attachement, formation de tumeur dans les souris *nude*, forte expression de l'oncogène *k-ras*, taux élevé d'échange de chromatine sœur pour une même cellule) (Miller et al. 1998). Il inhibe aussi de 40 % l'activité de l'ALP dans les hFOB1.19 (Tasat et al. 2007), même si aucune modification de cette enzyme n'est observée dans les cellules ostéoblastiques de rats ROS17/2.8 (Milgram et al. 2008b).

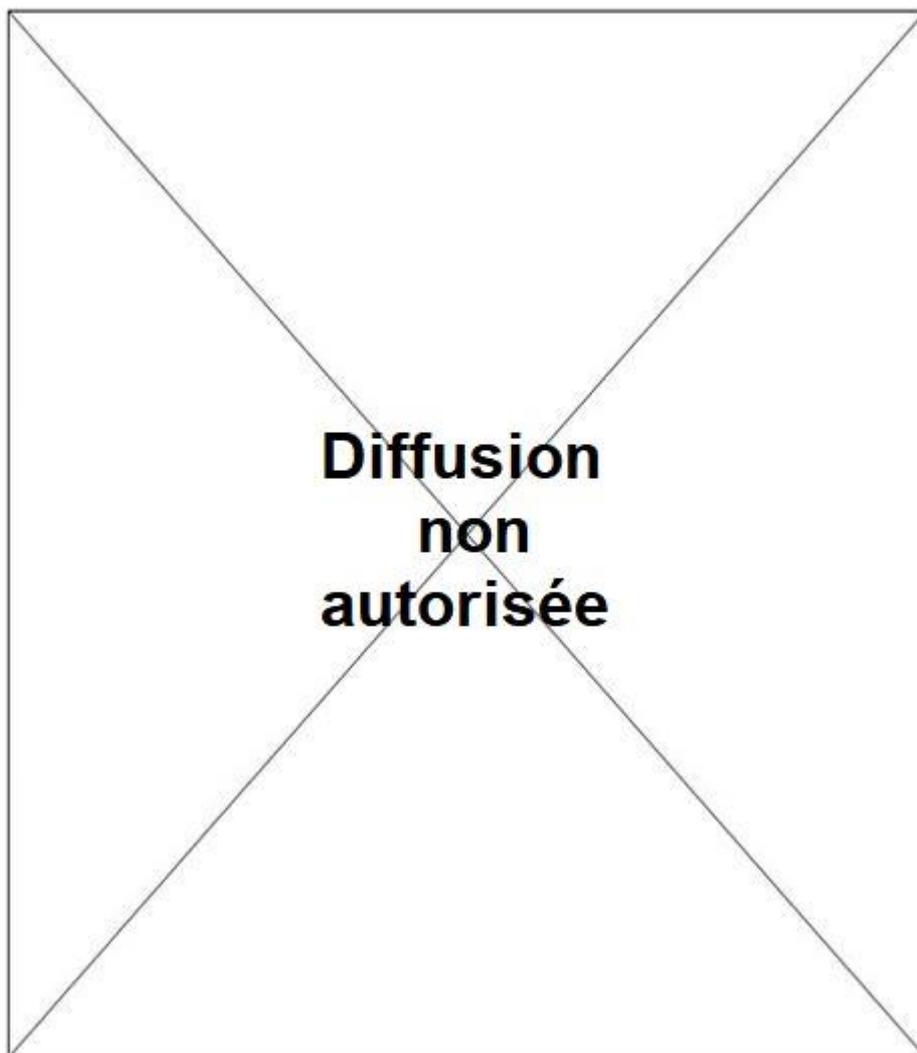


Figure 20 Photos de Microscopie Electronique à Transmission d'UMR 106 exposées pendant 24 h à du nitrate d'uranyle.

A : Photo d'un ostéoblaste exposé à 300 μ M pendant 24 h. N : noyau, mtc : mitochondrie. B : Organelles contenant des aiguilles d'uranium. Lys : lysosomes, MVB : corps multi-vésiculaire AV : vésicules autophagiques. Les flèches blanches indiquent les aiguilles d'uranium et le triangle blanc indiquent la double membrane des autophagosomes. Figure 3 de l'article (Pierrefite-Carle et al. 2017)

L'effet de l'uranium sur les ostéoclastes (OCs) est moins bien caractérisé. Mis à part quelques études *in vivo* suggérant une augmentation de la résorption (Ubios et al. 1991)(Bozal et al. 2005) via des analyses histo-morphométriques où via l'élévation du marqueur plasmatique de la résorption CTx (Kurttio et al. 2005), une seule étude *in vitro* s'est à ce jour intéressée à l'effet de l'uranium sur les OCs (Gritsaenko et al. 2017). Étonnamment, les conclusions de celle-ci vont à l'encontre de ce qui était supposé. En effet, une diminution de la capacité de différenciation et de résorption d'OCs primaires murins et d'OCs obtenus à partir de la différenciation de RAW 264.7 a été mesurée dès 2,5 μM et 5 μM d'acétate d'uranyle dans le milieu de culture, indépendamment de toute modification de l'expression de la cathepsine K, de TRAP et de la V-ATPase ou de l'autophagie. L'uranium y est également plus toxique pour les cellules primaires que pour RAW 264.7. Le mécanisme responsable de la réduction de l'activité des OCs est à ce jour encore inconnu mais pourrait être médié par p62, indépendamment de son rôle dans l'autophagie puisque son expression est augmentée avec l'exposition à l'uranium.

Enfin, à ce jour, aucune étude ne décrit l'effet de l'uranium sur les ostéocytes. C'est donc l'objet de cette étude.

C. EFFETS SUR LES AUTRES ORGANES

Le foie est un des organes touchés puisque l'intoxication à l'uranium modifie l'activité d'enzymes hépatiques, et interfère avec la métabolisation du paracétamol (Guéguen et al. 2007; Tissandie et al. 2007). L'uranium peut donc modifier le métabolisme des xénobiotiques et occasionner un sous- ou un surdosage de ces derniers. Dans le poumon, l'uranium induit un stress oxydatif, une transformation néoplasique et une instabilité chromosomique (Periyakaruppan et al. 2007; Xie et al. 2010). Il serait, chez les mineurs, à l'origine de fibroses pulmonaires pouvant évoluer vers un cancer (Yue et al. 2018). L'uranium altère la réponse immunitaire. Il réduit la densité des macrophages intestinaux et augmente l'expression de cytokines tels que l'IL-1 β après une exposition chronique à l'uranium dans l'eau de boisson de rats (Dublineau et al. 2007). Cet effet sur les macrophages est conforté par l'apoptose induite par l'uranium *in vitro* sur des macrophages murins J774 (Kalinich et al. 2002). Des effets sur la reproduction et les organes sexuels sont aussi observés avec une diminution du nombre de souriceaux des suites d'une élévation de la mortalité prénatale (Paternain et al. 1989; Souidi et al. 2009). L'uranium perturbe la maturation folliculaire des ovaires (Raymond-Whish et al. 2007) et le métabolisme de la testostérone des mâles (Grignard et al. 2008; Legendre et al.

2016). Une étude récente soulève également l'hypothèse de modifications épigénétiques héritées des ascendants et différentes selon le sexe (Elmhiri et al. 2018). Les auteurs ont en effet relevé une hypométhylation de l'ADN des ovaires et une hyperméthylation de l'ADN des testicules de souris dont les « grands-parents », les « parents » ou elles-mêmes avaient ingérées de façon chronique de l'uranium à hauteur de 40 mg/L dans l'eau de boisson.

Enfin, comme pour de nombreux métaux lourds, le cerveau est un organe cible de l'uranium. Dans le cerveau, l'uranium s'accumule préférentiellement dans le cortex, dans l'hippocampe et dans le thalamus de rats après une exposition chronique, via l'eau de boisson (Paquet et al. 2006), ou par l'implantation sous-cutanée de pastilles d'uranium appauvri (Pellmar et al. 1999). Il peut causer des modifications du comportement (Dinocourt et al. 2015) : après des inhalations répétées de 197 mg/m³ d'uranium (30 minutes, 4 jours par semaine pendant 3 semaines, taille médiane des particules : 2,53 µm de diamètre), la locomotion des rats est augmentée alors que leur mémoire spatiale est altérée 6 jours après l'arrêt de l'intoxication (Monleau et al. 2005). Par ingestion chronique, l'UA modifie le cycle circadien des rats (Lestaevel et al. 2005). Ces effets sont expliqués par une induction du stress oxydatif, induisant des dommages aux membranes cellulaires par l'oxydation lipidique (Briner et Murray 2005), une modification du système dopaminergique (Carmona et al. 2018) et par une excitabilité neuronale altérée (Dinocourt et al. 2017). Des travaux *in vitro* sur le fractionnement isotopique cellulaire établissent que les neurones incorporent préférentiellement l'²³⁵U que l'²³⁸U, mettant en lumière la possibilité de l'existence de mécanismes spécifiques de l'uranium (Paredes et al. 2016). Chez l'Homme, le syndrome de la guerre du Golfe chez certains soldats (perte de mémoire, étourdissements, perte d'équilibre, pour les symptômes neurologiques) est attribué à l'exposition à l'uranium des obus mais aucune étude à ce jour ne démontre clairement un lien de cause à effet.

II. MÉTAUX LOURDS ET OS

Comme l'uranium, d'autres métaux lourds affectent le métabolisme osseux. L'exposition chronique au cadmium (Cd) que l'on peut retrouver dans la nourriture semble être associée à une perte de densité osseuse et à l'ostéoporose (Gallagher et al. 2010; James et Meliker 2013). *In vivo*, il accélère la perte osseuse de souris ovariectomisées (Bhattacharyya et al. 1988). *In vitro*, le cadmium est responsable de cassures de l'ADN après 48 h, de l'augmentation du nombre de micronoyaux et de la mort cellulaire des ostéoblastes (Oliveira et al. 2014). L'intoxication au plomb, métal longtemps utilisé dans certaines peintures dans les années 50,

induit également une perte osseuse chez la souris. Cette perte s'effectue suite à la réduction de l'activation de la voie Wnt des OBs car les souris KO pour le gène SOST (inhibiteur de la voie Wnt) ne présentent pas cette perte (Beier et al. 2015). *In vitro*, l'IC50 du plomb sur les OBs varie de 25 μM à 120 μM et modifie l'expression de l'OCN et de la BSP selon la spéciation (**Tab. 8**). Comme pour l'uranium, des précipités de plomb sont aussi observés dans les cellules (Milgram et al. 2008b, a). De plus, l'inhibition de la capacité de minéralisations d'OBs primaires de calvaria murine exposés à 2 μM de Pb est diminuée via l'activation de la voie Wnt des OBs par le ligand Wnt3a (Beier et al. 2015).

Le cobalt (Co) et le chrome (Cr) sont aussi des métaux toxiques pour l'os. Lors de la pose d'une prothèse de hanche, celle-ci relargue des particules métalliques comme le chrome et le cobalt, pouvant être toxiques pour les cellules osseuses (Dalal et al. 2012). La toxicité de ces particules pourrait être une des raisons de l'ostéolyse induite par la pose de prothèses. En effet, le cobalt et le chrome sont toxiques pour les cellules de la lignée ostéoblastique. *In vitro*, le chrome et le cobalt induisent une cytotoxicité sur la lignée ostéoblastique SaOS-2 dès 100 μM pour le Co^{2+} , 10 μM pour le Cr^{6+} et 450 μM pour le Cr^{3+} (**Tab. 8**) (Andrews et al. 2011). De plus, la capacité de minéralisation de ces cellules est réduite avec ces trois métaux à 100 μM , et dès 10 μM pour le Cr^{6+} (Andrews et al. 2011). Le cobalt et le chrome sont aussi toxiques pour les ostéocytes. La viabilité des MLO-Y4, une lignée ostéocytaire est abaissée de 60 % à 100 μM de Cobalt par l'induction d'une nécrose cellulaire (Kanaji et al. 2014). Le nombre et la longueur des dendrites de ces cellules sont accrues avec 5 mM de Co^{2+} (Shah et al. 2017). Or, la dendricité des OSTs est importante pour le maintien des propriétés de mécano-transduction. La coadministration de cobalt et de cadmium diminue l'influx calcique induit par la mécano-stimulation par un *Fluid shear Stress*, altérant la capacité de mécano-transduction des cellules et la transcription de gènes importants pour la différenciation ostéocytaire : E11 et Cx43 (Shah et al. 2017). Enfin, sur les MLO-A5, une lignée d'ostéocytes précoces, les cellules synthétisent une matrice non minéralisée en présence de Cr^{3+} ou d'un mélange $\text{Co}^{2+}/\text{Cr}^{3+}$ dès 500 $\mu\text{g/L}$ soit un peu moins de 10 μM (Shah et al. 2017).

Tableau 8 Toxicité de métaux lourds sur les cellules osseuses.

Type cellulaire	Métal	Cytotoxicité à 24h	Référence
SaOS-2 (Lignée ostéosarcome humain)	Co ²⁺	IC50 : 35 µM	(Andrews et al. 2011)
	Cr ³⁺	IC50 : 2,2 µM	
	Cr ⁶⁺	Toxique à partir de 450 µM, IC50 non atteinte	
MG-63 (Lignée ostéoblastique humaine)	Cd	IC50 : 91 µM	(Oliveira et al. 2014)
MLO-Y4 (Lignée murine d'ostéocytes matures)	Co	Cytotoxique dès 50 µM, 40 % de viabilité à 100 µM	(Kanaji et al. 2014)
ROS17/2.8 (lignée d'ostéoblastes de rats)	Pb-cystéine	IC50 : 120 µM	(Milgram 2008)
	PbCO ₃	IC50 : 26 µM	
	Pb-albumine	Pas de toxicité observée jusqu'à 400 µM	
	Acétate de Pb	IC50 : 100 µM	

III. LA DÉTOXIFICATION DE L'URANIUM

La thérapie de chélation est utilisée dans le cadre d'empoisonnement à une grande variété de métaux lourds dans le but de minimiser leurs effets toxiques en favorisant leur élimination et/ou en diminuant leur fixation dans les tissus cibles (Andersen 1999). Le DTPA (Acide diéthylène triamine penta acétique) est historiquement utilisé dans le cas de contamination interne pour une variété de radionucléides mais son efficacité reste limitée sur l'uranium et nécessite une administration par injection. À ce jour, aucun décorporant commercialisé ne présente une efficacité majeure pour la détoxification interne de l'uranium. Un intérêt majeur est donc porté au développement de thérapies de chélation (aussi appelés décorporants) de l'uranium, non toxiques, et si possible, efficaces par administration orale (Fattal et al. 2015; Šömen Joksić et Katz 2015; Yue et al. 2018). En effet, la chélation de l'uranium est un enjeu sanitaire pour les travailleurs du nucléaire ainsi que les militaires en cas de contamination. Les paragraphes suivants décrivent les principaux agents chélatants de l'uranium et leur efficacité de décorporation.

A. LE DTPA

Le DTPA est considéré comme la référence et sert de contrôle dans la plupart des études *in vivo* qui s'intéressent au développement de nouveaux décorporants de l'uranium. Cependant, le DTPA doit être administré très rapidement après la contamination, lorsque l'uranium est encore majoritairement dans la circulation sanguine pour maximiser son efficacité car il traverse difficilement les membranes cellulaires (Fattal et al. 2015). Il se présente aussi sous forme de sels de calcium (Ca-DTPA) pour la décorporation du plutonium et de l'américium (James et al. 2007; Grappin et al. 2009), utilisation pour laquelle il a reçu une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) en 2008. Dans le cas d'une intoxication au MOX, le combustible nucléaire constitué de plutonium et d'uranium appauvri, le DTPA est la seule thérapie administrée. Cependant, comme indiqué précédemment, l'efficacité du DTPA sur la décorporation de l'uranium est très limitée. *In vivo*, il ne présente aucune efficacité lorsqu'il est administré par voie orale (*per os*) ou par voie intra-musculaire (*im*) (Paquet et al. 2003; Abergel et al. 2010). Par injection intra-péritonéale (*ip*) une heure après la contamination à l' $^{233}\text{U}(\text{U}(\text{VI})\text{O}_2)$, le Ca-DTPA diminue d'environ 20 % la quantité d'uranium fixé dans la totalité de l'organisme à 24 h, avec une réduction de 40 % de la quantité fixée dans le foie, mais sans modification de la rétention rénale ou osseuse (Abergel et al. 2010) (**Tab. 9**). Le DTPA ne permet donc pas de réduire la fixation de l'uranium dans ses tissus cibles majoritaires. Il n'est pas spécifique de l'uranium puisqu'il chélate également le calcium, le zinc, le magnésium, le cuivre, le fer... (Smith 2013).

B. LE 3,4,3-LI(1,2-HOPO)

De nouvelles molécules ont été synthétisées dans le but d'obtenir une meilleure efficacité de décorporation par voie orale pour permettre une administration facile et rapide. Le 3,4,3-LI(1,2-HOPO) en fait partie (**Fig. 21**) (appelé dans la suite du manuscrit HOPO par soucis de clarté). C'est un hydroxypyridinone dérivé de sidérophores de faible poids moléculaire (750,722 Da, $\text{C}_{34}\text{H}_{38}\text{N}_8\text{O}_{12}$) et qui présente une capacité de complexation avec l'uranium (Kullgren et al. 2013). Il n'est pas génotoxique et aucun signe de toxicité sur les rats n'est relevé jusqu'à 816mg/kg/jours de HOPO par voie orale pendant 28 jours (Abergel et al. 2010; Bunin et al. 2013). L'injection *iv* chez le rat de 30 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ de HOPO 1 h après contamination à l' ^{233}U (nitrate d'uranyle, 0,1 mol/L) diminue de 20 % la rétention de l'uranium dans le corps entier 48 heures après contamination et de 45 % la rétention de l'uranium dans le rein (Ramounet-Le Gall et al. 2003). Dans une autre étude conduite chez le rat, divers modes

d'administrations de l'uranium (0,84 $\mu\text{mol/kg}$) et du HOPO (30 $\mu\text{mol/kg}$) ont été testés (**Tab. 9**) pour étudier la distribution de l'uranium dans les tissus après 24 h (Henge-Napoli et al. 1995). L'efficacité la plus importante est observée lorsque le HOPO est administré par *im* dans les 5 minutes sur le point de la contamination : la fixation rénale est alors réduite de 77 % et de 54 % dans l'os. Ce décorporant est donc bien plus efficace que le DTPA. De plus, il reste efficace par voie orale (-25 % d'Uranium dans le rein) même s'il ne modifie pas dans ce cas-là la fixation dans l'os (Abergel et al. 2010) (**Tab. 9**). En 2014, la FDA (Food and Drug Administration) a donné son autorisation pour la conduite d'un essai clinique de phase I.

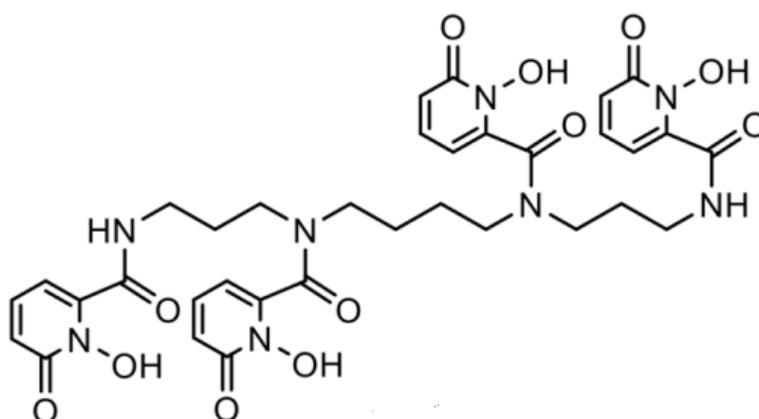


Figure 21 Structure moléculaire du 3,4,3-LI(1,2-HOPO).

C. AUTRES DECORPORANTS

Biphosphonates

Les biphosphonates tel que l'Ethane-1-hydroxy-1,1-bisphosphonate (EHBP) possèdent ont une forte affinité pour l'hydroxyapatite. L'EHBP est utilisé dans le traitement de l'ostéoporose et de la maladie de Paget car il inhibe la résorption osseuse (Francis 1995; Yue et al. 2018). *In vivo*, des données indiquent qu'il permet de prévenir les dommages rénaux et la léthalité induite par l'uranium (Ubios et al. 1994). De plus, il réduit l'accumulation d'uranium dans le rein principalement, et dans l'os s'il est administré par *im* sur le site de la contamination (**Tab. 9**) (Henge-Napoli et al., 1999).

Le bicarbonate de sodium (NaHCO₃)

Il est depuis longtemps utilisé pour le traitement d'une contamination à l'uranium. Il est administré en intra-veineuse lente ou oralement afin d'augmenter le pH urinaire et du tube proximal du rein jusqu'à 8.0-9.0. La formation de complexe U-bicarbonate est alors moins néphrotoxique, plus stable *in vivo*, et filtré plus rapidement par le rein (Yue et al. 2018). Le bicarbonate diminue la fixation rénale de l'uranium et permet de diminuer la néphrotoxicité **(Tab. 9)** (Henge-Napoli et al. 1995; Stephen Sugarman et al. 2017).

Les Calixarènes

Les calixarènes ont été développés dans le but de prévenir la pénétration de l'uranium pour une contamination cutanée. C'est une nano-émulsion qui chélate l'uranium en surface à hauteur de 80 % dans une solution aqueuse (Spagnul et al. 2010). La crème calixarène Cevidra vient de voir le jour en cette année 2018.

A ce jour, en cas de contamination à l'uranium, le traitement actuel est le bicarbonate de sodium. Il doit être administré le plus tôt possible après la contamination afin de maximiser la chélation de l'uranium et son excrétion. Cependant, comme nous venons de le voir, son efficacité est faible. La décorporation de l'uranium est encore limitée. Il y a donc un intérêt majeur à développer des molécules adaptées pour la chélation de l'uranium. L'os étant l'organe de stockage de l'uranium, le développement de nouvelles molécules doit donc prendre en compte leur efficacité de décorporation et leur toxicité sur le tissu osseux.

Tableau 9 Synthèse des données d'efficacité de décontamination des principaux décontaminants dans les différents organes.

NC = Non communiqué, ns = non significatif, iv = intraveineuse, im = intramusculaire, ip = intrapéritonéale

Espèce	Uranium		Décontaminant				% d'uranium fixé dans le tissu par rapport au contrôle non traité					Référence		
	Type	Dose	Administration	Décontaminant	Dose	Administration	Décali post-contamination	Décali post-intoxication pour l'observation de la distribution	Rein	Foie	Os		Corps entier	
rat	²³³ U: U(VI)O ₂	1,7 µg dans 0,2 mL	iv	Ca-DTPA	30 µmol/kg	ip	1 h	24 h	ns	59%	ns	79%	Abergel 2010	
					100 µmol/kg	per os			ns	ns	ns	ns		
				3,4,3-Li(1,2-HOPO)	100 µmol/kg	ip	1 h	24 h	18%	34%	72%	48%		
					200 µmol/kg	per os			75%	40%	ns	76%		
rat	MOX: (U-Pu)O ₂	1 mg	im	Ca-DTPA	30 µmol/kg	im	30 min, puis 1 injection par jour pendant 7 jours	8 jours	ns	ns	ns	ns	Paquet 2003	
					30 µmol/kg				14%	ns	ns	ns		
				3,4,3-Li(1,2-HOPO)	200 µmol/kg	im	1 h	48 h	1%	54%	NC	NC		80%
					30 µmol/kg				23%	NC	46%	NC		
rat	uranium	0,84 µmol/kg	iv	3,4,3-Li(1,2-HOPO)	30 µmol/kg	ip	5 min	24 h	54%	NC	NC	NC	Henge-Napoli 1995	
					30 µmol/kg	iv			immédiatement	21%	61%	67%		NC
				NaHCO ₃	640 µmol/kg	im	5 min	24 h	87%	NC	ns	NC		
					640 µmol/kg	ip	30 min	24 h	64%	NC	ns	NC		
				EHBP	100 µmol/kg	im	5 min	24 h	24%	NC	NC	70%		
					50 µmol/kg	ip	30 min	24 h	55%	NC	ns	89%		
rat	²³³ U: Nitrate d'uranyle	0,02 µmol/kg	im	EHBP	100 µmol/kg	ip	immédiatement	24 h	17%	NC	ns	68%	Henge-Napoli 1999	
					50 µmol/kg				55%	NC	ns	82%		

CHAPITRE I : CONSEQUENCES DE L'EXPOSTION A L'URANIUM NATUREL SUR LES CELLULES OSTEOCYTAIRES MLO-A5

I. PRESENTATION

Après avoir pénétré dans l'organisme, l'uranium est retenu pendant une longue période dans le tissu osseux. Les cellules osseuses se retrouvent en contact prolongé avec ce toxique, et notamment les ostéocytes puisque le renouvellement de cette population cellulaire est faible. Ces cellules, majoritaires dans l'os et étant capables de vivre pendant des années, jouent un rôle crucial dans l'orchestration du remodelage osseux et dans l'homéostasie phosphocalcique. L'effet de l'uranium sur le tissu osseux a été principalement étudié *in vivo* et sur les ostéoblastes *in vitro*. A notre connaissance, les effets de l'uranium n'ont jamais été caractérisés sur les ostéocytes. C'est l'objet de cette étude. Dans un premier temps, les effets d'une intoxication aiguë ont été caractérisés, et l'autophagie, phénomène impacté lors de l'exposition aiguë d'OBs à l'uranium (Pierrefite-Carle et al. 2016), a été étudié dans ce contexte. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux effets d'une intoxication chronique à l'uranium sur ces cellules. Nous avons choisi la lignée cellulaire des MLO-A5, qui caractérise des ostéocytes précoces en différenciation vers les OSTs matures. Ainsi, cette étude nous permet de déterminer l'effet de l'uranium sur la différenciation des OSTs, étape qui à long terme entraîne le renouvellement de la population des OSTs et favorise donc le maintien de l'homéostasie du tissu osseux.

II. ARTICLE EN COURS DE SOUMISSION

Ci-après figure l'article en cours de soumission pour le journal « Toxicological Sciences ».

Uranium effect on osteocytic cells in vitro

Lucile Hurault^a, Gaelle Creff^b, Agnès Hagège^c, Sabine Santucci-Darmanin^a, Sophie Pagnotta^d, Delphine Farlay^e, Valérie Pierrefite-Carle^{a*}, and Georges F. Carle^{a*}.

^aUMR E-4320 TIRO-MATOs CEA/DRF/BIAM, Université Nice Sophia Antipolis, Faculté de Médecine Nice, France ; ^bInstitut de Chimie de Nice, UMR 7272, Université Nice Sophia Antipolis - membre Université Côte d'Azur, Nice, France; ^cUniversité de Lyon, CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1, Institut des Sciences Analytiques, UMR 5280, Lyon, France; ^dCentre Commun de Microscopie Appliquée, Université Nice Sophia Antipolis, Nice, France ; ^eINSERM UMR 1033, Université de Lyon, Lyon, France.

Keywords: natural uranium, osteocytes, autophagy, mineralization

Correspondence to: Dr Georges F Carle, PhD, MATOs UMR E4320 CEA/UNS, Faculté de Médecine, Avenue de Valombrose, 06107 Nice Cedex 2, France. Phone : +33 4 93 37 76 80, email:carle@unice.fr

* contributed equally to this work

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Abstract

Once absorbed in the body, natural uranium (U(VI)), a radionuclide naturally present in the environment, is targeted to the skeleton which is the long term storage organ. We and others have reported the U(VI) negative effects on osteoblasts (OB) and osteoclasts (OC), the main two cell types involved in bone remodeling. In the present work, we addressed the U(VI) effect on osteocytes (OST), the longest living bone cell type and the more numerous (>90%). These cells, which are embedded in bone matrix and thus are the more prone to U(VI) long term exposure, are now considered as the chief orchestrators of the bone remodeling process.

Our results show that the cytotoxicity index of OST is close to 730 μM , which is about twice the one reported for OB and OC. However, despite this resistance potential, we observed that chronic U(VI) exposure in the micromolar range, led to a drastic decrease of the OST mineralization function. Gene expression analysis showed that this impairment could potentially be linked to an altered differentiation process of these cells. We also observed that U(VI) was able to trigger autophagy, a highly conserved survival mechanism. EXAFS (Extended X-Ray Absorption Fine Structure) analysis of OST cells exposed to U(VI) shows the transformation of this metal to an autunite phase following its uptake. Thus, our results demonstrate for the first time that OST mineralization function can be affected by micromolar U(VI) concentrations, suggesting that prolonged exposure could alter the central role of these cells in the bone environment.

Introduction

Uranium is a natural metal found in the environment which exhibits both a radiological and a chemical toxicity. Natural uranium is composed of three isotopes : 99.27% of ^{238}U , 0,72% of ^{235}U , and 0,006% ^{234}U . As the specific activity of ^{238}U is very low, its chemical toxicity is considered to be largely predominant. In most environmental systems, uranium is found at oxidation state +VI in its oxocationic form $\{\text{U(VI)}\text{O}_2^{2+}\}$ (called uranyl form and simply referred as "U(VI)" hereafter).

In addition to naturally occurring uranium, human activities can also enhance U(VI) presence into the environment. The use of phosphate fertilizers (Yamaguchi 2009), the presence of military zones (Giannardi and Dominici 2003) or industries involved in mining and uranium processing contributed to increase its presence in the environment.

For the general population, food and drinking water are the main sources of U(VI) exposure (Prat 2009). Most U(VI) entering the body is eliminated in the faeces (WHO 2001). Absorbed U(VI) is deposited throughout the body with highest levels found in bones, liver, and kidneys. Sixty-six percent of the uranium present in the body is found in bones where it is stored for long term (Leggett 1994; Paquet 2006). Most of the U(VI) which is not in bones leaves the body in 1-2 weeks (Keith 2013). Bone tissue is composed of a mineralized matrix and three cell types: osteoclasts (OC), in charge of bone resorption, osteoblasts (OB), involved in bone matrix production and mineralization, and osteocytes (OST), embedded in bone matrix and considered as the major local orchestrator of bone remodeling (Schaffler 2014). U(VI) is supposed to be trapped in bone matrix through an exchange of the uranyl ion with calcium ions at the surface of apatite mineral crystals (Leggett 1994; Rodrigues 2013; Bourgeois 2015). Due to bone remodeling, which is constant throughout life, U(VI) can be

transiently released from the matrix and bone cells can be locally exposed to high concentrations of this metal (Tasat 2007).

In OC, we have previously shown that U(VI) concentrations in the μM range are able to inhibit *in vitro* differentiation, mature OC survival and mineral resorption (Gritsaenko 2017 and 2018). In OB, we and others demonstrated that U(VI) induces ROS generation and reduced alkaline phosphatase activity (Tasat 2007), oxidative DNA lesions (Miller 2002) and a decreased mineralization capacity, even at subtoxic concentrations (Pierrefite-Carle 2017). In addition, we showed that U(VI) is able to transiently induce autophagy, a survival process triggered by various stresses such as metal exposure (Pierrefite-Carle 2017).

Although OST represent between 90% to 95% of the cellular components present in bone, the effect of U(VI) has never been explored in this cell type. This is all the more interesting as the osteocytes have an extended lifespan and are likely to be chronically exposed to U(VI) stored in bones.

In the present work, we analyzed the effect of U(VI) on the MLO-A5 osteocytic model cell line. Using spectroscopic and thermodynamic tools, we characterized the speciation of uranium (i.e. its chemical form and molecular environment) after OST uptake following a 24h-exposure. We also determined whether U(VI) was able to trigger an autophagic response in these cells.

In addition, we analyzed U(VI) effects on OST mineralization function and gene expression upon chronic exposure.

Materials and methods

Cell culture

The MLO-A5 (Murine-Like Osteocytes) cell line obtained from Linda Bonewald lab (Kato 2001) was maintained sub-confluent at 37°C, 5% CO₂ using rat-tail collagen I (Sigma-Aldrich) coated flasks, in α MEM with nucleotides and Ultraglutamine (BE02-002F, Lonza) supplemented with 1% Penicillin/Streptomycin (P/S, Sigma-Adrich), 5% heat-inactivated Fœtal Bovine Serum (FBS: Hyclone SH30071.03 GE Healthcare) and 5% heat inactivated Calf Serum (CS: Hyclone SH30072.03, GE-Healthcare). Cells were used within a maximum of four passages after thawing from liquid nitrogen storage, and were passed every three to four days. In order to assess their mineralization function, MLO-A5 cells were plated at 30000 cells/cm² on rat-tail collagen-I (Sigma-Aldrich)-coated-24-well-plates. At confluency, the media was replaced with α MEM containing nucleotides and Ultraglutamine (BE02-002F, Lonza) supplemented with 1% P/S, 10% Heat-inactivated FBS, 4 mM β -glycerophosphate (Sigma-Aldrich) and 100 μ g/mL ascorbic acid (Sigma-Aldrich). This mineralization medium was changed every two to three days.

Natural uranium exposure

Uranium solutions were prepared extemporaneously in conditions allowing the control of uranyl speciation in exposure media. To stabilize uranium species, uranyl acetate 100 mM stock solution (provided by the Institut de Chimie de Nice) was diluted to 10 mM for acute exposure and 1 mM for mineralization exposure in cold sodium bicarbonate 100 mM (Gibco, LifeTechnologies). These solutions were left three hours at room temperature (RT) before dilution at working concentration in exposure media. Another 3 hour-resting time at RT was performed before being added to MLO-A5 cells.

When exposed 24 h to uranyl, cells were cultured in MEM media (Sigma) containing 0.5% FBS, 0.5% CS and 1% glutamine. For exposure during mineralization, uranium was diluted in the mineralization media described in the culture section. Control solutions without U(VI) were made following the same procedure. After IC50 determination, U(VI) sub-lethal exposure-concentrations were chosen.

Mineralization analysis

Mineralization was analysed after a 7-day culture in 24-well plates. After fixation in 4% formaldehyde solution for 10 minutes at room temperature, cells were rinsed with water before staining with 1% Alizarin red S dye (Alfa Aesar) for another 10 minutes. After rinsing thoroughly with deionized water, cells were left to dry at room temperature and representative pictures were taken. To quantify mineralization, Alizarin Red S staining was solubilized at 37°C in 10% Cetylpyridinium-chloride (Sigma-Aldrich) diluted in Phosphate Buffer Saline (PBS, Sigma-Aldrich) and absorbance was measured at 557 nm using a microplate reader SPECTROstar Nano plate reader (BMG Labtech).

Transmission electron microscopy and STEM-EDX analysis

MLO-A5 were fixed with 1.6% Glutaraldehyde (Sigma-Aldrich) in 0.1 M phosphate solution immediately after medium removal. Cells were rinsed with 0.1 M cacodylate buffer and post-fixed for 1 h in the same buffer containing 1% osmium tetroxide. After rinsing with distilled water and progressive dehydration with increasing ethanol concentration solutions, cells were embedded in epoxy resin.

For TEM images, ultrathin sections (70 nm) were realized and put on Formvar-coated copper grids. Grids were stained with uranyl acetate and lead citrate before examination of sections with a Jeol JEM 1400 transmission electron microscope equipped with a SIS MORADA camera.

For high-resolution transmission electron microscopy (HRTEM), ultrathin sections (70 nm) were deposited on nickel grids (200 mesh; Electron Microscopy Sciences, G200-Ni), coated with Formvar (Electron Microscopy Sciences, 15820-25), and Holey carbon film (Electron Microscopy Sciences, HC200-Cu). Samples were analyzed on an HRTEM microscope (JEOL 2100F, Japan) with an acceleration voltage of 200 kV, and energy dispersive X-ray (EDX) spectroscopy. HRTEM images were digitally recorded with a Gatan Ultrascan 1000 camera (Gatan, Pleasanton, USA), with acquisition software Gatan Digital Micrograph. The analysis system was EDS-SDD Oxford X-Max (Oxford Instruments, Abingdon, Oxfordshire, UK).

Elemental calcium analysis with ICP-OES

After mineralization, MLO-A5 cells were dried at room temperature and were rinsed 3 times using 65% concentrate nitric acid (3x1 mL). Each solution was evaporated to dryness on a hotplate after being heated to 120°C during 3-4 h and re-dissolved into a nitric acid solution at pH 1 before being measured by ICP-OES (Perkins Elmer Optima 8000). Calibration curve was previously recorded using the following calcium concentrations: 0, 1, 2, 5, 10 and 25 mg/L. Calcium quantification was performed at 315.89 and 317.93 nm wavelengths.

ICP/MS analysis

After mineralization, MLO-A5 were dried at room temperature and rinsed 3 times using 65% concentrated nitric acid (3x1 mL). Each solution was evaporated to dryness on a hotplate after being heated to 120°C during 3-4 h and re-dissolved into a nitric acid solution at pH 1. After appropriate dilutions in HNO₃ 1 mM, samples were injected via a peristaltic pump equipped at 400 µL/min flow rate and nebulized by a microconcentric nebulizer (Micromist). A 7700x ICP/MS (Agilent) was used as elemental detector.

Uranium was detected at $m/z = 238$ and quantified using external standards (PlasmaCAL). Between analyses, the system was rinsed for 30 s with HNO_3 1 mM and 30 s with water and a blank was injected to control the absence of any memory effect.

Protein extraction and Western blot analysis

Cells were washed with PBS, scrapped in ice-cold PBS, and centrifugated at 5000g for 10 minutes. The cell pellet was re-suspended in the lysis buffer (Laemmli: 60 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2 % sodium dodecyl sulfate (SDS), 100 mM DTT and 0.01 % bromophenol blue) complemented with EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics). Samples were sonicated by applying 50 cycles (15 seconds on, 30 seconds off) in a sonication bath. After electrophoresis using a 14%-SDS-polyacrylamide gel, proteins were transferred on a PVDF membrane (Immobilon, Millipore). Membranes were then blocked with 5% (1% for Actine) non-fat milk in TBS (Tris-buffered saline) and incubated with primary antibodies for 12 h at 4°C in 5% non-fat milk in TBS-T (Tris-buffered saline-0.05 % Tween 20). Primary antibodies used in this study were mouse monoclonal anti-LC3 antibody (MBL, Clinisciences, M186-3, 1/1250), goat polyclonal anti-podoplanin antibody (R&D Systems, AF3244, 1/2000) and mouse monoclonal anti- β actin antibody (Sigma-Aldrich, clone AC-15, 1/100000). Blots were then washed in TBS-T, incubated for 45 min at room temperature with appropriate secondary antibodies conjugated to horseradish peroxydase and washed again prior to signal detection with the "ECL-Plus" chemilumiscent detection kit (Thermo Scientific). Signal quantification was performed using the ImageJ software.

Viability & metabolic activity tests

Live/Dead® Viability/cytotoxicity Kit for mammalian cells (Molecular probes) was used

to determine U(VI) cytotoxicity on MLO-A5 cells. Cells were seeded on glass slides at 5000 cells/cm² and exposed to U(VI). Cells were washed in PBS and incubated 30 to 45 minutes at room temperature in a dark humidified chamber with Live/Dead solution (PBS, 1 μ M Calcein-AM, 2 μ M Ethidium homodimer-1). Cells were observed on glass slides with a fluorescence microscope. At least 200 cells were counted for each condition (5 fields for each slide as presented in the results section, 2 glass slides replicas for each) of the four experiments. The concentration of U(VI) leading to 50% of cell death after 24 h exposure i.e. CI₅₀ (Cytotoxic Index 50) was determined using a dose-response curve.

CellTiter ® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) i.e. an MTS assay was used to assess metabolic activity of MLO-A5 during mineralization. Briefly, at 7 days of mineralization, media containing U(VI) was removed, cells were rinsed once with PBS and were then incubated with MTS solution in culture media for 1 to 2 hours according to the manufacturer instructions. Supernatants were transferred into a new plate and absorbance was measured at 490 nm using a SPECTROstar Nano microplate reader (BMG Labtech).

EXAFS analysis

Sample preparation

MLO-A5 were exposed to 600 μ M U(VI) during 14 or 24 hours, as described in the Natural Uranium exposure section. Cells were trypsinised (Trypsin-EDTA, 0.05%, Gibco) and centrifuged at 1200 rpm for 5 minutes, resuspended twice in PBS. The pellet was then fixed in 0.1 M cacodylate 1% glutaraldehyde for 30 minutes at room temperature. After PBS washing, cells were simply mixed and grounded with polyethylene powder (PE, Sigma Aldrich). The mixture was pressed to obtain a pellet.

Data acquisition, processing and analysis

EXAFS experiments at the U LIII-edge were performed on the MARS beam line at the SOLEIL synchrotron facility (2.75 GeV; 400 mA), which is the French bending magnet beam line dedicated to the study of radioactive materials (Sitaud, 2012). All the measurements were recorded in fluorescence mode using a 13-element high purity germanium solid-state detector. Data were processed with the Athena code (Ravel, 2005). The extracted EXAFS signal was fitted in R space, using theoretical models, by use of the Artemis code (Ravel, 2005). In all the fits, only one global amplitude factor and one energy threshold factor were considered for all the scattering contributions. Hanning windows with k^2 [2.8; 11.5 Å⁻¹] and fitting range with R [1.0; 5.0 Å] were selected. Phases and amplitudes were calculated with Feff9 code (Rehr, 2010) using the the crystal structure of uranyl phosphate (autunite phase) $\text{Ca}[(\text{UO}_2)(\text{PO}_4)]_2(\text{H}_2\text{O})_{11}$ (Locock, 2003). The first two single scattering paths correspond to the 2 axial oxygen atoms O_{ax} and to the equatorial oxygen atoms O_{eq} . Additional single scattering path corresponding to phosphorous (U...P) was also added to account for the third coordination shell. Several multiple scattering paths were also needed: triple and quadruple paths involving axial (U... O_{ax} ...U... O_{ax}), and equatorial oxygens (U...P... O_{eq}), (U... O_{eq} ...U... O_{eq}) and (U... O_{distal} ... O_{eq}). During the fit procedure, the total coordination number (N) of the oxygen atoms was fixed to 2 (axial) + 5 (equatorial) as the usual coordination mode for uranyl. Only one global amplitude factor S_{O_2} and one energy threshold factor e_0 were used for all paths. The r-factor (in %) and quality factor χ^2/n of the fit are both provided as an indication of fit quality in the R space.

Quantitative RT-PCR analysis

Total RNA from MLO-A5 cells were prepared using TRIzol reagent (Life Technologies) following the manufacturer's instructions. Reverse transcription (RT) was performed using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen), 1 µg of RNA and random hexamer primers (Invitrogen). Triplicates of each 10-fold diluted cDNAs were subjected to real-time PCR analysis in an ABI PRISM 7000 system (Applied biosystems). Reactions were performed in a final volume of 20 µl using 5 µl of diluted cDNAs and MESA GREEN qPCR Mastermix Plus (Eurogentec). Amplification was realized using the following conditions: 95°C, 2 min followed by (95°C, 15s, 60°C, 1 min) cycled 40 times. PCR primers used are described in Table 1. Cycle thresholds (Ct) were obtained graphically (ABI PRISM 7000 Sequence Detection System version 1.2.3) ΔCt values were then calculated by subtracting the Ct value of the endogenous reference gene Rplp0 (Acidic Ribosomal Phosphoprotein P0, protein 36B4). Relative expression was calculated as $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, $\Delta\Delta\text{Ct}$ being the difference between ΔCt of a target gene and ΔCt of the same gene without uranium. Values presented are means \pm standard deviations from 3 experiments

Statistical analysis

The results are expressed as mean \pm SD and comparisons were performed using Kruskal Wallis test using GraphPad Prism 7.00. P values less than 0.05 were considered significant.

Results

Cytotoxicity of U(VI) in the osteocytic MLO-A5 cell line

The cytotoxicity of U(VI) was assessed in the MLO-A5 cell line using the Live/dead[®] test after a 24-h exposure. Representative fields observed for each U(VI) concentration are presented in Figure 1A. No cytotoxicity was induced with the control containing bicarbonate alone (U(VI) 0 μ M) or with U(VI) up to 400 μ M. As shown in Figure 1B, a 50% loss of viability (CI_{50}) was observed at 730 μ M of U(VI). We decided to use 400 μ M and 600 μ M corresponding to 100% and 76% cell viability respectively, as sub-toxic U(VI) concentrations for the upcoming experiments.

Uranium subcellular localization and speciation in osteocytes

Using transmission electron microscopy (TEM), we assessed the subcellular localization of U(VI) in MLO-A5 cells. Uranium was found as needle-like structures observed within the cell and in the extracellular medium, when the cells were treated with 400 or 600 μ M for 14 or 24h (Fig 2). These needle-like structures evoking crystals were not observed in the absence of U(VI) or at a 200 μ M concentration (data not shown). Within the cells, these needle-like structures were found mostly inside vesicles presenting the characteristic features of lysosomes or autophagic vesicles (AV), and seem to be secreted toward the extracellular compartment. At 600 μ M, we also observed a dilatation of the endoplasmic reticulum (ER), suggesting an accumulation of misfolded protein in the ER lumen, called ER stress.

To determine needle composition, high-resolution TEM – Energy-dispersive X-ray spectroscopy (HRTEM-EDX) was performed and confirmed the composition of these crystal-like structures as uranium and phosphorus (Fig 3B). To determine U speciation within the needles, an EXAFS spectrum (Fig 3C) was recorded on MLO-A5 cells “bulk”

exposed to a 600 μM U(VI) solution, during 24h. Using this approach, only average speciation is determined (in the case of a mixture of species, EXAFS averages the signal over all the different central atom environments). The k^2 -weighted EXAFS experimental signal of U(VI)-MLO-A5 as well as the adjusted signal are shown in Figure 3C. Based on the previously results obtained on uranium biomineralization in osteoblasts cells (Pierrefite-Carle 2017), an autunite structure model, $\text{Ca}(\text{UO}_2)_2(\text{PO}_4)_n\text{H}_2\text{O}$ ($10 < n < 12$), was used to fit the experimental spectrum. The U(VI) first coordination sphere is composed of 2 O_{ax} atoms and 5 O_{eq} (Phos + water). The best fit parameters are in very good agreement with the autunite structure: 2 O_{ax} at 1.76 Å, 4 O_{eq} at 2.28 Å and 2.8 P at 3.58 Å.

These data seem to indicate a biotransformation of uranium carbonate species (which represent the main speciation of uranium in the exposition medium) to an autunite form inside MLO-A5 cells.

Effect of U(VI) on autophagy level in osteocytes

As recently demonstrated, the autophagic process is affected in osteoblasts exposed to uranium (Pierrefite-Carle et al., 2017). Moreover, uranium-containing needle-like structures were observed in autophagic vesicles suggesting a potential role of autophagy in the osteocyte response to U(VI). We analyzed the autophagic process in MLO-A5 cells after a 24 h uranium exposure by quantifying the LC3-II protein level by Western blot. Upon autophagy induction, the essential autophagy protein microtubule-associated protein 1 light chain 3 protein (LC3-I) is lipidated into LC3-II protein and inserts into autophagosome membrane (Klionsky 2012). As a consequence, LC3-II protein level is used as a marker reflecting the number of autophagosomes. As shown in Figure 4, LC3-II protein level increases after a 24h exposure at 400 and 600 μM U(VI) suggesting an increase in the number of autophagosomes. This increase in LC3-

II protein level can result from an autophagy induction or a blockade of the autophagic degradation process. To discriminate between these two hypothesis, we used Bafilomycin A1 which inhibits the late steps of the autophagic process. In Bafilomycin A1 treated-cells, LC3-II was further enhanced in all the conditions, indicating that the autophagic degradation process was not previously inhibited. These results indicate that a 24 h exposure to U(VI) induces autophagy in MLO-A5 cells.

Effect of U(VI) chronic exposure on MLO-A5 mineralization

As osteocytes are long-lived cells which are exposed to various toxicants which can be trapped in the bone matrix, we next analyzed the effect of U(VI) chronic exposure on osteocyte mineralization. MLO-A5 cell mineralization in the presence of different U(VI) concentrations was assessed using Alizarin Red S staining. As shown in Figure 5A and B, after 7 days in mineralizing conditions, mineralization is inhibited starting at 2 μM and a loss of 90% of mineralization is observed at 2.5 and 5 μM . This mineralization inhibition is not due to cell death as cell viability is only decreased by 10 to 20 % for U(VI) concentrations higher than 2 μM (Fig 5C). Calcium content analysis using ICP-OES exhibits the same trend as the Alizarin red S quantification, with a significant decrease observed from 2 μM to 5 μM (Fig 5D). Inversely, U(VI) content increases with increasing U(VI) concentrations, except for 5 μM (Fig 5E). Globally, a decreased calcium content is observed concomitantly with an increased U(VI) content from 0.5 to 2.5 μM U(VI) concentrations. Altogether, these data indicate that chronic U(VI) exposure in the μM range affects the mineralization function of osteocytes without affecting cell viability.

Effect of U(VI) chronic exposure on MLO-A5 gene expression

In order to try to understand how U(VI) is affecting OST function, we next assessed the mRNA expression of several genes involved in OST differentiation and mineralization. Although the expression of phosphate regulating endopeptidase homolog X-linked (*Phex*) and *podoplanin/E11* was not significantly affected by the presence of U(VI) whatever the concentration, dentin matrix protein 1 (*Dmp1*) and osteopontin (*Opn*) expression were drastically repressed at 5 μ M. Conversely, the expression of the osteoblast marker genes *Coll1 α* and *Ocn* was increased.

As *E11* mRNA and protein levels were recently shown to be potentially differentially regulated (Staines 2017), a western blot analysis of E11 protein was performed in the same conditions (Figure S1). A slight but significant decrease was observed in E11 protein expression in MLO-A5 cells exposed to 5 μ M of U(VI).

Discussion

As various compounds, such as heavy metals, can be fixed on mineralized matrix, bone can be considered as an "environmental memory" of individual's life exposure. Thus, OST, which represent 95% of the cells within the bone matrix and survive throughout the life of the organism, are chronically exposed to these toxicants. Understanding their effects is all the more important as OST are now considered as the master orchestrators of bone remodeling (Schaffler 2014). U(VI), as other heavy metals, can accumulate in bone and several studies have been performed to analyze U(VI) effects in bone cells in vitro (Arzuaga 2015). However, to the best of our knowledge, none of them focused on OST.

In the present study, we analyzed U(VI) effect in the osteocytic model cell line MLO-A5. While the U(VI) CI_{50} is in the range of 400 μ M in different osteoblastic cell lines (Pierrefite-Carle 2017; Milgram 2008b), this concentration has no significant effect in MLO-A5 cells, suggesting a relative resistance to U(VI) toxicity.

Needle-like U(VI) structures have been observed by TEM analysis inside and outside the cells exposed for 14 or 24 h to 400 or 600 μ M of U(VI). Such structures have previously been described in ROS 17/2.8 and UMR-106 osteosarcoma cells (Milgram 2008a; Pierrefite-Carle 2017), renal epithelial cells (Mirto 1999; Carrière 2008) as well as in embryonic zebrafish fibroblasts (Pereira 2012). Characterization of these needle-like structures by EDX spectroscopy clearly shows the presence of uranium and phosphorus elements. Moreover, EXAFS analysis seems to detect the presence of an autunite form inside the MLO-A5 cells. Interestingly, the presence of autunite had been previously described in different bacterial strains exposed to U(VI) (Merroun 2011; Yung 2014; Morcillo 2014; Newsome 2015) and more recently in osteoblastic cells in

the presence of U(VI) (Pierrefite-Carle 2017). Biotransformation of U(VI) into this autunite form was proposed as a resistance mechanism in bacteria (Yung 2014).

TEM observations indicate that needle-like U(VI) structures are present within lysosomes and autophagosomes. Then, we demonstrated that uranium was able to stimulate autophagy in MLO-A5 cells, as previously described in the UMR-106 osteoblastic cell line (Pierrefite-Carle 2017). However, while an autophagic flux inhibition was observed after a 24 h U(VI) exposure in osteoblastic cells, this was not the case in the MLO-A5 osteocytic cell line. As autophagy is a cell survival mechanism, the maintenance of an active process in the presence of U(VI) could participate to the high resistance level observed in MLO-A5 cells.

As OST are long-lived cells which are more prone to be chronically exposed to U(VI), we next analyzed U(VI) effect during the mineralization process characteristic of early OST function (Kato 2001). The observed 90% mineralization decrease at U(VI) concentrations which modestly affect cell viability (20%) indicate that cell death is not responsible for this altered OST function. The concomitant calcium content decrease and U(VI) content increase suggest that U(VI) could partially replaced calcium in phosphate complexes as previously described (Leggett 1994; Rodrigues 2013; Bourgeois 2015; Pierrefite-Carle 2017).

We next assessed U(VI) effect on mRNA expression of several genes involved in OST differentiation and mineralization. We observed a decreased expression of the osteocyte-marker genes *Dmp1*, while the expression of the osteoblast-marker genes *Coll1 α* and *Ocn* was increased. These results suggest that U(VI) exposure at 5 μ M promotes retention of a late-osteoblast stage of differentiation and prevents further osteocytic differentiation. A similar expression profile was reported in the MLO-A5 cell line cultured in the presence of the mineralization inhibitor sodium pyrophosphate, indicating that mineralization is required for OST differentiation (Prideaux 2012). These

data suggest that U(VI) inhibitory effect on mineralization could be involved in the observed altered differentiation capacity of MLO-A5 cells.

In addition, the drastic decreased expression of *Opn* and *Dmp1* observed in RT-PCR experiments suggests that U(VI) could directly target the *Dmp1* and *Opn* proteins in OST. In this context, OPN excretion was affected by U(VI) in kidney cells and OPN was recently shown to exhibit a high affinity for U(VI) (Qi 2014; Huynh 2016). Further studies are required to determine whether DMP1 displays a similar affinity for U(VI). Whatever the mechanism involved in this effect, a decreased expression of both proteins was also observed in growing rats chronically exposed to natural uranium via drinking water (Wade-Gueye 2012).

In conclusion, we report for the first time the effect of U(VI) in an osteocyte model cell line upon acute and chronic exposure. During an acute exposure, OST are capable of transforming U(VI) into an autunite phase detected in needle-like structures while activating the autophagy pathway, two processes potentially involved in toxicity reduction. Chronic U(VI) exposure in the micromolar range led to a drastic decrease of the OST mineralization function suggesting that prolonged exposure could alter the central role of these cells in the bone environment.

Acknowledgments

The authors would like to thank Claude Vidaud, and Christophe Den Auwer for helpful discussions. They also would like to acknowledge Xavier Jaurand who performed the high resolution electron microscopic/X-rays microanalysis study at the Center Technologique des Microstructures (CT μ , Lyon, France). This work was supported by grants from the “*Commissariat à l’Energie Atomique et aux Energies Alternatives*” (CEA – “*Programme Transversal de Toxicologie Nucléaire*”), from the “*Direction Générale de l’Armement - CEA PhD fellowship program*”, and from the *Agence Nationale pour la Recherche* (ANR-16-CE34-0003-01). The MARS beam line of SOLEIL synchrotron (Gif sur Yvette, France) was used to perform XAS experiments.

Figure legends

Figure 1. U(VI) Cytotoxicity in the MLO-A5 osteocytic cell line. (A) Cytotoxicity of U(VI) analyzed in MLO-A5 cells using the Live/dead[®] test. Representative fields obtained after a 24h-U(VI) exposure. Red cells are dead and green cells are alive (x10 magnification, scale bar 100 μ m). (B) CI50 determination using Live/Dead[®] method. Histograms represent mean \pm SD of 4 independent experiments.

Figure 2. TEM analysis of the MLO-A5 cells after a 14 or 24 h U(VI) exposure. Analysis of MLO-A5 cells following exposure to U(VI) at 400 μ M (A) or 600 μ M (B). The area included in the black square is enlarged. Black arrows indicate U(VI) needle-like structures. White arrows indicate autophagic vesicles. N = nucleus, * = endoplasmic reticulum.

Figure 3. HRTEM-EDX analysis on crystal-like structure and EXAFS spectra of U(VI) in MLO-A5 cells. (A) High-resolution transmission electron microscopy of the crystal-like structures. (B) X-ray microanalysis indicating the components of the crystal-like structures. (C) EXAFS spectra in $k^2\chi(k)$ at the U L_{III} edge of U(VI)-MLO-A5. Experimental = straight line, fit = dotted line.

Figure 4. Autophagy analysis by Western blot of LC3-II protein in MLO-A5 cells after U(VI) exposure. Western blot of LC3 and β -actin following a 24 h exposure to U(VI) at 400 or 600 μ M. Histograms represent mean LC3-II to β -actin relative levels (n=3 independent experiments). Baf: Bafilomycin A1.

Figure 5. Mineralization analysis in the MLO-A5 osteocytic cell line in the presence of various U(VI) concentrations. Mineralization of MLO-A5 cells after 7 days in the presence of U(VI) concentrations ranging from 0.5 μ M to 5 μ M. Mineralization medium (MM) containing U(VI) was added on D0 and changed on D3 and D6 as shown. (A) Mineral deposits are visualized using Alizarin red staining. (B) Mineralization quantification after CPC dissolution of Alizarin. Histograms represent the mean of 4 independent experiments. (C) Viability of MLO-A5 cells determined by the assessment of metabolic activity using MTS assay. Histograms represent the mean of 4 independent experiments (D) Calcium quantification by ICP-OES. Histograms represent the mean of 3 independent experiments. (E) Uranium content analyzed by ICP-MS. Histograms represent the mean of 3 independent experiments.

Figure 6. Gene expression analysis after mineralisation in the presence of various U(VI) concentrations. *Phex*, *E11*, *Opn*, *Dmp1*, *Ocn* and *Coll1 α* mRNA expression quantified by RT-PCR in MLO-A5 cells cultured for 7 days in mineralizing conditions in the presence of U(VI) concentrations ranging from 0 μ M to 5 μ M. Results are expressed as mean \pm SD of 3 independent experiments. * $P < 0.05$ compared to the control condition in the absence of U(VI).

Figure S1. E11 protein level analysis in MLO-A5 cells after mineralisation in the presence of various U(VI) concentrations. Western blot of E11 and β -actin in MLO-A5 cells cultured for 7 days in mineralizing conditions in the presence of U(VI) concentrations ranging from 0 μ M to 5 μ M. Histograms represent the mean of E11 to β -actin relative levels of 3 independent experiments. * $P < 0.05$

References

- Arzuaga, X., Gehlhaus, M., and Strong, J. (2015). Modes of action associated with uranium induced adverse effects in bone function and development. *Toxicol. Lett.* 236, 123–130.
- Bourgeois, D., Burt-Pichat, B., Le Goff, X., Garrevoet, J., Tack, P., Falkenberg, G., Van Hoorebeke, L., Vincze, L., Denecke, M.A., Meyer, D., et al. (2015). Micro-distribution of uranium in bone after contamination: new insight into its mechanism of accumulation into bone tissue. *Anal Bioanal Chem* 407, 6619–6625.
- Carrière, M., Proux, O., Milgram, S., Thiebault, C., Avoscan, L., Barre, N., Den Auwer, C., and Gouget, B. (2008). Transmission electron microscopic and X-ray absorption fine structure spectroscopic investigation of U repartition and speciation after accumulation in renal cells. *J. Biol. Inorg. Chem.* 13, 655–662.
- Giannardi, C., and Dominici, D. (2003). Military use of depleted uranium: assessment of prolonged population exposure. *J Environ Radioact* 64, 227–236.
- Gritsaenko, T., Pierrefite-Carle, V., Lorivel, T., Breuil, V., Carle, G.F., and Santucci-Darmanin, S. (2017). Natural uranium impairs the differentiation and the resorbing function of osteoclasts. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1861, 715–726.
- Gritsaenko, T., Pierrefite-Carle, V., Creff, G., Vidaud, C., Carle, G., and Santucci-Darmanin, S. (2018). Methods for Analyzing the Impacts of Natural Uranium on In Vitro Osteoclastogenesis. *J Vis Exp*.
- Huynh, T.-N.S., Vidaud, C., and Hagège, A. (2016). Investigation of uranium interactions with calcium phosphate-binding proteins using ICP/MS and CE-ICP/MS. *Metallomics* 8, 1185–1192.
- Kato, Y., Boskey, A., Spevak, L., Dallas, M., Hori, M., and Bonewald, L.F. (2001). Establishment of an osteoid preosteocyte-like cell MLO-A5 that spontaneously mineralizes in culture. *J. Bone Miner. Res.* 16, 1622–1633.
- Keith, S., Faroon, O., Roney, N., Scinicariello, F., Wilbur, S., Ingerman, L., Lladós, F., Plewak, D., Wohlers, D., and Diamond, G. (2013). *Toxicological Profile for Uranium* (Atlanta (GA): Agency for Toxic Substances and Disease Registry (US)).
- Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, Adeli K et al (2012) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 8:445–544
- Leggett, R.W. (1994). Basis for the ICRP's age-specific biokinetic model for uranium. *Health Phys* 67, 589–610.
- Locock A, Burns PC (2003) The crystal structure of synthetic autunite, Ca [(UO₂)(PO₄)]₂ (H₂O)₁₁. *J Am Miner* 88:240–244

- Merroun, M.L., Nedelkova, M., Ojeda, J.J., Reitz, T., Fernández, M.L., Arias, J.M., Romero-González, M., and Selenska-Pobell, S. (2011). Bio-precipitation of uranium by two bacterial isolates recovered from extreme environments as estimated by potentiometric titration, TEM and X-ray absorption spectroscopic analyses. *J. Hazard. Mater.* *197*, 1–10.
- Milgram, S., Carrière, M., Malaval, L., and Gouget, B. (2008a). Cellular accumulation and distribution of uranium and lead in osteoblastic cells as a function of their speciation. *Toxicology* *252*, 26–32.
- Milgram, S., Carrière, M., Thiebault, C., Malaval, L., and Gouget, B. (2008b). Cytotoxic and phenotypic effects of uranium and lead on osteoblastic cells are highly dependent on metal speciation. *Toxicology* *250*, 62–69.
- Miller, A.C., Stewart, M., Brooks, K., Shi, L., and Page, N. (2002). Depleted uranium-catalyzed oxidative DNA damage: absence of significant alpha particle decay. *J. Inorg. Biochem.* *91*, 246–252.
- Mirto, H., Hengé-Napoli, M.H., Gibert, R., Ansozorlo, E., Fournier, M., and Cambar, J. (1999). Intracellular behaviour of uranium(VI) on renal epithelial cell in culture (LLC-PK1): influence of uranium speciation. *Toxicol. Lett.* *104*, 249–256.
- Morcillo, F., González-Muñoz, M.T., Reitz, T., Romero-González, M.E., Arias, J.M., and Merroun, M.L. (2014). Biosorption and Biomineralization of U(VI) by the marine bacterium *Idiomarina loihiensis* MAH1: effect of background electrolyte and pH. *PLoS ONE* *9*, e91305.
- Newsome, L., Morris, K., and Lloyd, J.R. (2015). Uranium Biominerals Precipitated by an Environmental Isolate of *Serratia* under Anaerobic Conditions. *PLoS ONE* *10*, e0132392.
- Paquet, F., Houpert, P., Blanchardon, E., Delissen, O., Maubert, C., Dhieux, B., Moreels, A.M., Frelon, S., and Gourmelon, P. (2006). Accumulation and distribution of uranium in rats after chronic exposure by ingestion. *Health Phys* *90*, 139–147.
- Pereira, S., Camilleri, V., Floriani, M., Cavalié, I., Garnier-Laplace, J., and Adam-Guillermin, C. (2012). Genotoxicity of uranium contamination in embryonic zebrafish cells. *Aquat. Toxicol.* *109*, 11–16.
- Pierrefite-Carle, V., Santucci-Darmanin, S., Breuil, V., Gritsaenko, T., Vidaud, C., Creff, G., Solari, P.L., Pagnotta, S., Al-Sahlane, R., Auwer, C.D., et al. (2017). Effect of natural uranium on the UMR-106 osteoblastic cell line: impairment of the autophagic process as an underlying mechanism of uranium toxicity. *Arch. Toxicol.* *91*, 1903–1914.
- Prat, O., Vercouter, T., Ansozorlo, E., Fichet, P., Perret, P., Kurttio, P., and Salonen, L. (2009). Uranium speciation in drinking water from drilled wells in southern Finland and its potential links to health effects. *Environ. Sci. Technol.* *43*, 3941–3946.
- Prideaux, M., Loveridge, N., Pitsillides, A.A., and Farquharson, C. (2012). Extracellular matrix mineralization promotes E11/gp38 glycoprotein expression and drives osteocytic differentiation. *PLoS ONE* *7*, e36786.

- Qi, L., Basset, C., Averseng, O., Quéméneur, E., Hagège, A., and Vidaud, C. (2014). Characterization of UO₂(2+) binding to osteopontin, a highly phosphorylated protein: insights into potential mechanisms of uranyl accumulation in bones. *Metallomics* 6, 166–176.
- Rehr JJ, Kas JJ, Vila FD, Prange MP, Jorissen K (2010) Parameterfree calculations of X-ray spectra with FEFF9. *Phys Chem Chem Phys* 12:5503–5513
- Ravel B, Newville M (2005) ATHENA, ARTEMIS, HEPHAESTUS:data analysis for X-ray absorption spectroscopy using IFEFFIT. *J Synchrotron Radiat* 12:537–541
- Rodrigues, G., Arruda-Neto, J.D.T., Pereira, R.M.R., Kleeb, S.R., Geraldo, L.P., Primi, M.C., Takayama, L., Rodrigues, T.E., Cavalcante, G.T., Genofre, G.C., et al. (2013). Uranium deposition in bones of Wistar rats associated with skeleton development. *Appl Radiat Isot* 82, 105–110.
- Schaffler, M.B., Cheung, W.-Y., Majeska, R., and Kennedy, O. (2014). Osteocytes: master orchestrators of bone. *Calcif. Tissue Int.* 94, 5–24.
- Sitaud B, Solari PL, Schlutig S, Llorens I, Hermange H (2012) Characterization of radioactive materials using the MARS beamline at the synchrotron SOLEIL. *J Nucl Mater* 425:238–243
- Staines KA, Javaheri B, Hohenstein P, et al (2017) Hypomorphic conditional deletion of E11/Podoplanin reveals a role in osteocyte dendrite elongation. *J Cell Physiol* 232:3006-3019
- Tasat, D.R., Orona, N.S., Mandalunis, P.M., Cabrini, R.L., and Ubios, A.M. (2007). Ultrastructural and metabolic changes in osteoblasts exposed to uranyl nitrate. *Arch. Toxicol.* 81, 319–326.
- Wade-Gueye, N.M., Delissen, O., Gourmelon, P., Aigueperse, J., Dublineau, I., and Souidi, M. (2012). Chronic exposure to natural uranium via drinking water affects bone in growing rats. *Biochim. Biophys. Acta* 1820, 1121–1127.
- Yamaguchi, N., Kawasaki, A., and Iiyama, I. (2009). Distribution of uranium in soil components of agricultural fields after long-term application of phosphate fertilizers. *Sci. Total Environ.* 407, 1383–1390.
- Yung, M.C., and Jiao, Y. (2014). Biomineralization of uranium by PhoY phosphatase activity aids cell survival in *Caulobacter crescentus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 4795–4804.

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>Rplp0</i>	TCCAGGCTTTGGGCATCA	CTTTATCAGCTGCACATCACTCAGA
<i>Pdpr</i>	CAGGTGCTACTGGAGGGCTT	CACGCTCTCTCTGCGTTGG
<i>Bglap</i>	CCACCCGGGAGCAGTGT	CTAAATAGTGATACCGTAGATGCGTTTG
<i>Coll1a1</i>	GCGAAGGCAACAGTCGCT	CTTGGTGGTTTTGTATTCGATGAC
<i>Ssp1</i>	CTGTGTCCTCTGAAGAAAAGGATG	GCTTTCATTGGAATTGCTTGG
<i>Phex</i>	AGAATTCTCAAGGGTAATCCAGGG	TGCACTCTCAATAAAGTTGACACATTT
<i>Dmp1</i>	CACAATACTGAATCTGAAAGCTCTGAA	AGCTTGACTTTCTTCTGATGACTCACT

Table 1. Primer sequences used for quantitative RT-PCR

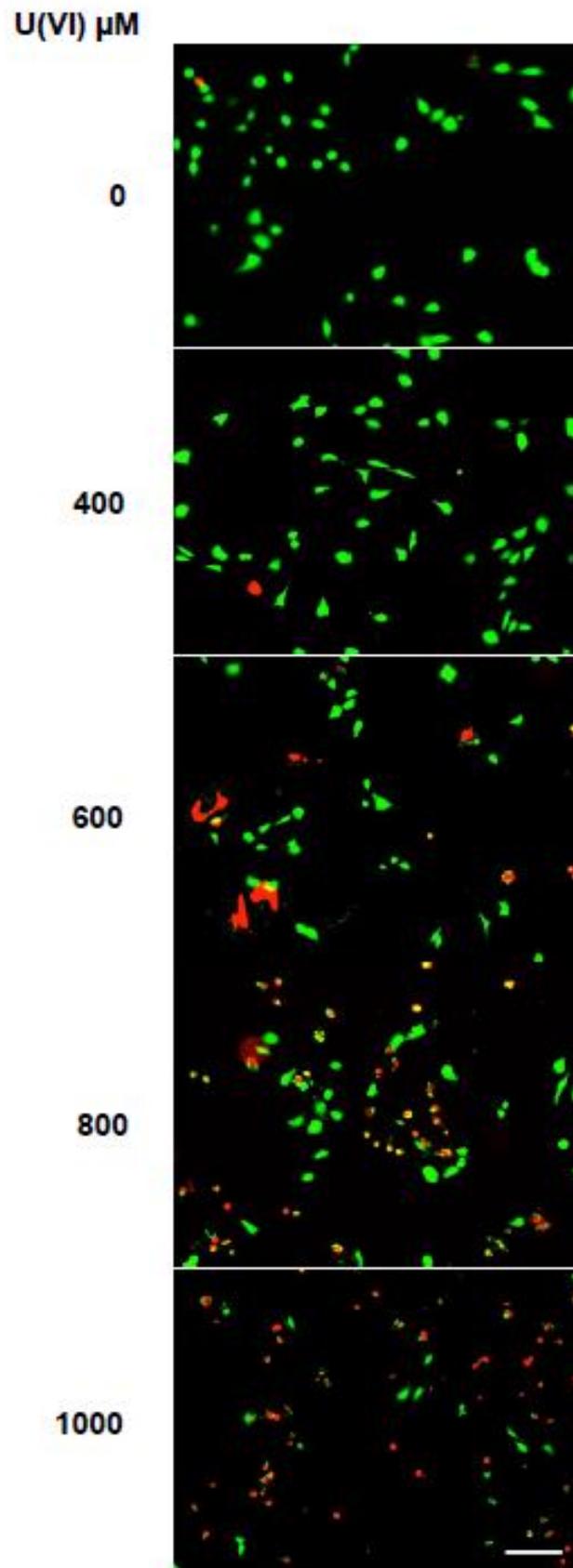


Fig 1

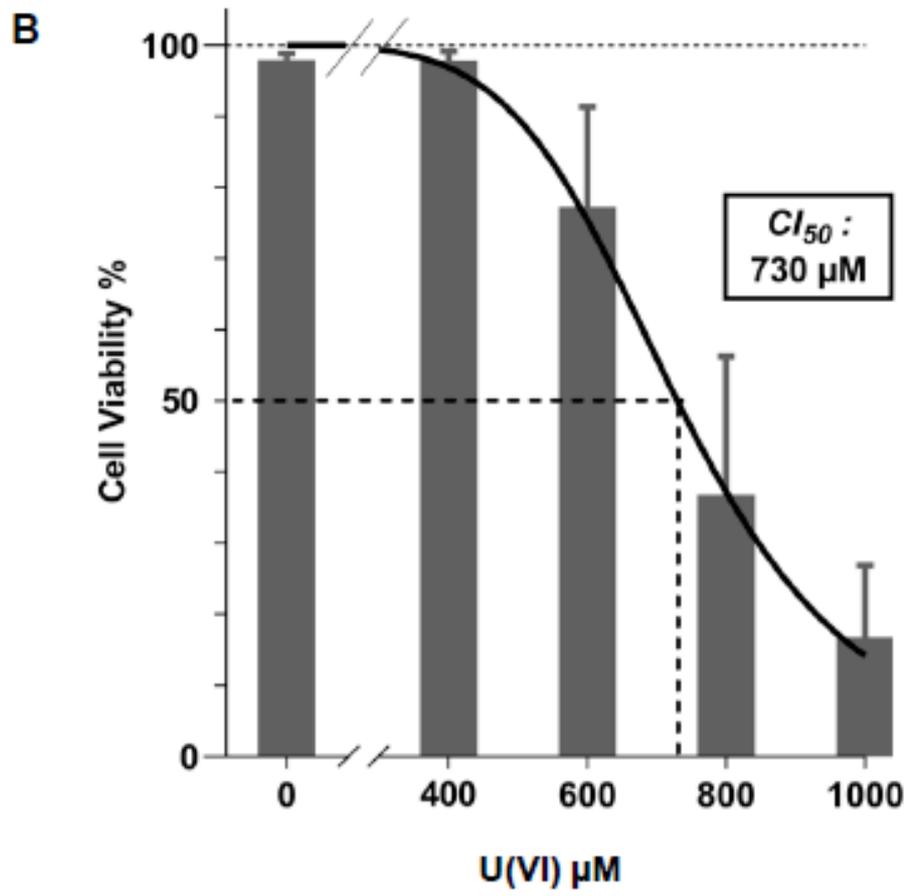


Fig 1

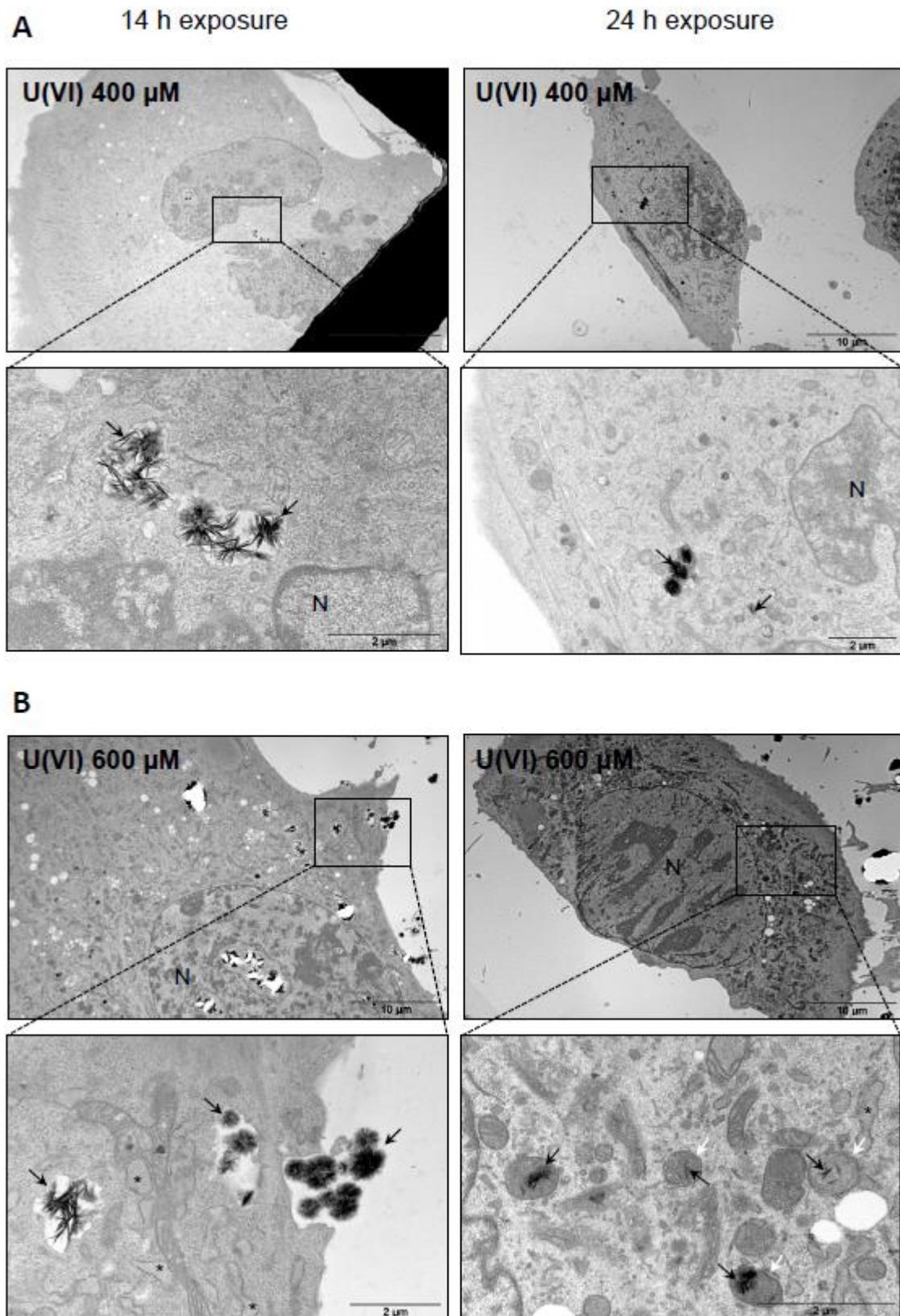


Fig 2

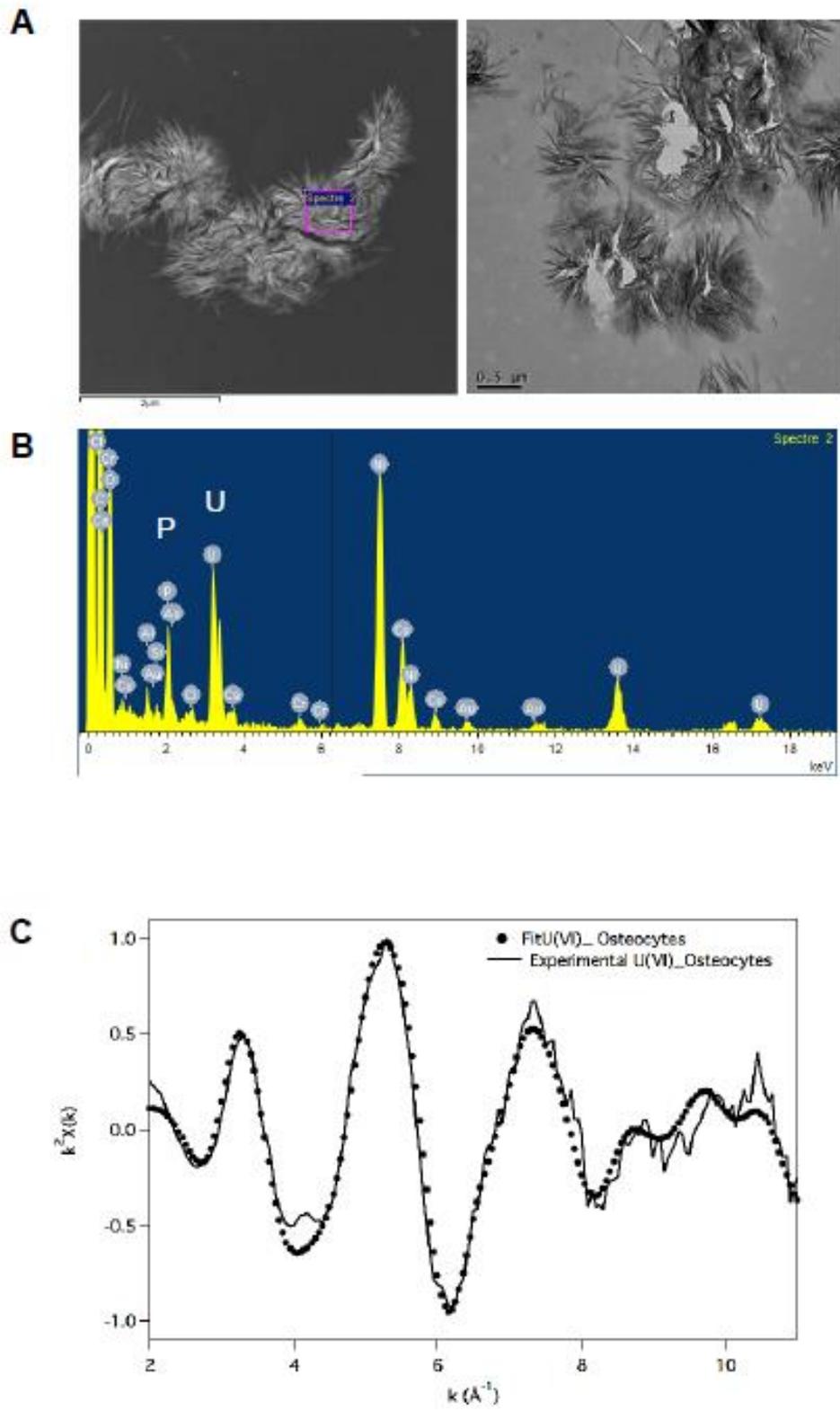


Fig 3

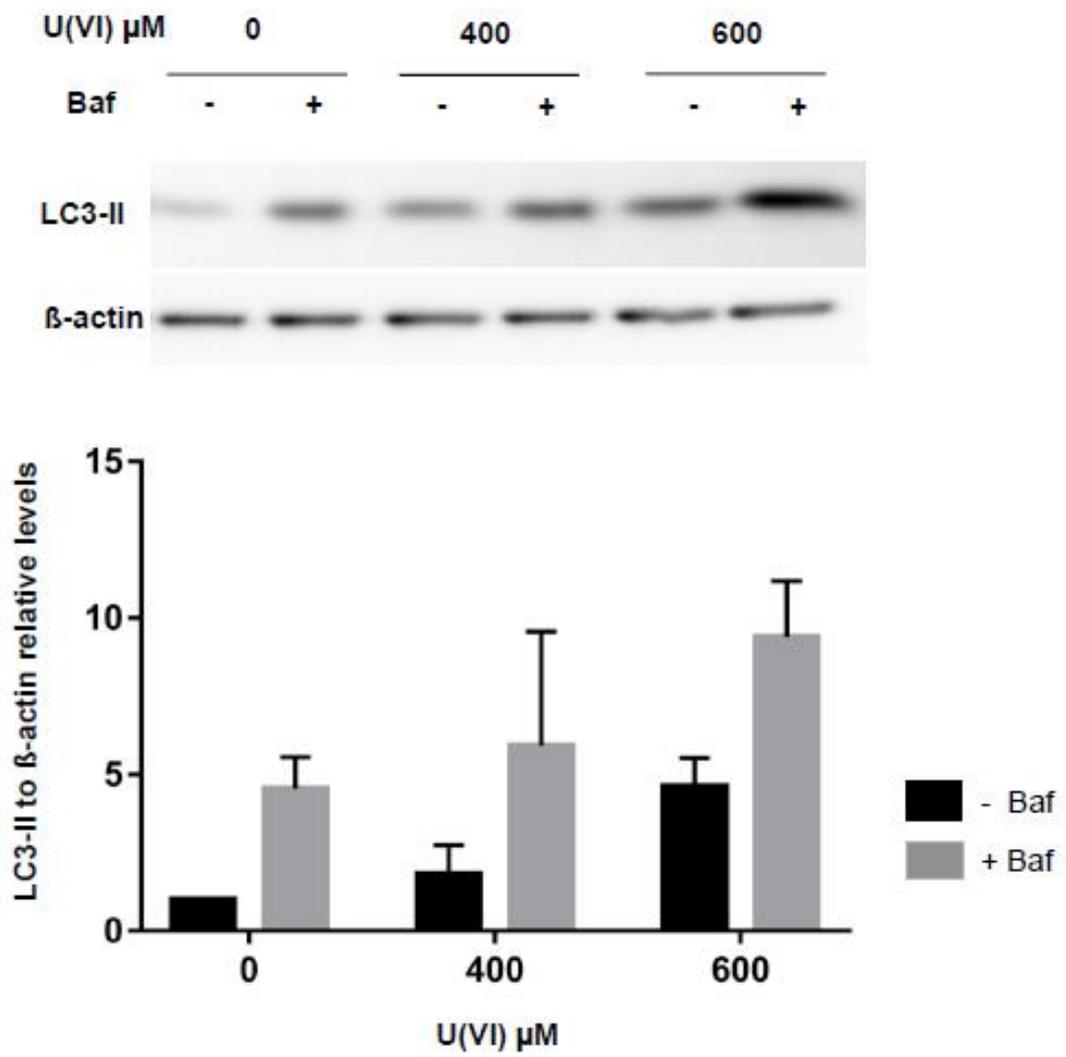
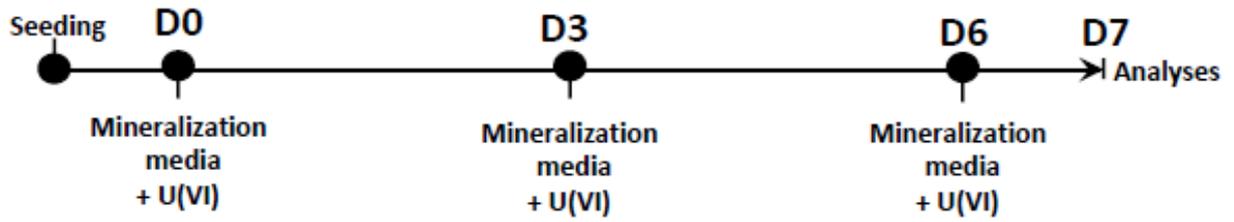
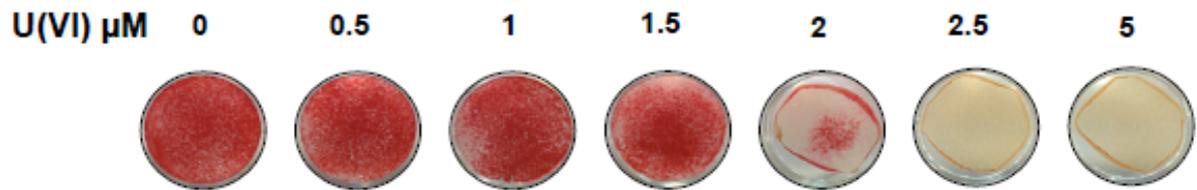


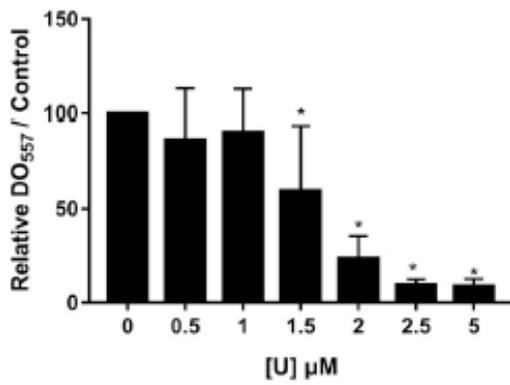
Fig 4



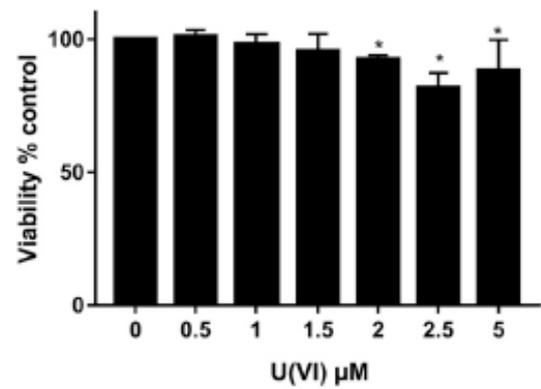
A



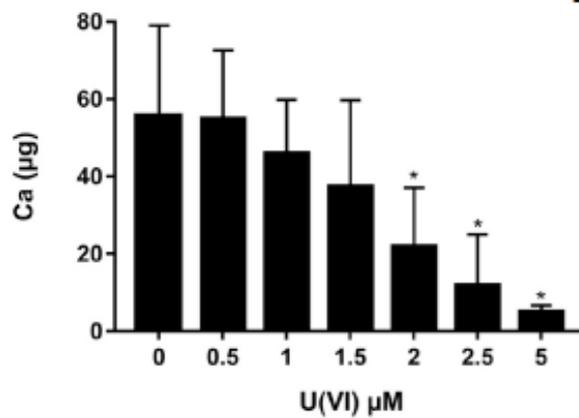
B



C



D



E

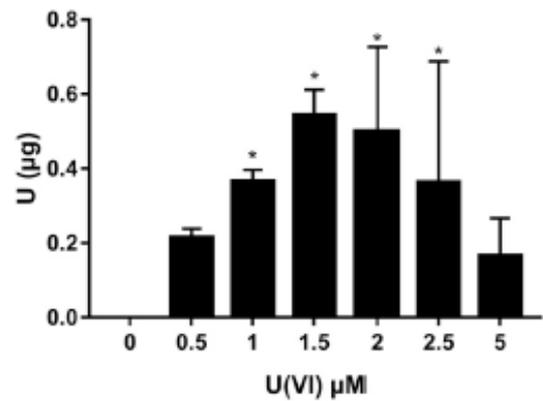


Fig 5

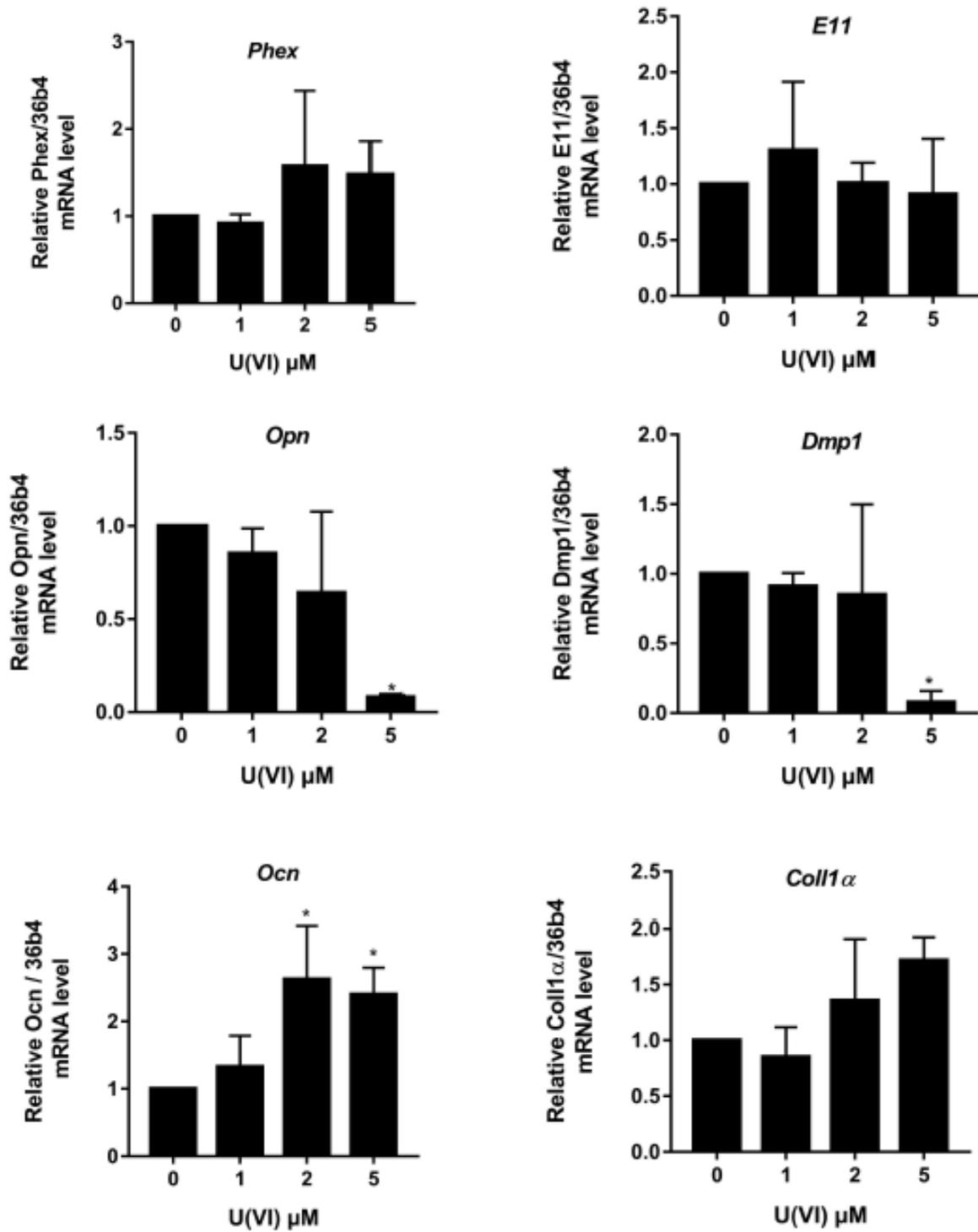


Fig 6

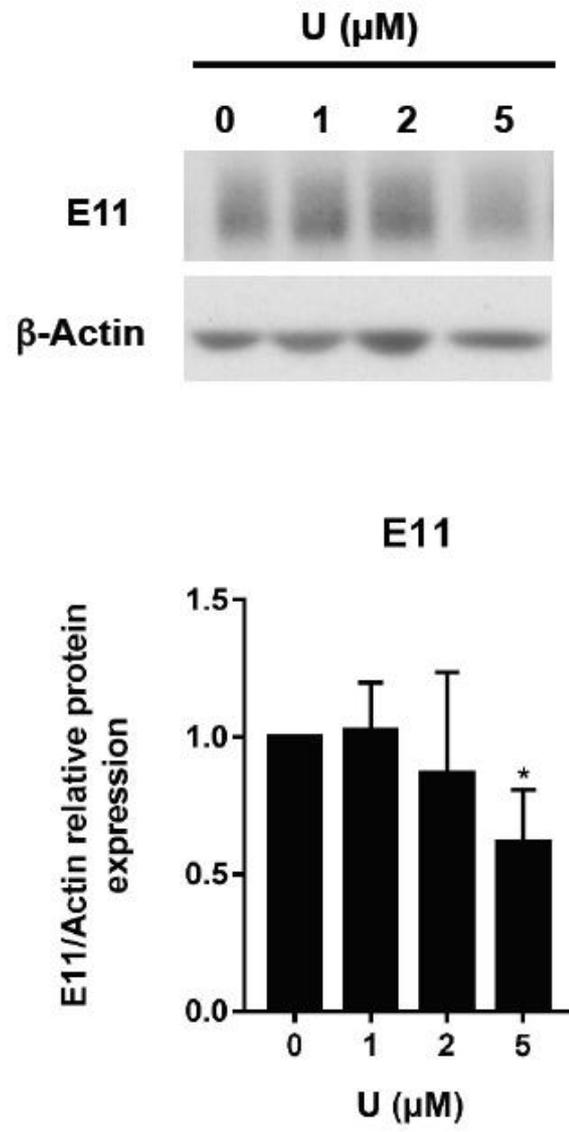


Fig S1

Des expériences complémentaires ne figurant pas dans l'article en cours de soumission ont été effectuées. Les méthodes et les résultats de ces analyses sont détaillés ci-après.

III. MATERIELS ET METHODES COMPLEMENTAIRES

A. ANALYSES QPCR

La méthode d'extraction et d'analyse par RT-qPCR utilisée est la même que celle décrite dans le manuscrit de l'article.

Les amorces utilisées pour la détection des transcrits de la BSP et de l'ALP (données non présentées dans l'article en soumission) sont les suivantes :

Gène	Amorces sens (5'-3')	Amorces anti-sens (5'-3')
<i>lbsp</i>	CCAAGCACAGACTTTTGAGTTAGC	CTTTCTGCATCTCCAGCCTTCT
<i>Akp2</i>	TCAGGGCAATGAGGTCACATC	CACAATGCCACGGACTTC

B. EXTRACTION PROTEIQUE ET ANALYSE PAR WESTERN BLOT

Après 7 ou 10 jours d'exposition à l'UA, les MLO-A5 sont rincées en PBS et grattées en PBS froid sur la glace. Après centrifugation pendant 10 minutes à 5000g, le culot cellulaire est resuspendu dans du tampon de lyse (Laemmli : 60 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2 % sodium dodecyl sulfate (SDS), 100 mM DTT and 0,01 % bleu de bromophénol) complété avec un cocktail d'inhibiteurs de protéases sans EDTA (Roche Diagnostics). Les échantillons sont ensuite soniqués dans un bain sonicateur (50 cycles : 30 secondes de sonication et 15 secondes de repos). La migration est effectuée sur un gel SDS-polyacrylamide 14% à 120 V. Les échantillons sont ensuite transférés sur une membrane de PVDF (Immobilon, Millipore). Les membranes sont saturées dans du TBS (Tris-buffered saline) – 5 % lait écrémé (1 % pour l'actine) et incubées sur la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire dilué dans du TBST-T (TBS-0,05% Tween 20) -5 % lait écrémé (1 % pour l'actine). Après lavages avec du TBS-T, les membranes sont incubées avec l'anticorps secondaire couplé à l'HRP (Horse-radish peroxydase). Elles sont ensuite rincées avec du TBST-T et le signal de chimiluminescence obtenu à l'aide du kit « ECL plus » (Thermo Scientific) est mesuré avec un imageur Chemismart (Vilbert-Loumat, France). Les anticorps primaires utilisés sont les anticorps polyclonaux de lapin anti-BSP (Kerafast, LF84, 1/4000), les anticorps polyclonaux de chèvre anti-podoplanine (E11) (R&D Systems

AF3244, 1/2000) et les anti-corps monoclonaux de souris anti-Actine (Sigma-Aldrich, clone AC-15, 1/100000).

IV. RESULTATS COMPLEMENTAIRES

Après avoir décrit les effets chroniques de l'uranium après 7 jours d'exposition, les analyses ont aussi été effectuées après 10 jours. La minéralisation est diminuée de 80 et 95 % à 2,5 et 5 μM d'acétate d'uranyle (UA) par rapport au contrôle (**Fig. 23 A-C**). La quantité de calcium présente dans les matrices cellulaires, mesurée par IC-OES, varie dans les mêmes proportions et confirme les résultats de la quantification de l'alizarine (**Fig. 23 E**). A 2 et 2,5 μM , nous avons observé systématiquement une récupération de la capacité de minéralisation entre J7 et J10. De plus, nous avons aussi remarqué un décollement des matrices cellulaires exposées à l'UA sur les bords des puits (**Fig. 23 A**), conduisant parfois au décollement total de la matrice des supports de culture. Ce phénomène a été observé uniquement pour les cellules exposées à l'UA, et plus fréquemment avec l'augmentation de la concentration (2 à 5 μM). Comme pour les résultats obtenus à J7, l'inhibition de la minéralisation ne s'explique pas par une diminution de la viabilité des cellules (**Fig. 22**). La viabilité des cellules n'est diminuée que de 16 et 40 % après 10 jours de minéralisation en présence de 2,5 et 5 μM d'UA respectivement. A J10, la quantité d'uranium retrouvée dans la matrice cellulaire augmente avec la concentration d'exposition jusqu'à 2 μM (**Fig. 23 G**). Au-delà de 2 μM , la quantité d'uranium mesurée dans la matrice cellulaire chute.

Comme nous l'avons décrit dans le manuscrit soumis pour publication, l'autophagie des MLO-A5 est favorisée par une forte exposition à l'uranium après une exposition aiguë. Nous avons mesuré par Western Blot, dans le cadre d'une exposition chronique au cours du processus de minéralisation, le niveau de la protéine LC3, marqueur de l'autophagie, et de p62, une protéine responsable de l'adressage de protéines vers l'autophagosome. Les résultats obtenus étant variables d'une expérience à une autre, nous n'avons pas pu conclure sur l'implication de ce processus dans la réponse des OSTs à l'intoxication chronique à l'UA (données non présentées). Dans ce cadre, une analyse par Microscopie Electronique à Transmission (TEM) a été réalisée afin de visualiser l'ultrastructure des cellules. Visuellement, le nombre de vésicules autophagiques intra-cellulaires semble inchangé. Dans nos conditions expérimentales, nous n'avons pas observé de modification claire du processus autophagique. La chute de la minéralisation des MLO-A5 en présence d'acétate d'uranyle ne paraît donc pas

être causée par une modification du flux autophagique de ces cellules. L'imagerie électronique nous a tout de même permis de constater la diminution de la minéralisation ainsi qu'une augmentation visible du collagène extracellulaire à partir de 2 μM à J7 comme à J10 (**Fig. 24-25**). On observe en effet clairement la minéralisation (indiquée par les flèches rouges) dans les conditions 0 μM et 1 μM UA, à J7 comme à J10. Elle apparaît sous forme de plaques très noires intra ou extra-cellulaire (la minéralisation est très dense aux électrons) ou le long des fibres de collagène. Aux concentrations 2 et 5 μM , la minéralisation se fait plus rare alors qu'une plus grande quantité de collagène extra-cellulaire sous formes de fibres est observée (indiqué par les flèches blanches). A J10, on relève également la présence de débris cellulaires dans les conditions 2 et 5 μM sur lesquels la minéralisation est visible.

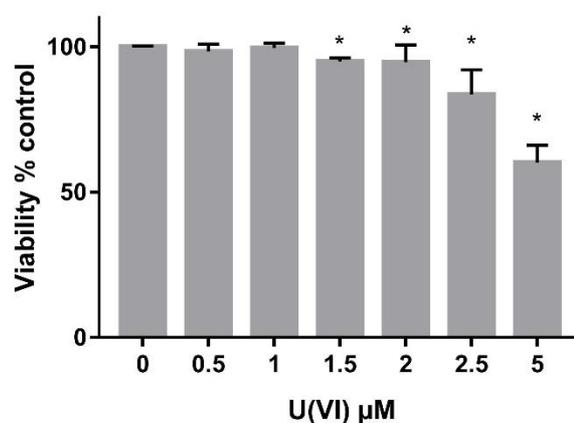


Figure 22 Viabilité des MLO-A5 mesurée par MTS après 10 jours de minéralisation en présence d'UA.

Les valeurs représentent la moyenne \pm SD (n=4) : $p < 0,05$, Test Kruskal Wallis, significatif par rapport à la condition 0 μM UA.

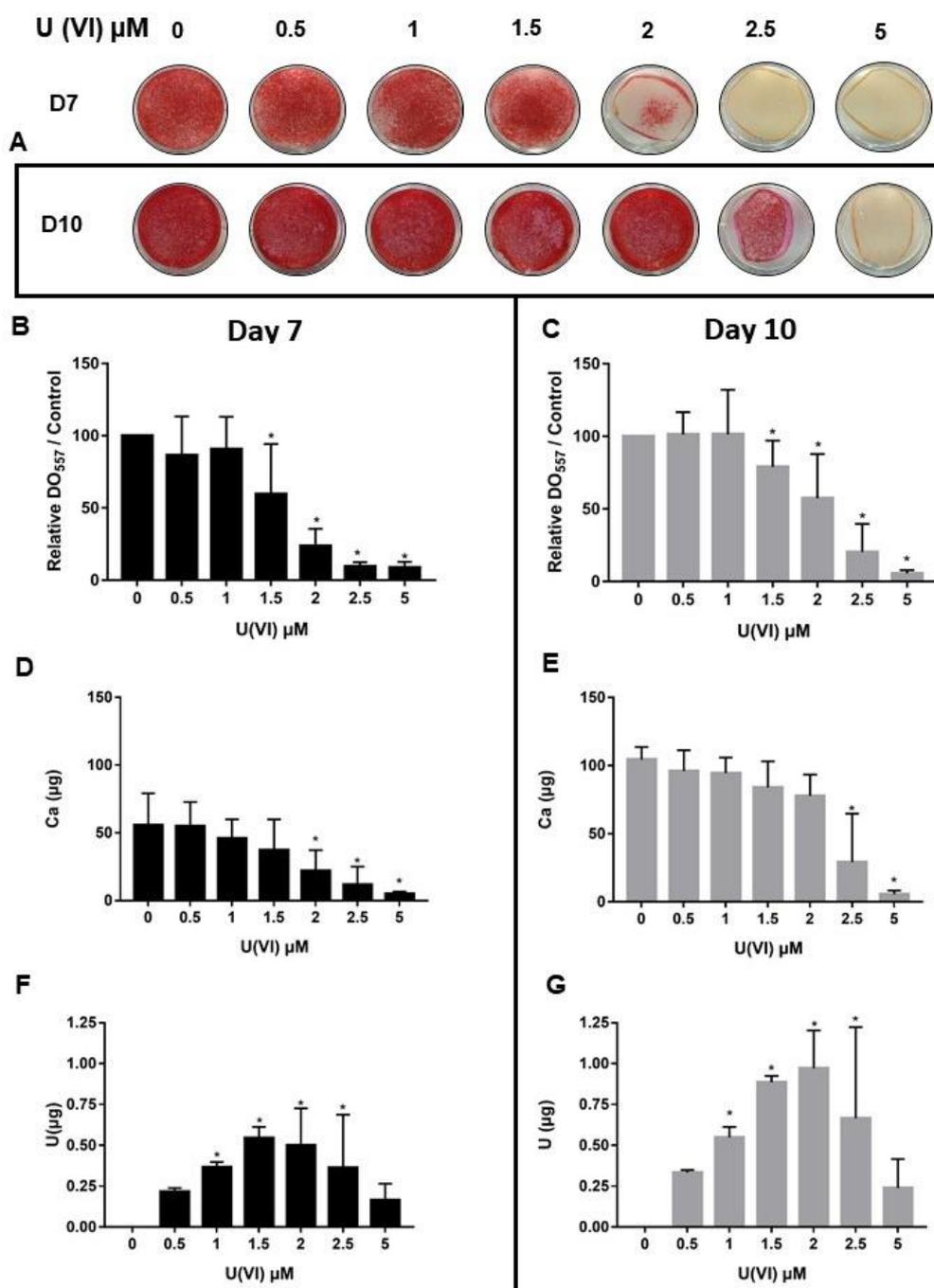


Figure 23 Minéralisation des MLO-A5 après 7 ou 10 jours d'exposition à l'UA colorées à l'Alizarine.

A : Photos représentatives des puits colorés au rouge Alizarine. B-C : Quantification de la minéralisation par dissolution au CPC de l'alizarine à J10. D-E : Quantification du calcium par ICP-OES présents dans les tapis cellulaires à J10. F-G : Quantification par ICP-MS de l'uranium présent dans les tapis cellulaires à J10. Les valeurs représentent la moyenne \pm SD ; n=4 (B-C) ; n=3 (D-E-F-G) ; * : p<0,05 Test de Kruskal Wallis, significatif par rapport à la condition 0 μ M UA.

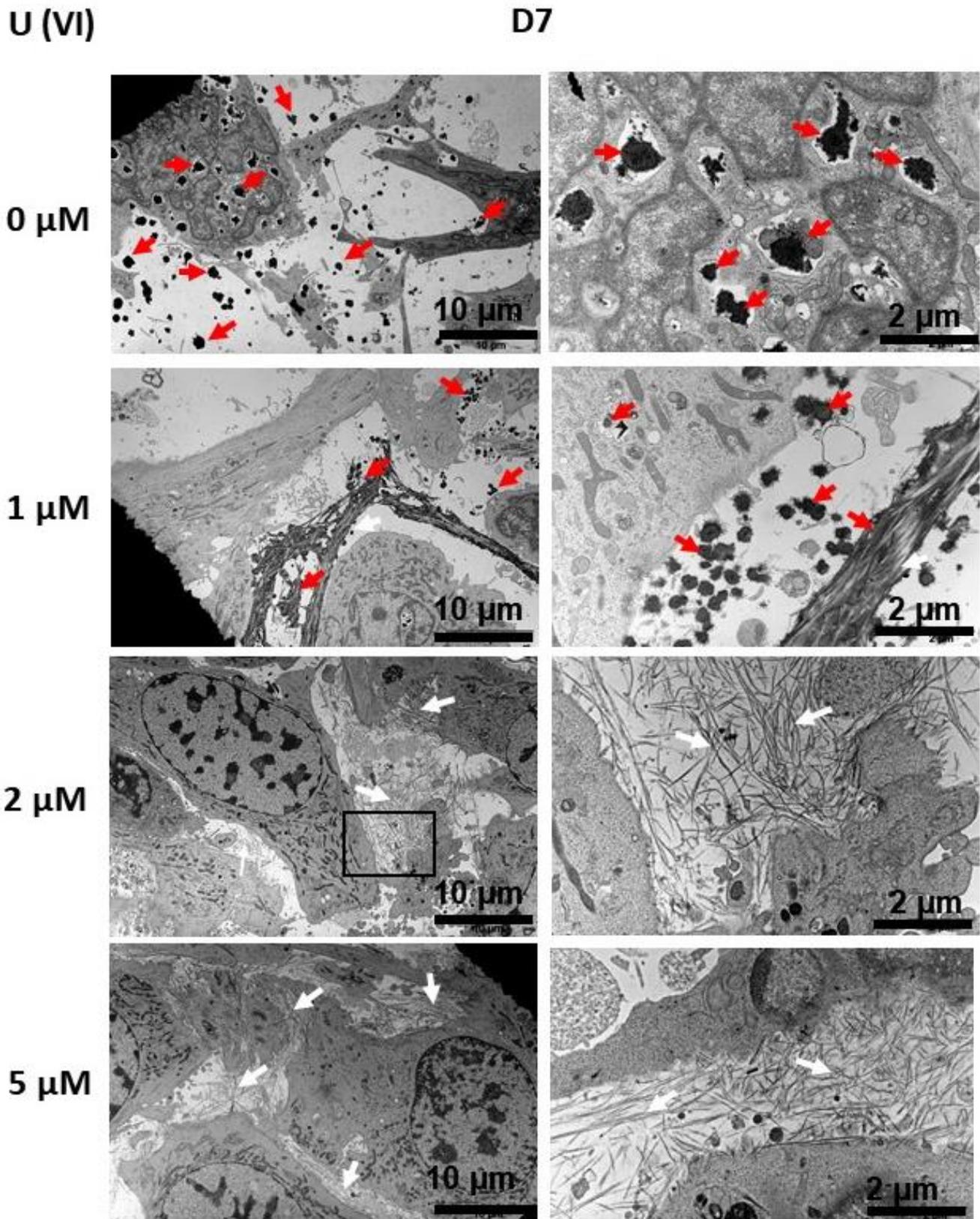


Figure 24 Images de microscopie électronique à transmission de MLO-A5 après 7 jours d'exposition à l'UA pendant la minéralisation.

Les flèches rouges indiquent la minéralisation et les flèches blanches indiquent le collagène.

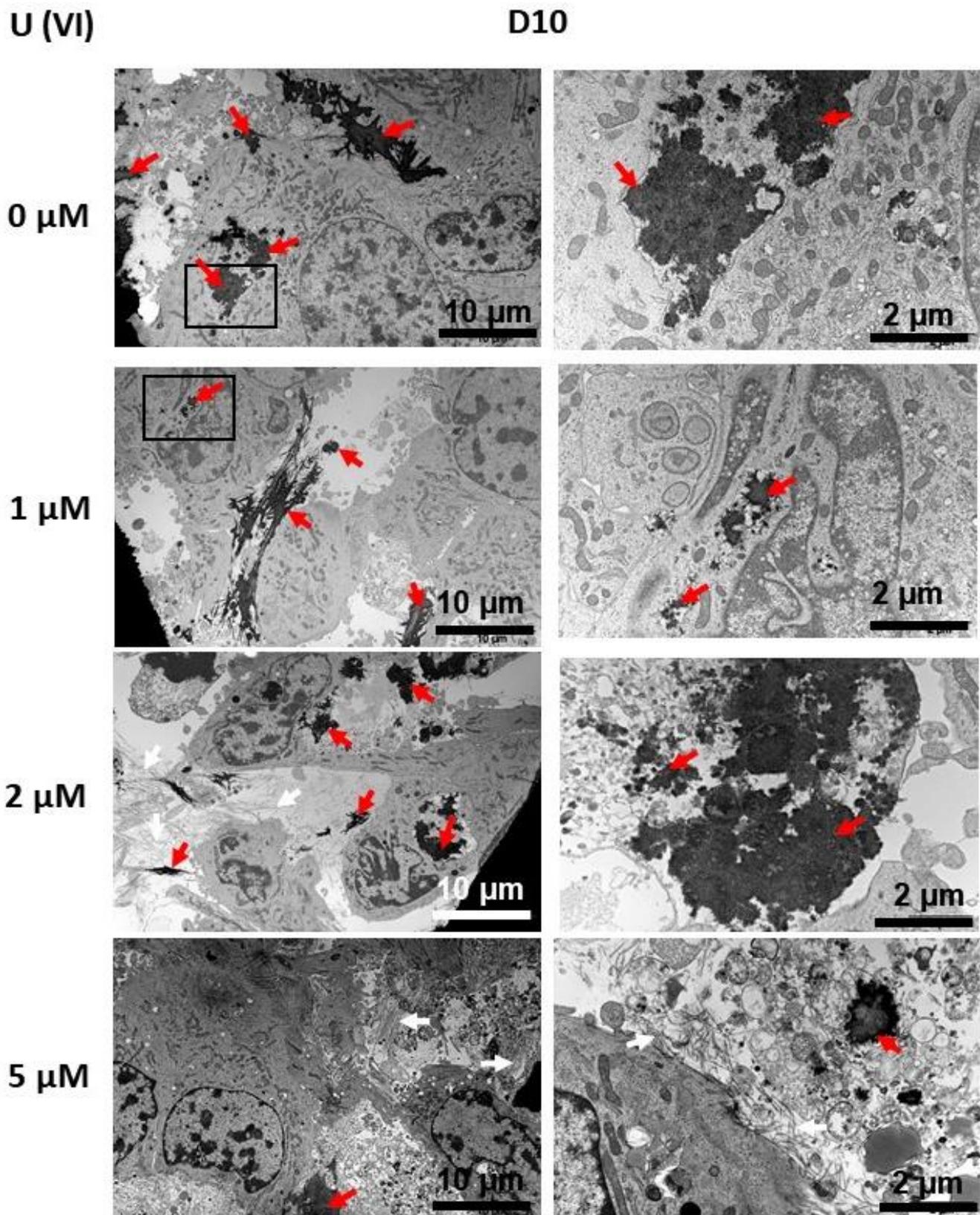


Figure 25 Images de microscopie électronique à transmission de MLO-A5 après 10 jours d'exposition à l'UA pendant la minéralisation.

Les flèches noires indiquent la minéralisation et les flèches blanches indiquent le collagène.

Les marqueurs de différenciation ostéoblastique impliqués dans la minéralisation et les marqueurs ostéocytaires ont été mesurés par RT-qPCR dans le but de comprendre comment l'uranium affecte la fonction des ostéocytes (**Fig. 26-27**). Le même profil d'expression (avec des ordres de variation similaires) est obtenu à J7 et à J10 pour tous les marqueurs. On constate en effet une augmentation de l'expression des transcrits de l'ALP (x 4), de l'OCN (x 4), de la BSP (x 6,5) et du collagène I (x 1,7) à 5 μM d'UA à J7 comme à J10 (**Fig. 6 de la publication, Fig. 26-27**). De plus, l'expression des gènes de l'OPN et de DMP1 est environ dix fois plus faible à 5 μM d'UA que pour la condition contrôle et aucune modification de E11 et de PHEX n'est mesurée. Nous avons cherché à confirmer ces résultats par Western Blot pour les protéines E11 et la BSP à J7 (**Fig. 28**) et J10 (**Fig. 29**). A 5 μM d'UA, la BSP est deux fois moins présente que dans la condition sans UA pour les deux temps. E11, protéine marqueur de la différenciation ostéocyttaire et dont l'expression génique n'est pas modifiée par RT-qPCR, est présente en moindre quantité (environ -30 %) dans la condition 5 μM d'UA à J7 comme à J10.

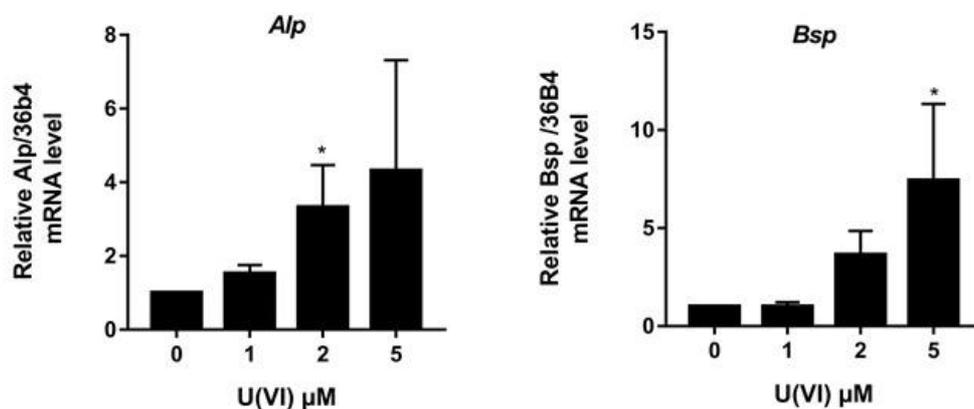


Figure 26 Niveau d'expression génique des marqueurs ostéoblastiques ALP et BSP en fonction de la concentration d'exposition à l'UA après 7 jours de minéralisation.

Valeurs moyennes \pm SD normalisées par le contrôle sans uranium (n=3) : * $p < 0,05$ test Kruskal Wallis, significatif par rapport à la condition 0 μM UA.

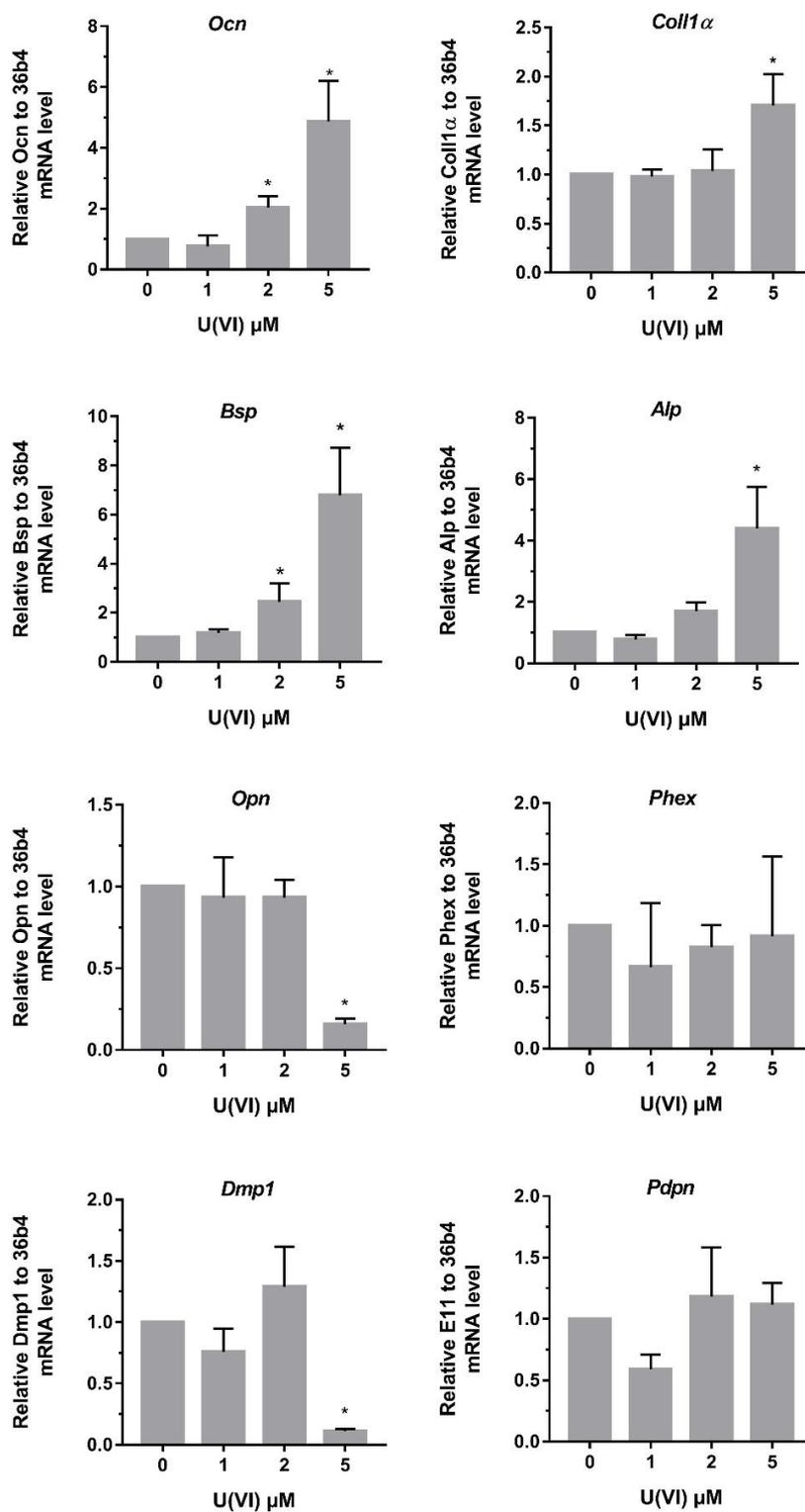


Figure 27 Niveau d'expression des marqueurs ostéoblastiques et ostéocytaires en fonction de la concentration d'exposition à l'UA après 10 jours de minéralisation.

Valeurs moyennes \pm SD normalisées par le contrôle sans uranium ($n=3$) : * $p < 0,05$ test Kruskal Wallis, significatif par rapport à la condition 0 μ M UA.

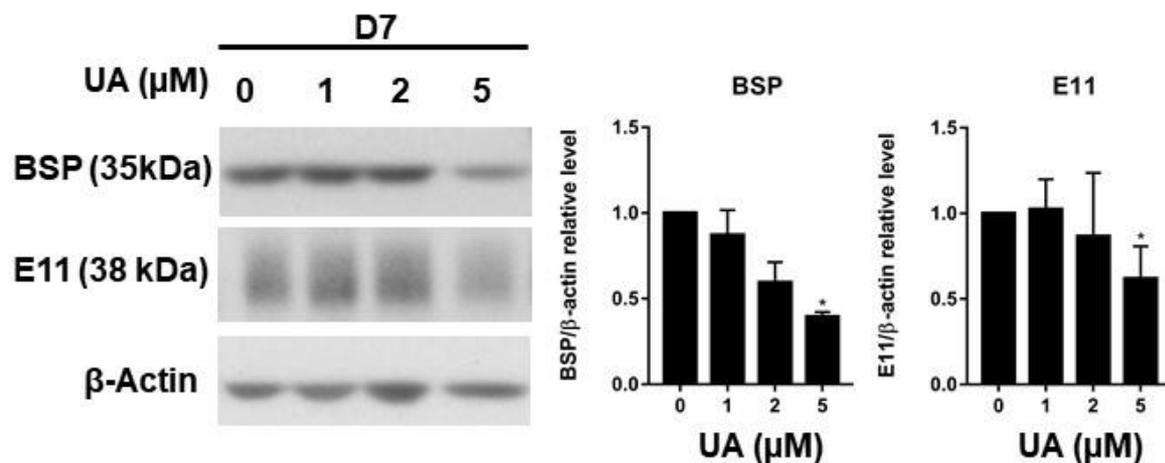


Figure 28 Expression protéique de la BSP et de E11 après 7 jours d'exposition à l'UA au cours de la minéralisation.

(n=3) * : $p < 0.05$ Test Kruskal Wallis, Valeurs moyennes \pm SD normalisées par la condition sans uranium

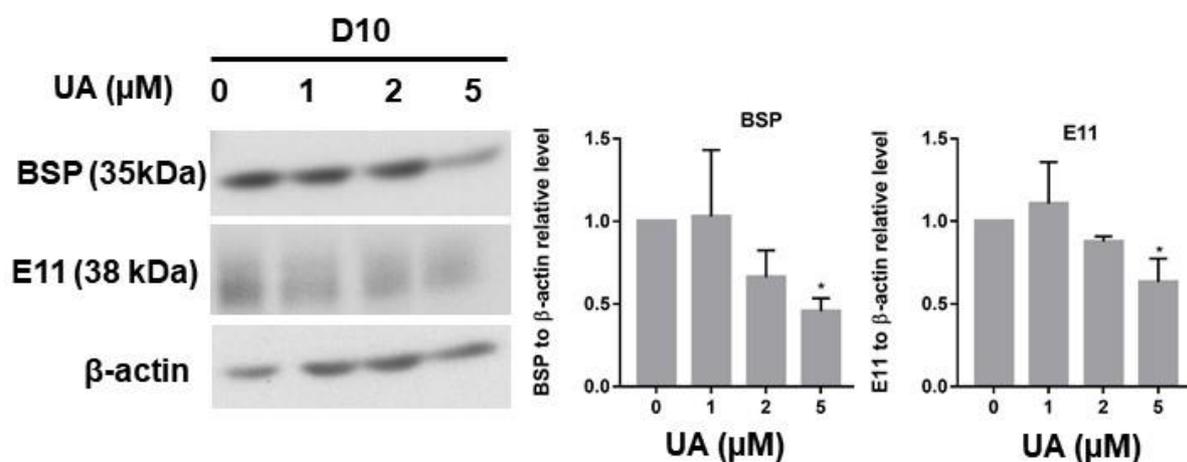


Figure 29 Expression protéique de la BSP et de E11 après 10 jours d'exposition à l'UA au cours de la minéralisation.

(n=3) * : $p < 0.05$ Test Kruskal Wallis, Valeurs moyennes \pm SD normalisées par la condition sans uranium

V. DISCUSSION ET CONCLUSION

Cette étude montre l'effet inhibiteur d'une exposition chronique à l'UA pendant 7 et 10 jours sur la minéralisation des MLO-A5. On observe cependant une conservation de la capacité de minéralisation jusqu'à 2,5 μM d'UA à J10, alors qu'elle n'est pas présente à J7. Ces données sont confirmées par le dosage du calcium présent dans les tapis cellulaires. De plus, on remarque que pour des faibles doses d'UA (jusqu'à 2 μM), la quantité d'uranium retrouvée dans les tapis cellulaires est dépendante de la concentration d'exposition. Ce phénomène disparaît pour les concentrations les plus hautes, conditions dans lesquelles la minéralisation est fortement inhibée. Ces résultats suggèrent que pour les faibles doses, l'UA n'altère pas suffisamment la capacité de minéralisation pour diminuer l'incorporation de l'uranium dans la matrice cellulaire. Avec la diminution de la minéralisation induite par de plus fortes concentrations, l'incorporation de l'uranium chute. L'activité de minéralisation des cellules semble donc nécessaire à l'incorporation d'uranium dans la matrice synthétisée. Grâce à de expériences précédentes faites au laboratoire, on sait que la grande majorité de l'uranium (environ 80 %) est retrouvée dans la matrice et non dans les cellules (données non publiées). D'après la littérature, l'uranium s'incorpore en plus grande quantité dans les zones de remodelage et de renouvellement osseux (Priest et al. 1982; Ellender et al. 1995; Bourgeois et al. 2015). Nos données confirment la responsabilité de l'activité anabolique des cellules de cette localisation préférentielle de l'uranium dans l'os. Cependant, ces résultats ne nous permettent pas de déterminer si cette fixation dans la matrice s'effectue de façon passive (par interactions chimiques entre la matrice et l'uranium), ou sous l'action de l'activité cellulaire. Par ailleurs, nos résultats concordent avec de précédentes études *in vivo* et *in vitro* établissant un défaut de formation osseuse suite à l'exposition à l'uranium (Ubios et al. 1991; Fukuda et al. 2006; Pierrefite-Carle et al. 2016).

La viabilité des MLO-A5 a été étudiée au cours l'exposition chronique à l'UA. Elle diminue de 39 % à 5 μM après 10 jours. Les débris cellulaires favorisant la minéralisation en fournissant des sites de nucléation du minéral (Lest et al. 2007), on s'attendrait à observer une augmentation de la minéralisation à cette concentration, aidée par la présence des débris des cellules mortes. Or, la minéralisation est inhibée. C'est donc la capacité de minéralisation des MLO-A5 qui est effectivement touchée. Pour les concentrations intermédiaires (2 et 2,5 μM), l'inhibition de la minéralisation est transitoire. On constate en effet une récupération de la

capacité de minéralisation entre J7 et J10. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cet évènement :

- l'uranium retarde la cinétique de minéralisation : en conséquence, elle apparaît plus tard que dans des conditions de culture classique,
- l'uranium altère le processus de minéralisation de façon transitoire, puis la mise en place d'un mécanisme inconnu de résistance permettrait aux cellules de minéraliser à nouveau (ex : protéines d'efflux, mécanisme de compensation...).

Pour comprendre comment l'uranium affecte la fonction ostéocytaire, une analyse des marqueurs de la minéralisation et de la différenciation via l'analyse de l'expression des ARN messagers a été conduite. On remarque que les profils d'expressions des gènes étudiés sont les mêmes pour J7 et J10. L'expression des gènes de l'ALP, du Coll1 α , de l'OCN et de la BSP, protéines impliquées dans la synthèse de la matrice osseuse, est augmentée après une exposition à 5 μ M d'UA pendant 7 ou 10 jours alors que celles de l'ostéopontine et de DMP1 sont diminuées. Aucun changement n'est mesuré pour E11 et Phex.

Ces résultats sont tout de même surprenants dans la mesure où l'expression de gènes impliqués dans la minéralisation (BSP, OCN, ALP, Collagène I) est augmentée, l'expression génique de l'OPN, dont l'action inhibe la minéralisation est diminuée, alors que nous observons une inhibition de cette minéralisation. Cependant, plusieurs travaux évoquent l'idée d'un découplage entre la synthèse de la matrice organique et de la minéralisation, cette dernière pouvant être retardée. En effet, dans une première étude montrant une diminution de la minéralisation des ostéoblastes surexprimant Bcl-2, les expressions de l'ALP, du Coll1 α , de la BSP et de l'OCN sont augmentées par rapport aux cellules Wild type (Zhang et al. 2007). Les auteurs expliquent que la surexpression de Bcl-2 favorise la différenciation des OBs et que la synthèse de la matrice organique serait accrue et découplée de sa minéralisation. De même, plusieurs études mettent en évidence l'existence d'un tel découplage causé par de fortes doses de fluor (Waddington et Langley 2003; Mousny et al. 2008) ou de vitamine D (Hock et al. 1986; Wronski et al. 1986). Nos images de microscopie électronique des MLO-A5 en minéralisation en présence d'UA montrant une augmentation de la quantité de collagène extra-cellulaire au détriment de la minéralisation iraient dans ce sens. L'uranium pourrait donc provoquer une augmentation de la synthèse de matrice organique et un retard ou une inhibition de la minéralisation.

L'analyse par Western Blot de la protéine BSP, donc l'action permet la nucléation de la minéralisation sur le collagène (Baht et al. 2008), montre une diminution de son expression à J7 comme à J10 en présence de 5 μ M d'UA. Cette inhibition constituerait également une explication du retard de minéralisation observé dans nos conditions. Par ailleurs, les profils d'expression similaires des gènes étudiés et présentant les mêmes ordres de grandeur à J7 comme à J10 en présence d'UA suggèrent qu'aucune modification du processus interne mis en jeu pour la différenciation ou la minéralisation n'est modifié entre ces deux temps. Ces observations semblent écarter l'hypothèse selon laquelle un quelconque mécanisme de résistance à l'UA permettrait aux cellules exposées de retrouver une capacité de minéralisation à J10. D'autre part, la diminution de l'expression génique de DMP1 et de la protéine E11 dans les MLO-A5 exposées à 5 μ M d'UA indique que l'UA inhibe la différenciation vers un phénotype ostéocytaire mature ce qui pourrait aussi être causé par la chute de la minéralisation. Il pourrait donc être intéressant de suivre l'évolution de ces marqueurs entre J7 et J10 et d'allonger la cinétique afin de vérifier nos hypothèses et d'évaluer si les cellules exposées à 5 μ M seraient en mesure de minéraliser après des temps d'exposition plus longs. De surcroît, on note une augmentation des ARNm de la BSP mais une diminution de la protéine. Cette observation suggère que la chute de la minéralisation exercerait un rétrocontrôle pour encourager la cellule à produire de la BSP et favoriser la minéralisation, sans succès entre J7 et J10. L'UA pourrait donc avoir un impact sur la synthèse de la protéine ou sur la stabilité de l'ARNm de la BSP.

L'exposition à l'UA au cours de la minéralisation impacte l'adhésion des matrices cellulaires de MLO-A5 au support de culture. Ces matrices non minéralisées sont beaucoup plus cohésives. Cette observation renforcerait l'hypothèse selon laquelle l'uranium favorise la formation de la matrice organique. Par ailleurs, une étude transcriptomique réalisée sur le poisson zèbre exposé de façon chronique à l'uranium appauvri a montré la diminution de gènes correspondant aux termes Gene Ontology « adhésion cellulaire » dans le cerveau et les testicules des poissons. L'adhésion cellulaire apparaît donc comme un processus physiologique impacté par l'exposition à l'uranium. Il serait intéressant de déterminer si la perte d'adhésion des matrices cellulaires de MLO-A5 est due à une modification de l'expression des intégrines, celles-ci jouant un rôle important dans l'intégration des signaux mécaniques par les ostéocytes (Batra et al. 2012).

Comme cela avait été vu pour les ostéoblastes (Pierrefite-Carle et al. 2016), nous avons démontré que l'autophagie est stimulée lors d'une exposition aiguë des MLO-A5 à l'UA et que cette dernière diminuerait la toxicité de l'uranium sur les cellules en modifiant sa spéciation. En exposition chronique, nous n'avons pas pu relever de modifications de ce processus. Cependant, on ne peut exclure que l'autophagie puisse entrer en jeu dans la détoxification et dans la résistance des cellules à l'uranium au cours d'une exposition chronique. L'autophagie est un des mécanismes mis en évidence comme participant à la minéralisation par les ostéoblastes (Nollet et al. 2014), et étant indispensable dans les ostéocytes pour assurer le maintien de leur fonction sur le remodelage et l'acquisition du phénotype ostéocytaire (Onal et al. 2013). Il n'est pas exclu que, sans modifier le flux autophagique, l'uranium soit pris en charge par ce processus et le détourne de sa fonction de minéralisation.

D'après nos connaissances de la littérature, les études *in vitro* cherchant à élucider les mécanismes responsables de toxicité de l'uranium sur les OBs ont principalement été conduites à la suite d'une exposition aiguë (Milgram et al. 2008a, b; Pierrefite-Carle et al. 2016). Il existe cependant quelques études qui décrivent des effets cellulaires notables de l'uranium administrés de façon chronique sur différents types cellulaires à des doses de l'ordre du micro molaire, comme dans nos expériences. L'inhibition de la résorption osseuse d'OCs primaires de souris en présence d'UA au cours de la différenciation ostéoclastique *in vitro* a été observée à partir de 2,5 μM (Gritsaenko et al. 2017). Une étude récente a également démontré l'accumulation intra-cellulaire d'uranium et la diminution de l'expression protéique de la Monoamine Oxydase-B (MAO-B), enzyme responsable de la dégradation de la sérotonine, dans des neuroblastes humains exposés pendant 7 jours à 10 μM d'UA (Carmona et al. 2018). Les effets que nous observons sur la capacité de minéralisation des MLO-A5 apparaissent à partir de 2 μM soit 476 $\mu\text{g/L}$. Pour atteindre une telle concentration sérique, l'ingestion de 119 mg est nécessaire chez l'Homme (absorption intestinale de 2 %, $\sim 5\text{L}$ de sang). Dans une population finlandaise ingérant plus de 235 μg d'uranium par jour via l'eau de boisson, une hausse des marqueurs sériques du remodelage CTx et OCN a été mesurée chez les hommes (Kurtio et al. 2005). *In vivo*, l'administration chronique d'uranium dans l'eau de boisson à hauteur de 40 mg/L, pendant 3 mois sur des rats provoque une diminution de l'épaisseur de l'os cortical et un épaissement de l'os ostéoïde (Wade-Gueye et al. 2012) accompagnée d'une diminution de l'expression des gènes OPN et DMP1 des ostéoblastes de l'os trabéculaire. Les concentrations utilisées dans le cadre de nos travaux sont certes élevées

en comparaison à ces études, mais permettent de modéliser les phénomènes se produisant localement dans l'os. En effet, l'uranium s'y fixe de façon non homogène et se concentre principalement dans les zones de remodelage (Priest et al. 1982; Ellender et al. 1995; Bourgeois et al. 2015). La concentration locale peut donc augmenter très fortement. De plus, nos observations concordent avec les résultats décrits dans ces études.

Les mécanismes responsables de l'inhibition de la capacité de minéralisation des MLO-A5 en présence d'UA doivent encore être élucidés mais il semble que celle-ci soit due à une augmentation de la synthèse de la matrice organique au détriment de sa minéralisation parallèlement à une diminution de la différenciation des OSTs vers un phénotype plus mature. Ces effets pourraient sur le long terme, altérer l'homéostasie osseuse. Des études complémentaires seront nécessaires pour vérifier ces hypothèses.

CHAPITRE II : EVALUATION DE L'EFFET D'UN DECORPORANT POTENTIEL DE L'URANIUM, LE 3,4,3-LI(1,2-HOPO), SUR LES OSTEOBLASTES ET LES OSTEOCLASTES

I. PRESENTATION

Nous avons vu que les chélateurs de l'uranium sont presque inexistantes ou se révèlent très peu efficaces pour la décorporation de l'uranium dans le tissu osseux. Dans la littérature, le HOPO se démarque et présente une efficacité supérieure de décorporation par rapport à toutes les autres molécules. De plus, ce décorporant potentiel est entré en essai clinique de phase I concernant la chélation du plutonium (An et al. 2017). Il s'agit donc de la molécule qui, d'après nos connaissances, se rapproche le plus d'un décorporant susceptible d'être commercialisé en tant que tel. L'effet de cette molécule a donc été analysé sur les cellules du remodelage osseux : les ostéoclastes et les ostéoblastes. Ces expériences visent plusieurs objectifs. Le premier objectif est de déterminer l'effet *in vitro* du HOPO sur les fonctions cellulaires des OBs et des OCs. Il existe peu de données de toxicologie de ce composé et l'os est une cible toxicologique rarement étudiée. Cependant, dans notre contexte, l'os est une cible privilégiée car il constitue le lieu de stockage à long terme de l'uranium. Ces travaux visent donc à déterminer l'innocuité de ce décorporant sur les cellules osseuses spécifiquement. Le second objectif est de déterminer si le HOPO est capable de contrecarrer *in vitro* les effets de l'uranium sur la fonction des cellules osseuses. Nous voulons vérifier ici ses propriétés de chélation de l'uranium dans notre système. Enfin, ces expériences ont également pour but de mettre au point à terme, un ou plusieurs tests de criblage permettant d'évaluer le potentiel d'autres décorporants sur les cellules osseuses, sur la base des deux premiers critères.

II. MATERIELS ET METHODES

A. CULTURE CELLULAIRE

Lignée ostéoclastique

Les cellules RAW 264.7, lignée cellulaire murine de monocytes-macrophages obtenues auprès de l'ATCC (American Type Culture Collection) sont cultivées en Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM, Lonza) supplémenté avec 5 % de Sérum de Veau Fœtal (SVF) (HyClone, GE Healthcare), 1 % d'antibiotiques P/S (100 IU/ml Pénicilline, Streptomycine 100µg/ml, Sigma-Aldrich) sous atmosphère contrôlée à 37°C, 5 % CO₂. Les cellules sont transférées par grattage mécanique ; seules les cellules de passages 4 à 9 sont utilisées dans les expériences de différenciation. Les RAW 264.7 sontensemencées à 1000 cellules/cm² en plaques 24 puits trois jours avant le début de la différenciation. Le support de culture est une plaque en polyéthylène téréphtalate (Falcon) pour les expériences d'analyse de l'ostéoclastogénèse ou une plaque présentant une surface résorbable mimant la phase minérale de l'os (Osteoassay™, Corning Life Science). Le milieu de culture est ensuite remplacé par du αMEM (Lonza) supplémenté avec 5 % de SVF (PAA Laboratories), 2 mM de L-glutamine (Sigma-Aldrich), sans antibiotiques et contenant 50 à 70 ng/mL de cytokine GST-RANK-L (production interne) pour initier la différenciation en ostéoclastes.

Lignée ostéoblastique

Les UMR-106, une lignée d'ostéosarcome de rat (ostéoblastes), sont cultivées en DMEM (Lonza) supplémenté avec 10 % de SVF (HyClone, GE Healthcare), 1 % de P/S. Pour les expériences de minéralisation, les UMR-106 sontensemencées à 2000 cellules /cm² en plaque 24 puits (Falcon). Après adhésion des cellules, le milieu est remplacé par un milieu ostéogénique constitué d'αMEM (Lonza), de 10 % de SVF (HyClone, GE Healthcare), de 2 mM de L-Glutamine (Sigma-Aldrich), de 1,4 mM de CaCl₂ (Sigma-Aldrich), de 50 µg/mL d'acide ascorbique (Sigma-Aldrich) et de 20 µg/mL de dexaméthasone (Sigma-Aldrich) pendant 3 jours. Les cellules sont ensuite cultivées dans le même milieu complété de 50 mg/mL de β-glycérophosphate (Sigma-Aldrich) pour les jours suivants.

B. EXPOSITION A L'ACETATE D'URANYLE ET AU HOPO

La solution mère d'acétate d'uranyle (UA) (100 mM, pH 4) est diluée dans une solution de bicarbonate de sodium (100 mM, Gibco, LifeTechnologies) dans le but de neutraliser le pH de la solution. Après trois heures de stabilisation à température ambiante, cette solution est diluée goutte à goutte dans le milieu de culture des cellules pour atteindre la concentration voulue. Ces solutions sont ensuite ajoutées sur les cellules après trois heures de stabilisation de la spéciation à température ambiante. Les solutions contrôles sont réalisées dans les mêmes conditions en remplaçant la solution d'UA par de l'eau stérile (Sigma). La poudre de HOPO fournie par l'équipe du Pr C. Den Auwer (ICN, Université de Nice) est solubilisée dans de l'eau pour atteindre une concentration de 40 mM puis conservée à 4°C, protégée de la lumière. La solution stock est ensuite diluée dans le milieu de culture à la concentration choisie puis ajoutée sur les cellules.

Pour les expériences de différenciation ostéoclastique, l'UA est dilué dans le milieu de différenciation ostéoclastique dès le début de la différenciation. Le HOPO est alors additionné dans le milieu contenant l'UA, juste avant l'ajout de cette solution sur les cellules, dès le début de la différenciation ou après deux jours. Les photos et les analyses de résorption sont effectuées après 4 jours de différenciation des OCs.

C. MINERALISATION ET COLORATION ALIZARINE

La coloration alizarine permet de visualiser les dépôts calciques par une coloration rouge. Les UMR-106 sont fixées en éthanol 100 % pendant une heure sur la glace, puis colorées à l'alizarine Red S dye 1 % (Alfa Aesar). Après une incubation de 10 minutes à température ambiante, les cellules sont lavées en eau déminéralisée et des photos représentatives sont prises au microscope.

D. TEST MTT

La cytotoxicité de l'uranium est évaluée par le dosage colorimétrique MTT (methylthiazol tetrazolium). Le test MTT est un test qui permet d'évaluer l'activité métabolique des cellules et ainsi, leur viabilité. Après 5 jours en minéralisation, les cellules sont incubées en présence d'une solution de MTT à 37°C à l'obscurité pendant une heure. La solution de MTT est préparée en diluant dix fois la solution stock (5 mg/ml, Sigma-Aldrich) dans du milieu Eagle's Minimum Essential Medium sans rouge phénol (EMEM, Lonza) complémenté de 10 % de SVF

(HyClone, GE Healthcare). Les cellules vivantes métabolisent le MTT en cristaux de formazan lorsqu'elles sont vivantes. Après incubation, les cristaux intra-cellulaires de formazan sont dissous dans du DMSO (Sigma-Aldrich). La coloration violette de ces cristaux est proportionnelle à la viabilité. L'absorbance est mesurée à 570 nm (absorbance du formazan) et 690 nm (bruit de fond) par un lecteur de micro-plaques (SPECTROstar Nano, BMG Labtech). Pour l'analyse, l'absorbance du bruit de fond est déduite de l'absorbance spécifique à 570 nm. Celle obtenue pour les puits ne contenant pas de cellules est aussi retranchée. Après cette correction, la viabilité cellulaire est définie à 100 % pour les cellules non exposées au HOPO.

E. MARQUAGE TRAP

Les OCs expriment la protéine TRAP, une phosphatase acide résistante au tartrate. Le marquage de cette métalloprotéine permet la visualisation des ostéoclastes. Pour ce faire, après 4 jours de différenciation, les cellules sont incubées pendant 2 minutes à température ambiante dans une solution de fixation (3 % formaldéhyde, 66% acétone dans une solution de citrate 7mM). Après deux lavages à l'eau déionisée, les cellules sont mises en présence pendant 20 minutes à 37°C et à l'obscurité de la solution de marquage TRAP du kit Leukocyte acid phosphatase kit (Sigma-Aldrich). Après deux lavages à l'eau déionisée puis au PBS, des mosaïques d'environ 350 photos reconstituant la totalité de chaque puits (de plaque 24 puits) sont prises en utilisant le microscope inversé motorisé Axio Observer Z1 et le logiciel Zen (Zeiss). Les images sont ensuite analysées à l'aide du logiciel ImageJ pour déterminer le nombre d'OCs matures (3 noyaux au minimum, marqués TRAP) et leur taille dans les différentes conditions.

F. ANALYSE DE LA RESORPTION

Les cellules sont cultivées dans les conditions décrites précédemment en utilisant des plaques Osteoassay™ (Corning Life Science). Après 4 jours de différenciation, les ostéoclastes sont enlevés par incubation pendant 5 minutes avec une solution de javel 10 % à température ambiante. Les plaques sont ensuite rincées à l'eau. Pour évaluer le pourcentage de surface résorbée, des photos inversées de chaque puits (les zones résorbées apparaissent plus foncées) sont analysées en utilisant le logiciel ImageJ. La fonction « limit to threshold » est utilisée pour obtenir une image bicolore. Le pourcentage de zones résorbées par rapport à la

totalité de la surface du puits est calculé. Le pourcentage de résorption obtenu dans les conditions contrôles est alors défini à 100 % de capacité de résorption.

G. QUANTIFICATION DE L'URANIUM PAR ICP-MS

Dans le but de mesurer l'adsorption de l'uranium sur les plaques Osteoassay™ (Corning Life Science), ces plaques ont été incubées pendant 2 jours ou 4 jours avec les solutions d'uranium à 37°C, 5 % CO². Le HOPO (préparée comme indiqué précédemment) a été ajouté pendant les deux derniers jours en même temps que l'UA. Après avoir retiré le milieu et laisser sécher les plaques à température ambiante, les puits sont rincés trois fois avec 1 mL d'acide nitrique concentré à 65 %. Les solutions de rinçages sont ensuite récupérées et évaporées jusqu'à séchage complet à 120°C sur une plaque chauffante pendant 3 à 4 heures. Le lyophilisat est ensuite dissous et dilué dans de l'acide nitrique 1 mM. Les échantillons sont injectés grâce à une pompe péristaltique (débit de 400 µL/minute) et nébulisés par un nébuliseur microconcentrique (Micromist). Le détecteur utilisé est le 7700x ICP/MS (Agilent). L'uranium est détecté pour un rapport de m/z=238 et quantifié sur la base de standards externes (PlasmaCAL). Le système est rincé pendant 30 secondes avec de l'acide nitrique 1 mM puis 30 secondes avec de l'eau après chaque analyse et une solution sans uranium est ensuite injectée pour vérifier la propreté du système avant d'injecter un nouvel échantillon. Les dosages ont été effectués grâce à la collaboration des équipes du Pr C. Den Auwer (ICN, Nice) et du Dr. A. Hagège (ISA, Lyon).

H. STATISTIQUES

Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le logiciel GraphPad Prism version 7. La normalité des résultats a été testée en utilisant le test de D'Agostino-Pearson avant de réaliser un Test One-way ANOVA (Analyse de Variance). Dans le cas où la normalité ou le nombre d'échantillons ne permettaient pas l'usage de l'ANOVA, le test de Kruskal-Wallis a été utilisé.

III. RESULTATS

A. EFFET DU HOPO SUR LES OSTEOCLASTES

Avant d'étudier la capacité de ce décorporant à contrecarrer l'effet de l'uranium sur la différenciation et la fonction de résorption des OCs, nous avons déterminé l'effet propre du HOPO sur la différenciation ostéoclastique. Ainsi, ce décorporant a été ajouté au milieu de culture pendant les deux derniers jours de différenciation des RAW 264.7 (qui dure 4 jours au total). D'après les résultats, ce décorporant induit une modification de la différenciation des RAW 264.7 en OCs se traduisant par une augmentation de 19 et 29 % de la taille médiane des ostéoclastes obtenus à 50 et 100 μM (8771 μm^2 dans les conditions contrôles, 10797 μm^2 à 50 μM et 12241 μm^2 à 100 μM de HOPO) (**Fig. 30**). Cette augmentation reflète une modification de la population des ostéoclastes obtenus car une proportion moins élevée de cellules inférieures à 5000 μm^2 est observée.

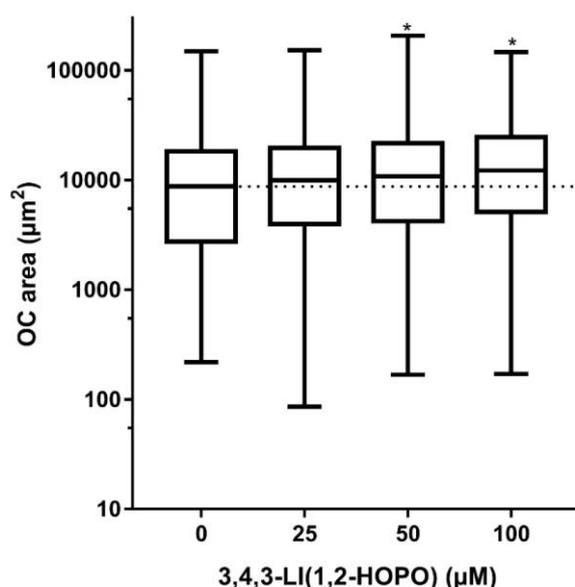


Figure 30 Détermination de la taille des OCs en présence de HOPO.

Les boîtes représentent la médiane et les quartiles, les barres correspondent aux tailles maximales et minimales des OCs obtenus dans chaque condition ($n=3$). Test statistique : Kruskal-Wallis * $p<0,05$, significatif par rapport au contrôle sans HOPO.

B. EFFET DE L'UA EN PRESENCE DE HOPO SUR LES OSTEOCLASTES

Il a été précédemment mis en évidence au laboratoire que la présence d'UA à 25 μM tout au long de la différenciation des ostéoclastes dans le milieu de culture induit une diminution de résorption de 80 % et une réduction de l'ordre de 90 % de la taille médiane des OCs matures obtenus, traduisant hypothétiquement un problème de fusion des précurseurs (Gritsaenko et al. 2017). Pour déterminer l'efficacité du HOPO à contrecarrer ces effets, les RAW 264.7 ont été exposées à l'UA tout au long de leur différenciation (4 jours) en traitant les cellules durant les 2 derniers jours avec le HOPO, dans le but de simuler un traitement curatif postérieur à une contamination à l'uranium. Nous avons ensuite déterminé la capacité de différenciation des RAW 264.7 (taille des OC obtenus en culture classique sur plastique) et de résorption (culture sur support résorbable Osteoassay™). L'ajout de 25 μM de HOPO sur les deux derniers jours permet d'augmenter de 60 % la taille médiane des RAW 264.7 exposés à 25 μM d'UA au cours des 4 jours de différenciation (2617 μm^2 avec l'UA 25 μM , et 4260 μm^2 avec l'ajout de 25 μM de HOPO). La taille des OCs obtenus est rétablie dès 50 μM de HOPO et est significativement la même que dans les conditions contrôles (**Fig. 31**). On obtient des résultats similaires en administrant le HOPO dès le début de l'intoxication à l'uranium. Cependant, la concentration de 25 μM d'UA n'induit pas une augmentation de la taille des OCs contrairement à ce qui a été observé lorsque le HOPO n'est ajouté que sur les deux derniers jours (**Fig. 32**). Pour la suite des expériences, nous avons gardé seulement le protocole consistant à administrer le HOPO 2 jours après le début de l'intoxication à l'UA.

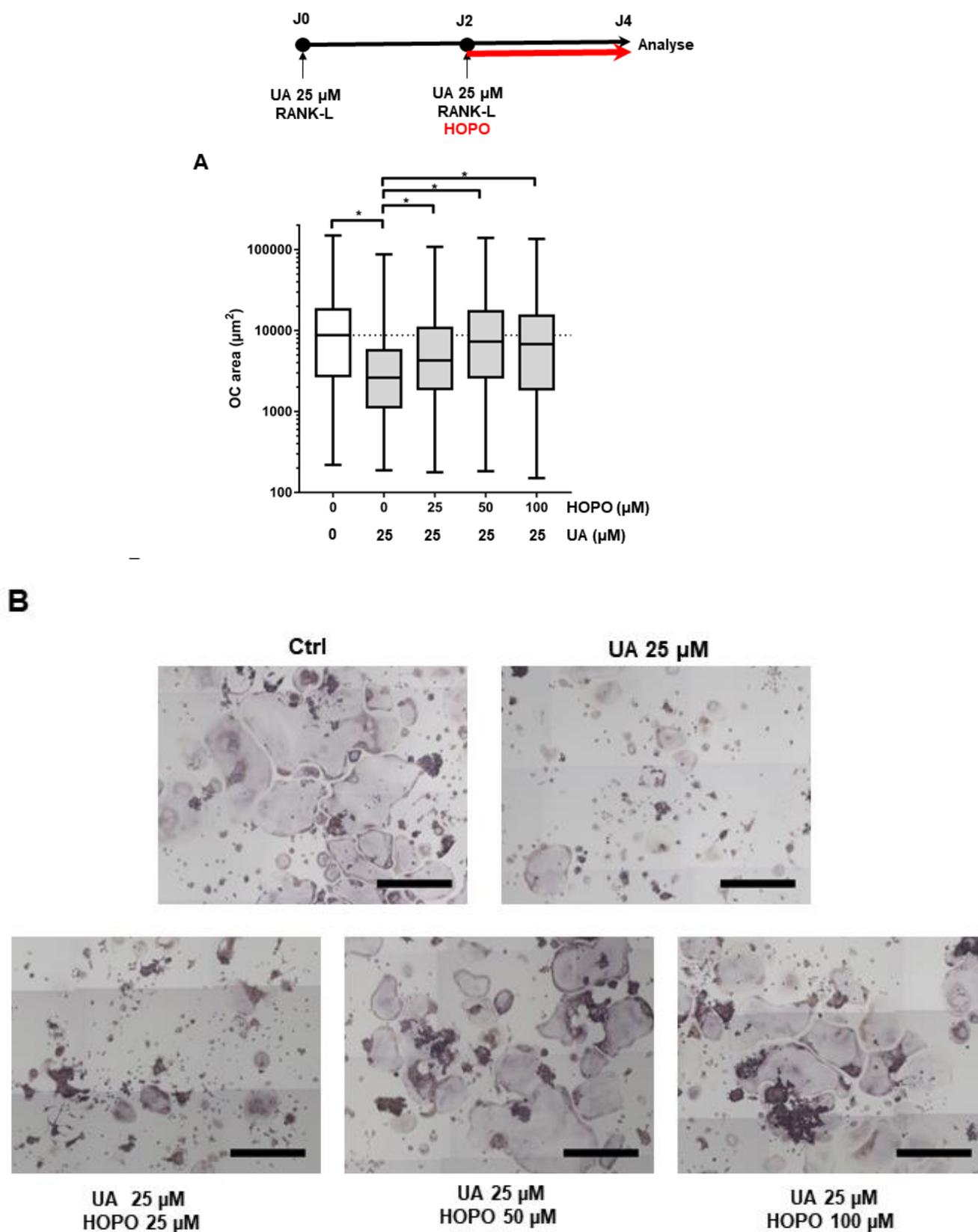


Figure 31 Détermination de la taille des OCs en présence de 25 μM d'UA et de HOPO.
 (Blanc : 0 μM UA ; gris : 25 μM UA) A : Les boîtes représentent la médiane et les quartiles. Les barres correspondant aux tailles maximales et minimales des OCs obtenus dans chaque condition (n=3). Test statistique : Kruskal Wallis, (* p<0,05 ; ns : non significatif). B : Photos représentatives des OCs obtenus après 4 jours de différenciation et marquage TRAP. Echelle : 500 μm.

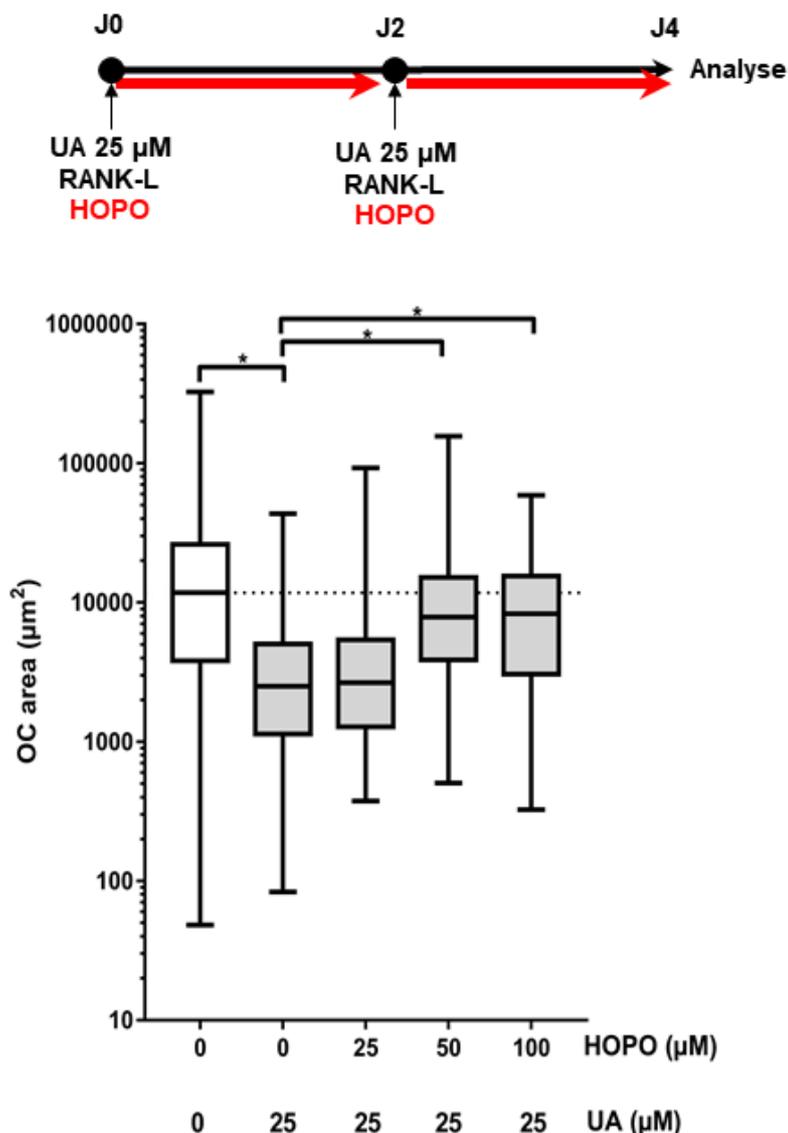


Figure 32 Détermination de la taille des OCs en présence de HOPO et d'UA 25 µM pendant 4 jours de jours de différenciation des RAW 264.7.

(blanc : 0 µM UA ; gris : 25 µM UA). Les boîtes représentent la médiane et les quartiles. Les barres correspondant aux tailles maximales et minimales des OCs obtenus dans chaque condition (n=3). Test statistique : Kruskal Wallis, (* p<0,05 ; ns : non significatif).

En exposant les cellules à 5 µM d'UA, dose à laquelle la capacité de résorption est diminuée de 38 %, la résorption est augmentée de 17 % pour les cellules traitées avec 20 µM de HOPO par rapport aux cellules exposées à l'UA seul (**Fig. 33**). De plus, on remarque que la capacité de résorption des OCs n'est pas modifiée par la présence seule de HOPO à 20 µM (données non fournies). Dans nos conditions, le HOPO permet donc d'augmenter de près de 20 % la capacité de résorption des OCs en présence de l'UA.

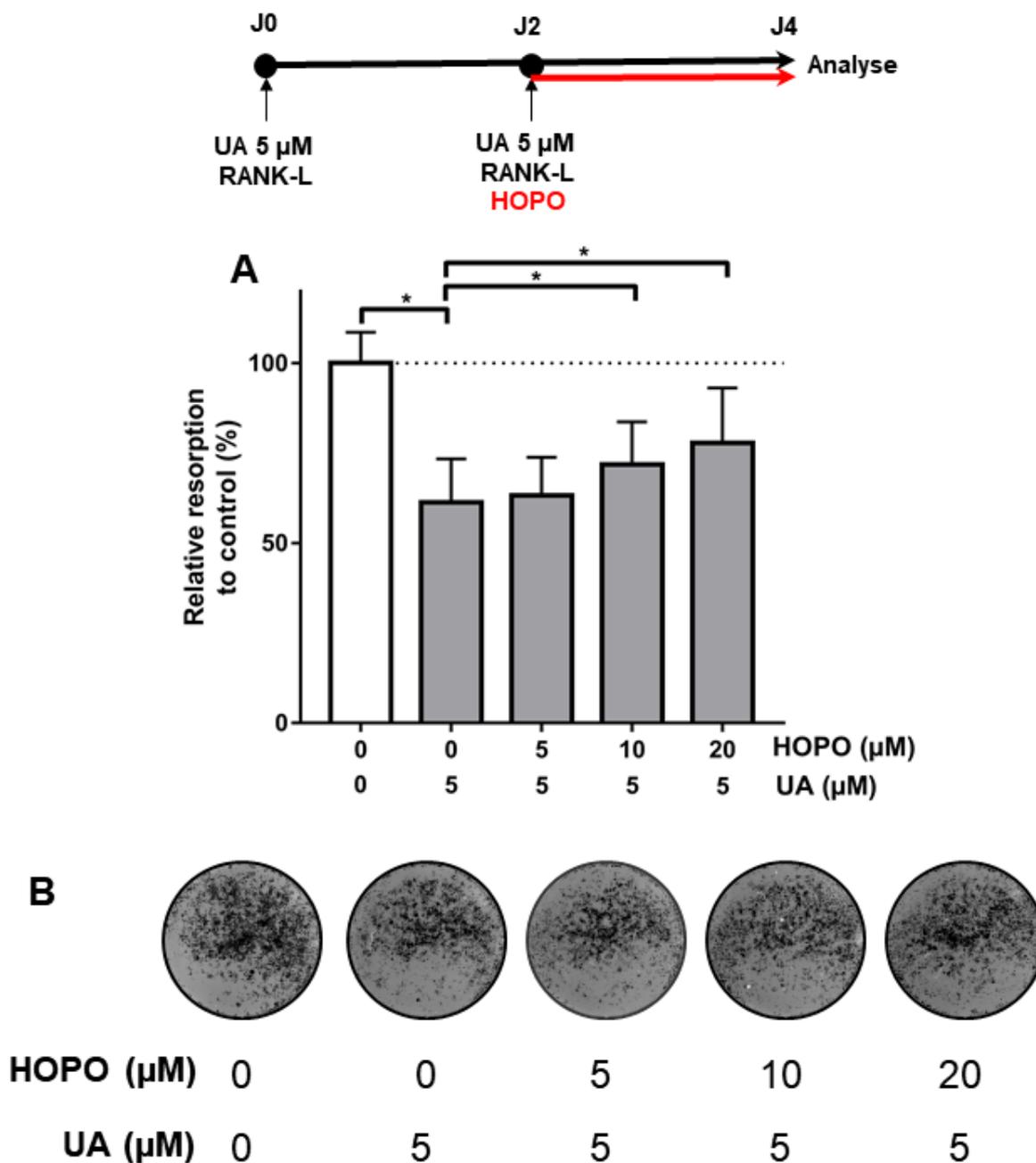


Figure 33 Détermination de la capacité de résorption des OCs en présence de 5 μM d’UA et de HOPO.

A Les boîtes représentent la médiane et les quartiles. Les barres correspondant aux tailles maximales et minimales des OCs obtenus dans chaque condition. Blanc : 0 μM UA ; gris : 5 μM UA. (n=3). Test statistique : Kruskal Wallis (p<0,05 ; ns : non significatif). B Photos représentatives de la résorption après 4 jours en présence d’UA et de HOPO. Image inversée (résorption en noir).*

C. FIXATION DE L'URANIUM SUR LES SUPPORTS BIO-MIMETIQUES

D'après des données non publiées de notre laboratoire, on sait qu'une partie de l'uranium se fixe sur les plaques Osteoassay™. La quantité d'uranium fixée augmente avec la quantité d'uranium ajoutée dans le puits en l'absence de cellules (**Fig. 34 A-B**). Cependant, nous avons observé que l'ajout de HOPO ne modifie pas la quantité d'uranium fixée (**Fig. 34 B-C**). Il ne permet donc ni de réduire la quantité d'uranium se fixant pendant les deux derniers jours, ni de désorber l'uranium déjà fixé. Ces résultats indiquent que le HOPO, même introduit en concentration presque 10 fois plus élevée que l'uranium, ne modifie pas le potentiel de fixation de l'uranium sur le support minéral.

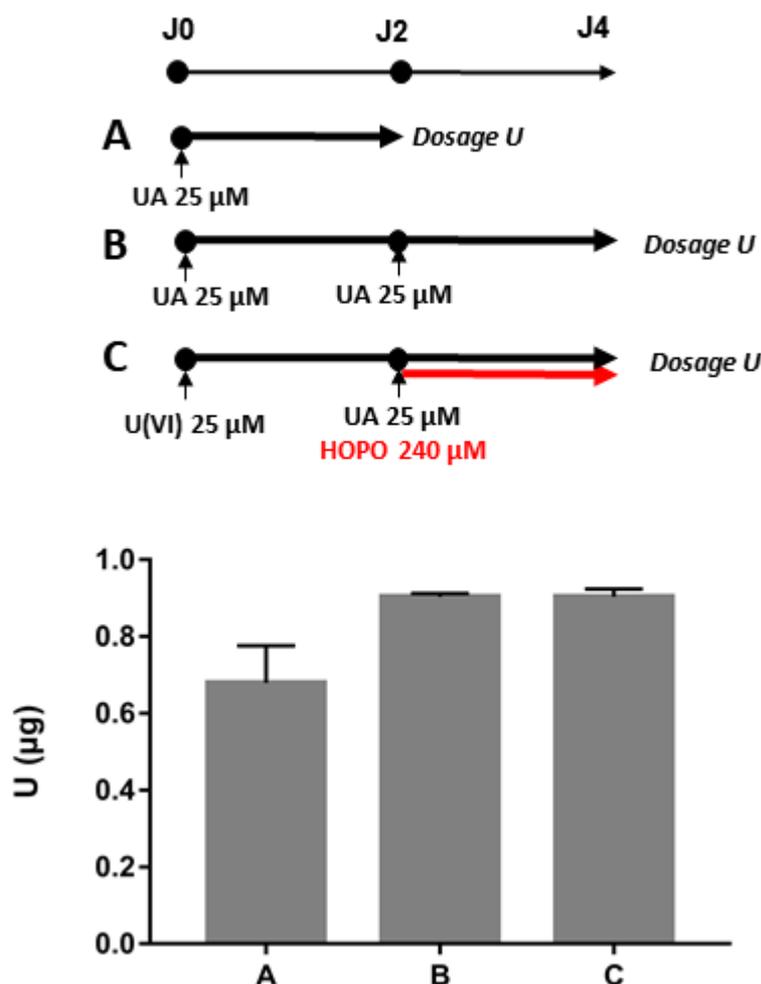


Figure 34 Dosage de l'uranium fixé par puits sur l'Osteoassay™ en présence de HOPO. A, B et C représentent le protocole d'incubation des plaques. Moyenne de trois puits par condition, $n=1$.

D. EFFET DU HOPO SUR LES OSTEOBLASTES

Afin de vérifier l'innocuité du HOPO sur les OBs, nous nous sommes intéressés aux effets propres de ce composé sur une lignée ostéoblastique de rats : les UMR-106. Après avoir observé que le HOPO n'avait pas d'effet sur la viabilité des UMR-106 à 24 h et ce jusqu'à 500 μM (données non montrées), nous avons analysé son effet sur la principale fonction des OBs, la minéralisation. Pour des doses allant de 10 à 250 μM de HOPO, une augmentation de la formation de cristaux de formazan colorés traduisant une augmentation de l'activité métabolique des OBs et donc de la viabilité cellulaire de ces cellules a été mesurée par un test MTT après 5 jours de minéralisation (**Fig. 35**). Elle est d'un facteur 1,5 pour 250 μM de HOPO par rapport aux cellules non exposées. Parallèlement à une augmentation de la viabilité, une diminution de la minéralisation dépendante de la dose est constatée à partir de 1 μM de HOPO (**Fig. 36A**), et ce, jusqu'à ne plus observer de minéralisation à 250 μM (**Fig. 36B**).

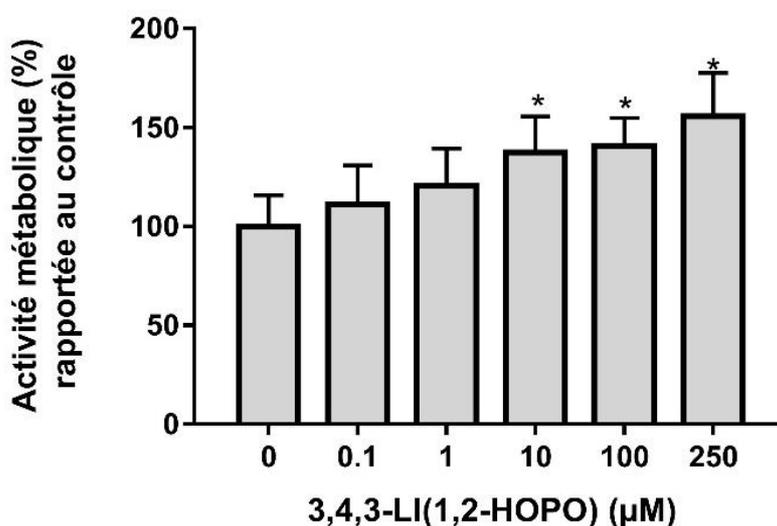


Figure 35 Activité métabolique des UMR-106 exposées au HOPO pendant les 5 jours de minéralisation mesurée par MTT.

($n=3$) * : $p < 0,05$ Kruskal Wallis, significatif par rapport à la condition sans HOPO.

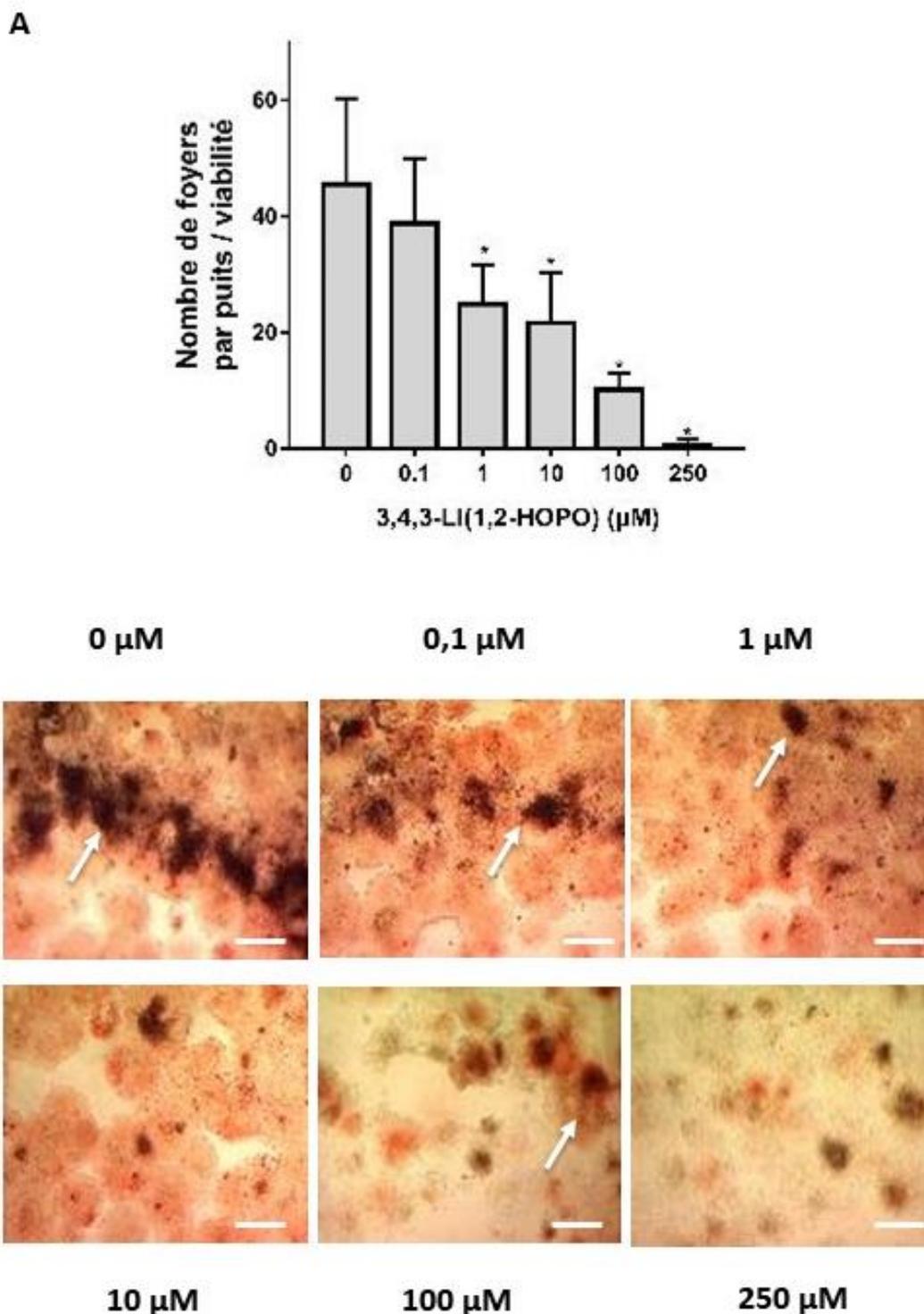


Figure 36 Minéralisation des ostéoblastes (UMR-106) en présence de HOPO pendant 5 jours.

A : Nombre de foyers de minéralisation par puits comptés en plaque 24 puits normalisé par la viabilité évaluée par MTT. (n=3) (: $p < 0,05$, One-Way ANOVA, significatif par rapport à la condition sans HOPO) B : Photos représentatives de la minéralisation après coloration Alizarine des UMR-106 après 5 jours d'exposition au HOPO. Les flèches blanches indiquent des exemples de foyers de minéralisation. Echelle : 500 µm.*

IV. DISCUSSION ET CONCLUSION

Dans cette étude, l'analyse de l'ostéoclastogénèse et de l'activité de résorption confirme les résultats observés dans des travaux précédents (Gritsaenko et al. 2017), à savoir une réduction de la taille et de la capacité de résorption des ostéoclastes dérivés de la différenciation de RAW 264.7 en présence d'UA. Le HOPO permet d'atténuer ces effets de façon dose-dépendante, sans atteindre une récupération complète de la capacité de résorption malgré la restauration de la taille des OCs. De plus, nous avons pu observer que l'uranium se fixe de façon dose-dépendante sur le support Osteoassay™. Dans nos conditions expérimentales, la quantité d'uranium fixée reste inchangée en présence du décorporant.

Par ailleurs, nous avons montré que l'exposition à 100 µM de HOPO seul sur les RAW 264.7 modifie l'ostéoclastogénèse et favorise l'augmentation de la taille des OCs obtenus après différenciation. L'efficacité du HOPO pour réduire les atteintes fonctionnelles des ostéoclastes induites par l'uranium pourrait donc résulter de deux mécanismes : la chélation de l'uranium et l'induction d'un effet antagoniste qui compenserait partiellement les effets de l'uranium.

Nous avons aussi pu observer que l'ajout de HOPO dès le début de l'exposition à l'uranium ou 2 jours après, n'augmente pas l'efficacité de celui-ci. Ces résultats suggèrent que les effets de l'uranium compensés par le HOPO sont ceux qui sont induits pendant les deux derniers jours de différenciation, période qui correspond à la fusion des précurseurs ostéoclastiques et à la différenciation en ostéoclastes matures. L'uranium impacte également la fusion des précurseurs ostéoclastiques, résultant en de plus petits ostéoclastes, beaucoup moins efficaces pour résorber la matrice (Gritsaenko et al. 2017). D'après nos résultats, le HOPO semble favoriser ce processus puisqu'il provoque une augmentation de la taille des ostéoclastes. Or, l'activité de résorption ostéoclastique est corrélée à la taille des ostéoclastes (Lees et al. 2001; Hu et al. 2008). Toutes ces informations suggèrent que le HOPO permettrait de rétablir en partie la capacité de fusion des OCs. Par ailleurs, l'absorbance du HOPO en milieu aqueux est diminuée en présence de calcium (données non publiées, effectuées par le laboratoire du Pr. C. Den Auwer, ICN, Nice). Une interaction voire une chélation des ions calcium par le HOPO est donc envisageable. Il a été démontré que la concentration calcique exerce un rétrocontrôle négatif sur la survie des ostéoclastes (Lorget et al. 2000). Une diminution de cette concentration provoquée par la chélation du calcium par le HOPO pourrait

alors favoriser la différenciation et fournir une autre explication à l'augmentation de la taille des ostéoclastes en présence de HOPO.

Enfin, dans une étude *in vivo*, la quantité de HOPO injectée chez les rats était de 30 $\mu\text{mol/kg}$ soit une concentration sanguine de environ 1 mM (pour un rat de 200 g, avec un volume sanguin de ~ 5 mL) après une intoxication par voie intra-veineuse de 0,84 $\mu\text{mol/kg}$ d'uranium injecté (~ 30 μM sérique) (Henge-Napoli et al. 1995). Dans ces conditions, le décorporant a permis de réduire de 39 % la fixation de l'uranium sur le tissu osseux. Il faudrait donc réitérer nos expériences en augmentant le ratio de concentrations HOPO / UA dans le but de déterminer si une meilleure restauration de la capacité de la résorption est possible dans nos conditions expérimentales.

D'autre part, nous avons étudié l'effet du HOPO seul sur la viabilité et sur le processus de minéralisation d'ostéoblastes. Aucune toxicité n'a été observée chez les UMR-106 après 24 h d'exposition en dessous de 500 μM de HOPO. Cependant, notre étude montre une augmentation de l'activité métabolique dès 10 μM et une inhibition de la capacité de minéralisation des cellules dès 1 μM après 5 jours d'exposition au décorporant. En comparaison, sur les Saos-2, une autre lignée ostéoblastique, l'exposition à 100 μM de chrome (Cr^{3+}) ou de cobalt durant les 21 jours de minéralisation est nécessaire pour affecter cette capacité (Andrews et al. 2011). D'après ces résultats, le HOPO est une molécule qui inhibe la fonction de minéralisation des ostéoblastes, à des concentrations inférieures à celles qui permettent de restaurer partiellement la fonction des OCs *in vitro*. Cependant, différentes études ont montrées que l'uranium s'incorpore préférentiellement et durablement dans les zones actives de remodelage osseux suite à une intoxication aiguë (Priest et al. 1982; Ellender et al. 1995; Bourgeois et al. 2015). L'inhibition de la capacité de minéralisation des OBs pourrait hypothétiquement être bénéfique en cas d'intoxication à l'uranium, empêchant ce dernier de s'incorporer dans la matrice en formation.

Dans cette étude, nous avons montré que le HOPO est capable d'inverser les effets de l'UA sur les OCs en restaurant leur taille et en augmentant de 17 % leur capacité de résorption en présence d'UA. Il induit également une augmentation de la taille des OCs, indépendamment de l'exposition à l'UA. De plus, ce décorporant s'avère délétère pour la fonction de minéralisation des ostéoblastes. Enfin, nos données préliminaires suggèrent que le HOPO ne modifie pas la fixation de l'UA sur une matrice synthétique minérale. L'efficacité de décorporation du HOPO *in vivo* ne semble donc pas dépendre uniquement de son pouvoir

chélatant. Elle pourrait s'expliquer aussi par un effet propre de cette molécule sur la fonction des cellules osseuses en diminuant l'incorporation s'effectuant au cours de la minéralisation et en favorisant la différenciation des ostéoclastes. De plus, cette étude nous a permis de mettre en place des tests fonctionnels avec lesquels il serait possible d'évaluer la capacité de nouvelles molécules à diminuer les effets de l'uranium sur la fonction des cellules osseuses.

DISCUSSION GENERALE

La mise en perspectives des résultats de ces travaux de thèse avec les données de la littérature soulève de nombreuses questions sur le mécanisme de toxicité de l'uranium ainsi que sur la stratégie à adopter pour minimiser sa toxicité *in vivo*.

Quelle est l'importance de la spéciation de l'uranium pour sa toxicité ?

Les études *in vitro* ont mis en évidence l'importance de la spéciation de l'uranium, un facteur clé qui régit sa toxicité et les réponses cellulaires engendrées (Carrière et al. 2004, 2006, Milgram et al. 2008a, b). C'est ainsi que l'expression de la BSP dans les ostéoblastes est augmentée ou diminuée selon la spéciation utilisée (Milgram et al. 2008a, b). Dans notre modèle, l'uranium est administré sous forme d'acétate d'uranyle dilué avec des carbonates dans un milieu de culture enrichi en phosphates pour favoriser la minéralisation, et en sérum de veau foetal, riche en protéines susceptibles d'interagir avec l'uranium. L'uranium se complexe en effet avec des protéiques sériques comme la transferrine, l'albumine ou la fétuine (Montavon et al. 2009; Basset et al. 2013). La plupart des études de toxicité aiguë ont été effectuées sans l'ajout de sérum dans le milieu de culture (Carrière et al. 2006; Milgram et al. 2008a; Pierrefite-Carle et al. 2016) dans le but de s'affranchir de ce paramètre, dont la composition n'est pas connue et qui peut varier d'un lot à l'autre. Dans notre étude, nous n'avons pas pu nous affranchir de sérum puisque l'exposition des MLO-A5 et des RAW 264.7 s'effectue sur plusieurs jours. En outre, la viabilité des MLO-A5 en l'absence de sérum pendant 24 h était également trop affectée pour se passer de sérum lors de l'exposition aiguë à l'UA. Des travaux précédents effectués au laboratoire ont cependant démontrés que l'ajout de sérum au cours de l'exposition des RAW 264.7 n'a pas eu d'incidence sur l'IC50 de l'UA sur ces cellules (Gritsaenko et al. 2017). Des analyses de la spéciation de l'uranium *in vivo* dans les zones de remodelage pourraient être informatives et permettraient de vérifier si celle-ci concorde avec celle présente dans notre modèle cellulaire. Chez l'Homme, les très hautes doses ingérées en Finlande via l'eau de boisson (concentrations supérieures à 300 µg/L) semblent curieusement générer peu de toxicité rénale et osseuse (Ansoborlo et al. 2009). La spéciation de l'uranium

ingéré dans cette étude semble dans ce cas une des explications de cette faible toxicité, l'uranium étant sous une forme chimique soit très faiblement absorbable, soit non toxique pour les cellules (Carrière et al. 2004). *In vitro*, il est donc nécessaire d'être particulièrement vigilant de ne pas conclure trop rapidement sur la toxicité de l'uranium. En effet, une fois absorbé, l'uranium est distribué dans l'organisme et traverse différents environnements physico-chimiques pouvant possiblement influencer sa spéciation. Par ailleurs, nos résultats suggèrent que les cellules peuvent également modifier cette spéciation. Il serait donc nécessaire d'obtenir plus d'informations sur la spéciation de l'uranium *in vivo* dans les différents tissus afin de valider nos modèles d'études.

Comment l'uranium pénètre-t-il dans les cellules ?

Nos résultats ainsi que d'autres travaux ont mis en évidence la présence d'uranium à l'intérieur des cellules osseuses et nerveuses (Paredes et al. 2016; Carmona et al. 2018). Ces résultats posent plusieurs questions :

- Comment l'uranium pénètre-t-il dans la cellule ?
- Existe-t-il un transporteur spécifique de l'uranium ?
- Comment la spéciation de l'uranium est-elle modifiée par les cellules ?

Répondre à ses questions permettrait d'envisager de cibler ses mécanismes pour diminuer la toxicité de l'uranium.

Quelle est la pertinence de notre modèle ?

Les concentrations d'uranium utilisées dans notre étude semblent élevées par rapport aux études *in vivo* et à l'intoxication chronique des populations par l'eau de boisson. Nos modèles ont pour but d'éclaircir les mécanismes en jeu dans la toxicité de l'uranium. Or *in vivo*, ce dernier est reparti inégalement dans l'os. Il se concentre alors dans certaines zones actives du remodelage. L'extraction de protéines, d'ARN ou de cellules à partir d'os de rongeurs nécessite une quantité de matériel biologique suffisante pour effectuer les analyses. Avec cette méthode, les cellules affectées par l'uranium se retrouveraient noyées parmi les cellules non affectées. Se concentrer sur certaines zones en particulier réclamerait l'utilisation d'un grand nombre animaux, sous réserve d'identifier les zones de concentration de l'uranium préalablement. Utiliser des modèles *in vitro* permet donc de mimer ce phénomène. De plus, l'uranium pourrait également se retrouver en plus fortes concentrations localement lors de

sa remobilisation au cours de la résorption osseuse ou de l'ostéolyse ostéocytaire. En effet, la période de lactation engendre une ostéolyse massive conduisant à une perte de 1 à 3 % de masse osseuse par mois d'allaitement chez la femme (Wysolmerski 2013). Les OSTs et les OCs étant responsables de ce phénomène, l'uranium incorporé dans la matrice osseuse pourrait alors se retrouver resolubilisé dans le fluide extra-cellulaire après la digestion de la matrice et impacter les cellules osseuses. Cependant, nous avons utilisé une lignée cellulaire murine immortalisée. L'utilisation de ce modèle a permis d'obtenir des données sur la toxicité de l'uranium sur les ostéocytes mais l'utilisation de cellules primaires et la culture en trois dimensions devra être envisagée pour modéliser de façon plus juste les mécanismes s'opérant *in vivo*.

Quel est l'impact de la toxicité ostéocytaire de l'uranium ?

Comme nous l'avons vu, l'uranium inhibe la capacité de minéralisation des ostéocytes et des ostéoblastes (Pierrefite-Carle et al. 2016). Après la période de lactation, la taille des lacunes ostéocytaires chez la souris retrouve rapidement une taille normale (Qing et al. 2012), probablement grâce à leur capacité de minéralisation. L'uranium remobilisé dans la lacune lors de l'ostéolyse pourrait alors inhiber ou ralentir ce phénomène et perturber l'intégrité du tissu osseux. L'ostéolyse ostéocytaire et la résorption au cours de la lactation posent également le problème de l'exposition des jeunes à l'uranium à travers le lait maternel dans lequel l'uranium ainsi que de nombreux autres métaux ont pu être détectés chez la femme (Wappelhorst et al. 2002). Une étude a relevé une plus grande sensibilité des jeunes rats, dont le squelette est encore en formation, à l'uranium par intoxication chronique via l'eau de boisson (Wade-Gueye et al. 2012). Le stockage osseux de l'uranium et sa remobilisation au gré des contraintes mécaniques et physiologiques pourrait donc impacter les futures générations à travers le lait maternel. D'après nos connaissances, aucune étude de ce type n'a été conduite dans la littérature.

Pourquoi les femelles semblent-elles moins sensibles à la toxicité de l'uranium que les mâles ?

Nous avons pu remarquer que la grande majorité des études *in vivo* ont été conduites sur des mâles. Dans les rares cas où la distinction a été faite entre les mâles et les femelles, il est apparu que ces dernières étaient moins affectées par une intoxication à l'uranium que ce soit chez l'Homme, le lapin ou le rat (Gilman et al. 1998c; Kurttio et al. 2005). De plus, une étude a relevé des modifications épigénétiques différentes entre les ovaires et les testicules de souris dont les générations précédentes avaient été intoxiquées chroniquement à l'uranium via l'eau de boisson (Elmhiri et al. 2018). Ces différences soulèvent la question de l'implication du système hormonal dans la toxicité de l'uranium. Un des mécanismes de la toxicité de l'uranium suggéré est la génération d'un stress oxydatif (observé dans différents modèles : ostéoblastes, cellules rénales, testicules, cerveau) (Miller et al. 1998; Linares et al. 2006, 2007; Thiébault et al. 2007; Tasat et al. 2007). Or, les œstrogènes exercent un rôle protecteur contre ce stress (Manolagas 2010). Les effets des œstrogènes sur la toxicité de l'uranium pourraient constituer une piste de recherche à approfondir.

Peut-on utiliser le HOPO comme décorporant ?

D'après nos résultats, le HOPO permet d'atténuer les effets de l'UA sur les ostéoclastes. Cependant, l'efficacité du HOPO ne semble pas résider uniquement dans son pouvoir de chélation. Il inhibe la capacité de minéralisation des OBs. Ces observations pourraient être problématiques *in vivo* en induisant à long terme un défaut de synthèse osseuse. Il serait donc intéressant de vérifier si ces effets sont transitoires, et peuvent disparaître une fois le traitement terminé. On pourrait alors imaginer que l'administration du HOPO de façon ponctuelle puisse empêcher la fixation osseuse de l'uranium en inhibant la minéralisation. En effet, nous avons vu sur les MLO-A5 que le processus d'incorporation de l'uranium dans la matrice osseuse semble dépendant de l'activité de minéralisation.

Dans le cadre d'intoxication aiguë de travailleurs du nucléaire ou de militaires, on pourrait envisager de développer un traitement prophylactique qui empêcherait la fixation de l'uranium, notamment dans l'os. À la vue de nos résultats, une prise continue du HOPO par prophylaxie ne semble pas envisageable. *In vivo*, les études de toxicité n'ont pas relevé de problèmes particuliers mais à notre connaissance, les effets à court ou à long terme du HOPO sur l'intégrité osseuse n'ont pas été recherchés, soulignant également le fait que l'os est un

organe rarement étudié dans le cadre des études de toxicologie. Par ailleurs, nous avons soulevé l'hypothèse selon laquelle le HOPO pourrait chélater le calcium. Cela expliquerait en partie les effets que nous observons sur les OB et les OCs. Nous ne savons pas si des études ont cherché à vérifier cette hypothèse. Si elle s'avérait juste, le HOPO pourrait potentiellement induire une hypocalcémie.

La décorporation de l'uranium, une bonne idée ?

Après une intoxication à des métaux, l'administration d'un chélateur semble à première vue une solution simple. Cependant, comme pour tout xénobiotique, la balance bénéfice-risque ne doit pas être négligée. Dans le cas des métaux lourds, la chélation doit être particulièrement réfléchie en fonction de la durée et de la dose d'exposition, et de la toxicité du traitement et du métal (Smith 2013). Nos résultats sur le HOPO mettent en exergue le fait que ces thérapies restent des xénobiotiques qui peuvent avoir un effet sur l'organisme, indépendant de la chélation de l'uranium. Ils possèdent leur propre biocinétique et leurs propres effets cellulaires (notamment dans notre cas, le HOPO modifie la minéralisation des OBs et la différenciation des OCs). Un décorporant modifie, par définition, la biocinétique de l'uranium. Il faut donc être attentif à ce que le décorporant ne provoque pas la distribution de l'uranium vers un autre organe, où l'uranium pourrait avoir des effets plus néfastes. Dans le cadre d'éléments très radioactifs comme le plutonium, la chélation a pour but de minimiser le temps d'exposition interne aux radiations en favorisant son élimination. Pour l'uranium naturel, il s'agit de diminuer sa toxicité chimique. De plus, l'uranium est retenu dans l'os pour une longue durée. Certes, sa biocinétique implique un relargage continu dans la circulation mais elle permet en contrepartie de délivrer une dose beaucoup plus faible d'uranium sur une très longue période vers le rein, organe par lequel il sera excrété. De plus, d'après la littérature, l'impact de l'uranium naturel sur la santé osseuse lors d'une contamination chronique par ingestion reste relativement faible. Certaines modifications des marqueurs sériques du remodelage (CTx, OCN) peuvent apparaître mais nécessitent des doses ingérées élevées (>235 µg/jour) comme en Finlande (Kurttio et al. 2005). A contrario, de très fortes doses dans un laps de temps court sont néphrotoxiques. La notion de décorporant est donc beaucoup plus complexe que pour un élément hautement radioactif comme le plutonium. Une décorporation très efficace de l'uranium stocké dans l'os ferait craindre un apport massif ponctuel vers le rein qui pourrait engendrer une néphrotoxicité dans le cas où la spéciation

de l'uranium serait toxique et la concentration suffisamment élevée. La spéciation de l'uranium en interaction avec le décorporant est donc un paramètre auquel il faudrait faire attention. L'uranium interagissant avec le décorporant est-il toujours toxique sur les cellules ? La stratégie de traitement à adopter et les propriétés recherchées d'un potentiel décorporant devront donc prendre en compte tous ces paramètres.

Quelles sont les autres pistes pour diminuer l'incorporation de l'uranium et sa toxicité ?

D'autres pistes pourraient être envisagées afin de réduire la toxicité de l'uranium et de minimiser son incorporation dans l'os. La spéciation de l'uranium est capitale pour sa toxicité. Maîtriser cette spéciation dans l'organisme de façon à la rendre non toxique pourrait être une piste à explorer. Il serait aussi judicieux d'étudier l'efficacité d'inhibiteurs de la minéralisation afin de minimiser l'incorporation d'uranium dans le tissu osseux après une exposition aiguë.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La décorporation de l'uranium est un enjeu de santé important en particulier pour les soldats et les travailleurs du nucléaire potentiellement exposés à de fortes concentrations d'uranium du fait de leur activité professionnelle. Les méthodes actuelles ne permettent pas de décontaminer efficacement les personnes exposées, et le développement d'un décorporant efficace est donc nécessaire. Il est primordial de comprendre les mécanismes de toxicité de l'uranium afin de pouvoir contrecarrer ses effets. Dans ce cadre, nous avons étudié la toxicité de l'uranium sur une lignée ostéocytaire afin de comprendre les mécanismes en jeu spécifiquement sur ces cellules, dont le rôle est majeur dans la régulation du remodelage osseux. Cette étude constitue les premières données connues à ce jour sur la toxicité de l'uranium sur les ostéocytes. Nos résultats ont démontré que l'UA est toxique pour les MLO-A5 à des concentrations supérieures à 600 μM et qu'il induit une augmentation du flux autophagique. De plus, ces cellules sont capables dans ces conditions d'internaliser et de modifier la spéciation de l'uranium pour le transformer en autunite, un minéral de phosphate d'uranium. Administré de façon chronique, l'UA inhibe la capacité de minéralisation et la différenciation des cellules ostéocytaires MLO-A5. De surcroît, d'après des travaux précédents, l'uranium inhibe également la capacité de minéralisation des OBs et de résorption des ostéoclastes. Nous avons aussi établi que le HOPO atténue l'inhibition de la résorption provoquée par l'UA mais provoque à lui seul une diminution de la capacité de minéralisation des OBs et une augmentation de la taille des OCs. La **figure 37** schématise les effets fonctionnels de l'uranium et du HOPO sur les cellules osseuses d'après nos résultats et des études précédentes.

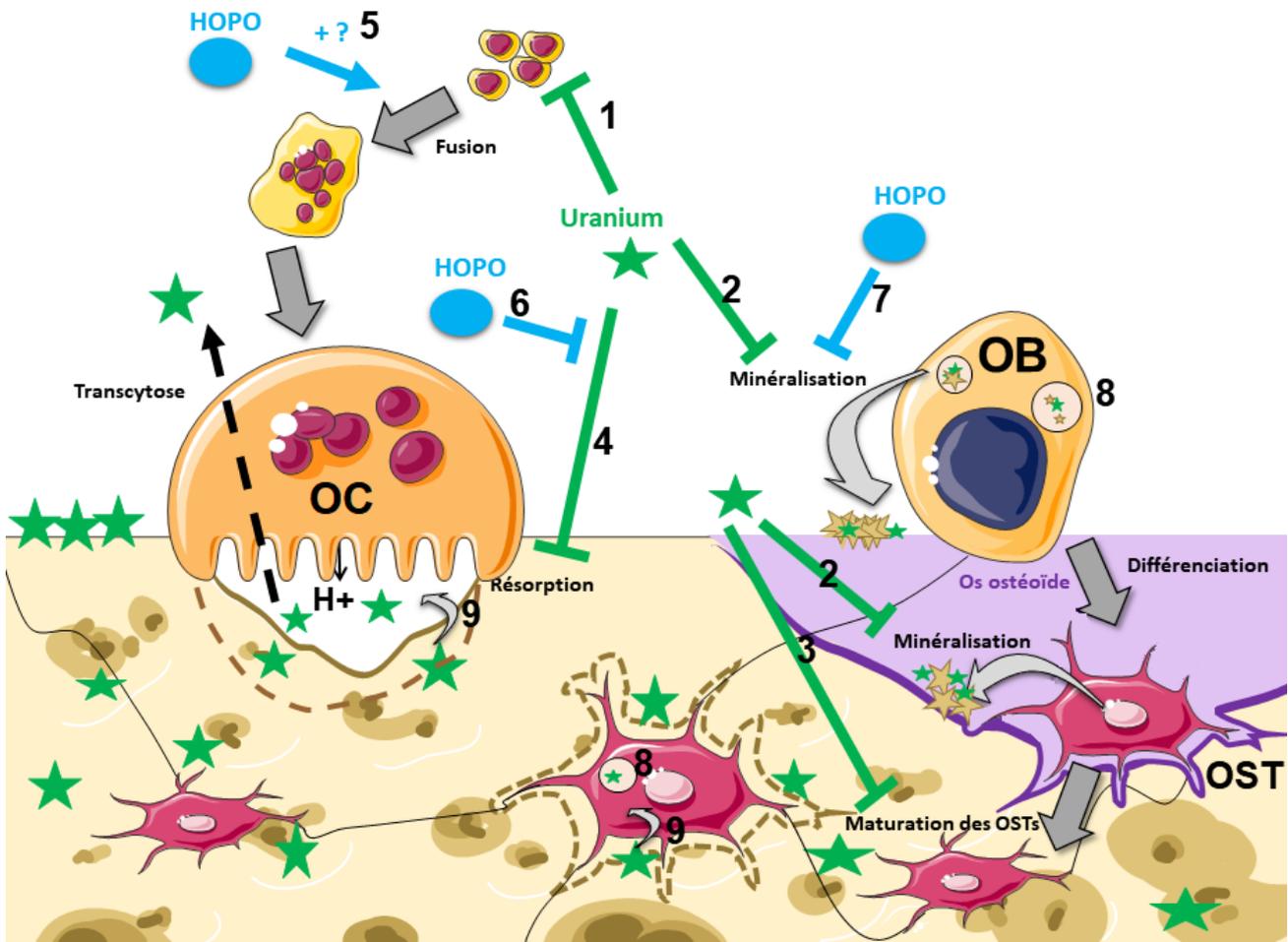


Figure 37 Schéma bilan : effets de l'uranium et du HOPO sur la fonction des cellules osseuses.

1 L'uranium diminue la viabilité des cellules précurseurs des OCs, 2 inhibe la fonction de minéralisation des OBs et des OSTs, 3 inhibe la différenciation des OSTs et 4 inhibe la capacité de résorption des OCs. 5 Le HOPO semble favoriser la fusion des précurseurs des OCs, 6 permet d'atténuer l'inhibition de la résorption induite par l'uranium et 7 inhibe la fonction de minéralisation des OBs. 8 Des vésicules contenant des cristaux d'uranium sont également schématisées dans les OBs et les OSTs. 9 De plus, la résorption et l'ostéolyse ostéocytaire remobilisent potentiellement l'uranium stocké dans la matrice osseuse vers la lacune de résorption et la lacune ostéocytaire, où il peut affecter la fonction des cellules osseuses.

Par ailleurs, un certain nombre d'investigations supplémentaires permettraient de compléter nos résultats.

Plusieurs analyses nous aideraient à mieux caractériser l'effet de l'uranium dans notre modèle d'ostéocytes. L'uranium inhibant la minéralisation des OSTs, il serait nécessaire de déterminer si cet effet relève d'une inhibition ou d'un retard. Il faudrait donc allonger la cinétique d'étude de la minéralisation des OSTs afin de vérifier si la minéralisation apparaît à des temps plus tardifs pour la concentration 5 μ M d'UA. Il serait également intéressant d'étudier la capacité de récupération des OSTs (test de clonogénicité) après l'exposition à l'UA, comme cela avait été fait lors de précédents travaux sur les ostéoblastes (Milgram et al. 2008b; Pierrefite-Carle et al. 2016) afin de déterminer si cette toxicité est réversible. Pour élucider les mécanismes responsables de la toxicité de l'uranium dans les OSTs, nous pourrions approfondir l'analyse de l'autophagie. Même si nous n'avons pas observé de modifications de l'autophagie après une exposition chronique à l'uranium dans les OSTs pendant 7 ou 10 jours, on ne sait pas avec certitude si ce processus est impliqué dans la toxicité ou la détoxification de l'uranium. La détermination de l'IC50 et l'analyse de la capacité de minéralisation de ces cellules en présence d'inhibiteurs, d'activateurs de l'autophagie ou en inactivant l'autophagie des OSTs grâce à la technologie Crispr Cas 9 permettraient de répondre à ses questions. De plus, d'autres mécanismes de toxicité de l'uranium mis en évidence dans d'autres modèles cellulaires n'ont pas été investigués ici comme par exemple le stress oxydatif et la génotoxicité. Enfin, nous avons vu que la minéralisation des MLO-A5 est nécessaire à l'incorporation de l'uranium dans la matrice synthétisée. En décellularisant des matrices synthétisées par les MLO-A5 à différents temps de minéralisation et en comparant l'incorporation d'uranium dans ces conditions, les résultats aideraient à déterminer si l'activité de la cellule est nécessaire à la fixation de l'uranium sur la matrice ou si l'interaction avec le minéral est seule responsable de cette accumulation. Il serait également intéressant d'analyser la spéciation de l'uranium incorporé dans la matrice dans ces différentes conditions par EXAFS afin d'identifier si la spéciation de l'uranium retrouvée résulte de la présence des cellules.

Les fonctions principales des ostéocytes étant l'intégration de signaux mécaniques et le contrôle des OBs et des OCs, il serait intéressant de déterminer l'impact de l'exposition à l'uranium sur la fonction de mécano-transduction de ces cellules dans un contexte de stress

mécanique. Pour cela, nous pourrions utiliser les MLO-A5 mais aussi des modèles cellulaires d'OSTs plus matures (la mécano-transduction étant leur fonction principale) comme les MLO-Y4. De plus, les OSTs communiquent avec les OBs et les OCs via le relargage de molécules régulatrices telles que la sclérostine ou RANK-L. L'analyse de l'expression de ces molécules, la réalisation de coculture ou l'utilisation de surnageants d'ostéocytes préalablement exposés à l'uranium permettraient de comprendre les effets de l'uranium sur l'orchestration du remodelage.

Nous avons démontré que le HOPO permet une restauration partielle de la fonction des OCs dans nos conditions expérimentales (à une concentration de 20 μ M). La concentration utilisée *in vivo* étant beaucoup plus élevée (1 mM sérique), nous pourrions renouveler les expériences en augmentant le rapport de concentration du HOPO/UA afin de déterminer si cette restauration pourrait être plus importante dans notre modèle. Des études complémentaires sont aussi nécessaires pour mieux comprendre l'effet du HOPO sur les ostéoclastes en présence d'uranium. En effet, l'uranium provoque une diminution du nombre de cellules mononuclées dérivées des RAW 264.7 après deux jours d'exposition à 25 μ M (Gritsaenko et al. 2017). Il faudrait vérifier si le HOPO inverse cet effet. De plus, on ignore encore le mécanisme qui permet au HOPO de diminuer la toxicité de l'UA sur les OCs. L'utilisation de l'imagerie PIXE d'OCs exposés à l'UA, l'analyse de la spéciation de l'uranium dans les ostéoclastes et sur les supports Osteoassay, et le dosage de l'uranium dans le surnageant de culture, en présence ou non du HOPO, permettraient de nous donner des éléments de réponse.

Enfin, nous n'avons pas caractérisé l'efficacité du HOPO à contrecarrer les effets de l'uranium sur les UMR-106. En effet, plusieurs scénarios sont envisageables :

- ❖ la toxicité de l'uranium et les effets du HOPO pourraient s'additionner ou se potentialiser,
- ❖ le HOPO étant un chélateur de l'uranium, l'interaction mutuelle entre ces deux composés pourrait atténuer leur toxicité sur la capacité de minéralisation.

L'os est un tissu complexe. Son homéostasie résulte du maintien d'un équilibre sensible entre destruction et synthèse osseuse. De plus, les cellules osseuses interagissent entre elles ainsi qu'avec la matrice extra-cellulaire, cette dernière pouvant également être modifiée par l'incorporation d'uranium en son sein. Il faut donc considérer la toxicité de l'uranium dans son ensemble. Les effets sur les différents types cellulaires peuvent s'ajouter ou se contrebalancer, modifiant ainsi l'équilibre final. Pour mieux comprendre les atteintes observées *in vivo*, il serait donc nécessaire de complexifier notre modèle en intégrant progressivement plusieurs acteurs du remodelage osseux et en utilisant des cellules primaires.

Pour conclure, ces travaux de thèse ont permis d'accroître les connaissances de la toxicité chimique de l'uranium sur les cellules osseuses, et ont apporté de nouvelles données toxicologiques *in vitro* concernant les effets du HOPO dans nos modèles cellulaires. Ces résultats permettront d'adapter ces méthodes pour identifier de nouvelles molécules susceptibles de devenir des agents décorporants de l'uranium.

BIBLIOGRAPHIE

A

Abergel RJ, Durbin PW, Kullgren B, et al (2010) Biomimetic actinide chelators: An update on the preclinical development of the orally active hydroxypyridonate decorporation agents 3,4,3-LI(1,2-HOPO) and 5-LIO(ME-3,2-HOPO). *Health Phys* 99:401- 407

Addison WN, Azari F, Sørensen ES, et al (2007) Pyrophosphate inhibits mineralization of osteoblast cultures by binding to mineral, up-regulating osteopontin, and inhibiting alkaline phosphatase activity. *J Biol Chem* 282:15872- 15883

Aguirre JI, Plotkin LI, Stewart SA, et al (2006) Osteocyte apoptosis is induced by weightlessness in mice and precedes osteoclast recruitment and bone loss. *J Bone Miner Res* 21:605- 615

Ajubi NE, Klein-Nulend J, Nijweide PJ, et al (1996) Pulsating fluid flow increases prostaglandin production by cultured chicken osteocytes-A cytoskeleton-dependent process. *Biochem Biophys Res Commun* 225:62- 68

Al-Qasbi H, Law GTW, Fifield LK, et al (2018) Deposition of artificial radionuclides in sediments of Loch Etive, Scotland. *J Environ Radioact* 187:45- 52

Almeida M, Han L, Bellido T, et al (2005) Wnt proteins prevent apoptosis of both uncommitted osteoblast progenitors and differentiated osteoblast by β -catenin-dependent and -independent signaling cascades involving Src/ERK and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT. *J Biol Chem* 280:41342- 41351

Amarasekara DS, Yun H, Kim S, et al (2018) Regulation of Osteoclast Differentiation by Cytokine Networks. *Immune Netw* 18:1- 18

An DD, Kullgren B, Jarvis EE, Abergel RJ (2017) From early prophylaxis to delayed treatment: Establishing the plutonium decorporation activity window of hydroxypyridinonate chelating agents. *Chem Biol Interact* 267:80- 88

Andersen O (1999) Principles and recent developments in chelation treatment of metal intoxication. *Chem Rev* 99:2683- 2710

Anderson HC (1995) Molecular Biology of Matrix Vesicles. *Clin Orthop Relat Res* 266- 80

Andrews RE, Shah KM, Wilkinson JM, Gartland A (2011) Effects of cobalt and chromium ions at clinically equivalent concentrations after metal-on-metal hip replacement on human osteoblasts and osteoclasts: Implications for skeletal health. *Bone* 49:717- 723

Ansoborlo É, Taran F, Benech H, et al (2009) À La Recherche De Nouvelles Thérapeutiques. *Biofutur* 295:41- 43

Arbogast F, Gros F (2018) Lymphocyte autophagy in homeostasis, activation, and inflammatory diseases. *Front Immunol* 9:1- 18

Arzuaga X, Gehlhaus M, Strong J (2015) Modes of action associated with uranium induced adverse effects in bone function and development. *Toxicol Lett* 236:123- 130

Arzuaga X, Rieth SH, Bathija A, Cooper GS (2010) Renal effects of exposure to natural and depleted uranium: A review of the epidemiologic and experimental data. *J Toxicol Environ Heal - 13*:527- 545

Azuma Y, Kaji K, Katogi R, et al (2000) Tumor necrosis factor-alpha induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts. *J Biol Chem* 275:4858- 4864

B

Baht GS, Hunter GK, Goldberg HA (2008) Bone sialoprotein-collagen interaction promotes hydroxyapatite nucleation. *Matrix Biol* 27:600- 608

Baron R, Kneissel M (2013) WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat Med* 19:179- 192

Basset C, Averseng O, Ferron P-J, et al (2013) Revision of the Biodistribution of Uranyl in Serum: Is Fetuin - A the Major Protein Target? *Chem Res Toxicol* 26:645- 653

Batchelor AL, Jenner TJ, Papworth DG (1982) Influence of macrophages on microdistribution of inhaled UO₂ aerosol in rat lung. *Phys Med Biol* 27:949- 957

- Batra N, Burra S, Siller-Jackson AJ, et al (2012) Mechanical stress-activated integrin $\alpha 5\beta 1$ induces opening of connexin 43 hemichannels. *Proc Natl Acad Sci* 109:3359- 3364
- Beck GR (2003) Inorganic phosphate as a signaling molecule in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem* 90:234- 243
- Beier EE, Sheu TJ, Dang D, et al (2015) Mechanisms by which lead inhibits osteoblastic bone-forming activity through modulation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *J Biol Chem* 290:18216- 18226
- Bendre MS, Montague DC, Peery T, et al (2003) Interleukin-8 stimulation of osteoclastogenesis and bone resorption is a mechanism for the increased osteolysis of metastatic bone disease. *Bone* 33:28- 37
- Berisha F, Goessler W (2013) Uranium in Kosovo's drinking water. *Chemosphere* 93:2165- 2170
- Basic L, Muhovic I, Asic A, Kurtovic-Kozaric A (2017) Meta-analysis of depleted uranium levels in the Balkan region. *J Environ Radioact* 172:207- 217
- Bhattacharyya MH, Whelton BD, Stern PH, Peterson DP (1988) Cadmium accelerates bone loss in ovariectomized mice and fetal rat limb bones in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:8761- 8765
- Bo T, Yan F, Guo J, et al (2016) Characterization of a Relatively Malignant Form of Osteopetrosis Caused by a Novel Mutation in the PLEKHM1 Gene. *J Bone Miner Res* 31:1979- 1987
- Bodine PVN, Vernon SK, Komm BS (1996) Establishment and hormonal regulation of a conditionally transformed preosteocytic cell line from adult human bone. *Endocrinology* 137:4592- 4604
- Bonewald LF (2011) The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res* 26:229- 238
- Bonewald LF (2013) Osteocyte Biology. *Osteoporos Fourth Ed* 209- 234

- Boskey AL (2015) Bone composition: relationship to bone fragility and anti-osteoporotic drug effects. *Bonekey Rep* 4:1- 11
- Boulefour W, Juignet L, Bouet G, et al (2016) The role of the SIBLING, Bone Sialoprotein in skeletal biology - Contribution of mouse experimental genetics. *Matrix Biol* 52- 54:60- 77
- Bourgeois D, Burt-Pichat B, Le Goff X, et al (2015) Micro-distribution of uranium in bone after contamination: new insight into its mechanism of accumulation into bone tissue. *Anal Bioanal Chem* 407:6619- 6625
- Bozal CB, Martinez AB, Cabrini RL, Ubios AM (2005) Effect of ethane-1-hydroxy-1,1-bisphosphonate (EHBP) on endochondral ossification lesions induced by a lethal oral dose of uranyl nitrate. *Arch Toxicol* 79:475- 481
- Briner W, Murray J (2005) Effects of short-term and long-term depleted uranium exposure on open-field behavior and brain lipid oxidation in rats. *Neurotoxicol Teratol* 27:135- 144
- Brugge D, Buchner V (2011) Health effects of uranium: New research findings. *Rev Environ Health* 26:231- 249
- Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, et al (1998) Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 12:1260- 1268
- Bunin DI, Chang PY, Doppalapudi RS, et al (2013) Dose-Dependent Efficacy and Safety Toxicology of Hydroxypyridinonate Actinide Decorporation Agents in Rodents: Towards a Safe and Effective Human Dosing Regimen. *Radiat Res* 179:171- 182
- Burgers TA, Williams BO (2013) Regulation of Wnt/ β -catenin signaling within and from osteocytes. *Bone* 54:244- 249

C

- Cabahug-Zuckerman P, Stout RF, Majeska RJ, et al (2018) Potential role for a specialized β 3 integrin-based structure on osteocyte processes in bone mechanosensation. *J Orthop Res* 36:642- 652

- Camuzard O, Santucci-Darmanin S, Breuil V, et al (2016) Sex-specific autophagy modulation in osteoblastic lineage: a critical function to counteract bone loss in female. *Oncotarget* 7:66416- 66428
- Cardoso L, Herman BC, Verborgt O, et al (2009) Osteocyte Apoptosis Controls Activation of Intracortical Resorption in Response to Bone Fatigue. *J Bone Miner Res* 24:597- 605
- Carmona A, Malard V, Avazeri E, et al (2018) Uranium exposure of human dopaminergic cells results in low cytotoxicity, accumulation within sub-cytoplasmic regions, and down regulation of MAO-B. *Neurotoxicology* 68:177-188
- Carrière M, Avoscan L, Collins R, et al (2004) Influence of Uranium Speciation on Normal Rat Kidney (NRK-52E) Proximal Cell Cytotoxicity. *Chem Res Toxicol* 17:446-452
- Carrière M, Thiebault C, Milgram S, et al (2006) Citrate does not change uranium chemical speciation in cell culture medium but increases its toxicity and accumulation in NRK-52E cells. *Chem Res Toxicol* 19:1637-1642
- Carvalho FP, Oliveira JM (2010) Uranium isotopes in the Balkan's environment and foods following the use of depleted uranium in the war. *Environ Int* 36:352-360
- Cerri PS, Boabaid F, Katchburian E (2003) Combined TUNEL and TRAP methods suggest that apoptotic bone cells are inside vacuoles of alveolar bone osteoclasts in young rats. *J Periodontal Res* 38:223-226
- Chen H, Senda T, Kubo KY (2015) The osteocyte plays multiple roles in bone remodeling and mineral homeostasis. *Med Mol Morphol* 48:61-68
- Chen K, Yang YH, Jiang SD, Jiang LS (2014) Decreased activity of osteocyte autophagy with aging may contribute to the bone loss in senile population. *Histochem Cell Biol* 142:285-295
- Chen L, Wei XQ, Evans B, et al (2008) IL-23 promotes osteoclast formation by up-regulation of receptor activator of NF- κ B (RANK) expression in myeloid precursor cells. *Eur J Immunol* 38:2845-2854
- Chen X, Wang L, Zhao K, Wang H (2018) Osteocytogenesis: Roles of Physicochemical Factors, Collagen Cleavage and Exogenous Molecules. *Tissue Eng Part B Rev* 24:215-225

Cheng J, Liu J, Shi Z, et al (2011) Interleukin-4 inhibits RANKL-induced NFATc1 expression via STAT6: A novel mechanism mediating its blockade of osteoclastogenesis. *J Cell Biochem* 112:3385-3392

Cherian PP, Cheng B, Gu S, et al (2003) Effects of Mechanical Strain on the Function of Gap Junctions in Osteocytes are Mediated through the Prostaglandin EP2 Receptor. *J Biol Chem* 278:43146-43156

Cinelli G, Tollefsen T, Bossew P, et al (2018) Digital version of the European Atlas of natural radiation. *J Environ Radioact* 1-13

Croce KR, Yamamoto A (2018) A role for autophagy in Huntington's disease. *Neurobiol Dis*
Unedited manuscript

D

Dalal A, Pawar V, McAllister K, et al (2012) Orthopedic implant cobalt-alloy particles produce greater toxicity and inflammatory cytokines than titanium alloy and zirconium alloy-based particles in vitro, in human osteoblasts, fibroblasts, and macrophages. *J Biomed Mater Res - Part A* 100 A:2147-2158

Dallas SL, Bonewald LF (2010) Dynamics of the transition from osteoblast to osteocyte. *Ann N Y Acad Sci* 1192:437-443

Dallas SL, Prideaux M, Bonewald LF (2013) The osteocyte: An endocrine cell . . . and more. *Endocr Rev* 34:658-690

Daraei B, Pourahmad J, Hamidi-Pour N, et al (2012) Uranyl acetate induces oxidative stress and mitochondrial membrane potential collapse in the human dermal fibroblast primary cells. *Iran J Pharm Res* 11:495-501

Davis HM, Pacheco-Costa R, Atkinson EG, et al (2017) Disruption of the Cx43/miR21 pathway leads to osteocyte apoptosis and increased osteoclastogenesis with aging. *Aging Cell* 16:551-563

- Deretic V, Jiang S, Dupont N (2012) Autophagy intersections with conventional and unconventional secretion in tissue development, remodeling and inflammation. *Trends Cell Biol* 22:397-406
- DeSelm CJ, Miller BC, Zou W, et al (2011) Autophagy proteins regulate the secretory component of osteoclastic bone resorption. *Dev Cell* 21:966-974
- Dinocourt C, Culeux C, Legrand M, et al (2017) Chronic exposure to uranium from gestation: Effects on behavior and neurogenesis in adulthood. *Int J Environ Res Public Health* 14:536
- Dinocourt C, Legrand M, Dublineau I, Lestaevel P (2015) The neurotoxicology of uranium. *Toxicology* 337:58-71
- Dole NS, Mazur CM, Acevedo C, et al (2017) Osteocyte-Intrinsic TGF- β Signaling Regulates Bone Quality through Perilacunar/Canalicular Remodeling. *Cell Rep* 21:2585-2596
- Domingo JL, Llobet JM, Tomas JM, Corbella J (1987) Acute Toxicity of Uranium in Rats and Mice. *Bull Environ Contam Toxicol* 39:168-174
- Dublineau I, Grandcolas L, Grison S, et al (2007) Modifications of Inflammatory Pathways in Rat Intestine Following Chronic Ingestion of Depleted Uranium. *Toxicol Sci* 98:458-468
- Dublineau I, Grison S, Baudelin C, et al (2005) Absorption of uranium through the entire gastrointestinal tract of the rat. *Int J Radiat Biol* 81:473-482
- Durbin PW (1997) New agents for in vivo chelation of uranium (VI): efficacy and toxicity in mice of multidentate catecholate and hydroxypyridinonate ligands. *Health Phys* 72:865-879
- E**
- Ellender M, Haines JW, Harrison JD (1995) The distribution and retention of plutonium, americium and uranium in CBA/H mice. *Hum Exp Toxicol* 14:38-48
- Elmhiri G, Gloaguen C, Grison S, et al (2018) DNA methylation and potential multigenerational epigenetic effects linked to uranium chronic low-dose exposure in gonads of males and females rats. *Toxicol Lett* 282:64-70

Eriksen EF (2010) Cellular mechanisms of bone remodeling. *Rev Endocr Metab Disord* 11:219-227

F

Fattal E, Tsapis N, Phan G (2015) Novel drug delivery systems for actinides (uranium and plutonium) decontamination agents. *Adv Drug Deliv Rev* 90:40-54

Francis F, Hennig S, Korn B, et al (1995) A gene (PEX) with homologies to endopeptidases is mutated in patients with X-linked hypophosphatemic rickets. *Nat Genet* 11:130-136

Francis RM (1995) Oral bisphosphonates in the treatment of osteoporosis: a review. *Curr Ther Res* 56:831-851

Fukuda S, Ikeda M, Chiba M, Kaneko K (2006) Clinical diagnostic indicators of renal and bone damage in rats intramuscularly injected with depleted uranium. *Radiat Prot Dosimetry* 118:307-314

G

Gallagher CM, Moonga BS, Kovach JS (2010) Cadmium, follicle-stimulating hormone, and effects on bone in women age 42-60 years, NHANES III. *Environ Res* 110:105-111

Gammoh N, Wilkinson S (2014) Autophagy in cancer biology and therapy. *Front Biol (Beijing)* 9:35-50

Gaur T, Lengner CJ, Hovhannisyan H, et al (2005) Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *J Biol Chem* 280:33132-33140

Gehron Robey P (2008) Chapter 17 – Noncollagenous Bone Matrix Proteins. In: Principles of Bone Biology-3rd Edition. p 335-349

Georgess D, Machuca-gayet I, Blangy A, Jurdic P (2014) Podosome organization drives osteoclast-mediated bone resorption. 8:192-204

Gericke A, Qin C, Spevak L, et al (2005) Importance of phosphorylation for osteopontin regulation of biomineralization. *Calcif Tissue Int* 77:45-54

- Ghadially FN, Lalonde JA, Yang-steppuhn S (1982) Uraniosomes Produced in Cultured Rabbit Kidney Cells by Uranyl Acetate. *Cell pathol* 39:21-30
- Gilman a P, Villeneuve DC, Secours VE, et al (1998a) Uranyl nitrate: 28-day and 91-day toxicity studies in the Sprague-Dawley rat. *Toxicol Sci* 41:117-128
- Gilman AP, Moss MA, Villeneuve DC, et al (1998b) Uranyl Nitrate: 91-Day Exposure and Recovery Studies in the Male New Zealand White Rabbit. *Toxicol Sci* 41:138-151
- Gilman AP, Villeneuve DC, Secours VE, et al (1998c) Uranyl nitrate: 91-day toxicity studies in the New Zealand white rabbit. *Toxicol Sci* 41:129-37
- Gluhak-Heinrich J, Ye L, Bonewald LF, et al (2003) Mechanical Loading Stimulates Dentin Matrix Protein 1 (DMP1) Expression in Osteocytes In Vivo. *J Bone Miner Res* 18:807-817
- Goode A, Layfield R (2010) Recent advances in understanding the molecular basis of Paget disease of bone. *J Clin Pathol* 63:199-203
- Grappin L, Legoff J-P, Carbone L, et al (2009) Traitement par le Ca-DTPA des contaminations internes par le plutonium et l'américium : Recommandations pour la rédaction de protocoles dans les centres CEA et AREVA. *Radioprotection* 44:447-461
- Grignard E, Guéguen Y, Grison S, et al (2008) Contamination with depleted or enriched uranium differently affects steroidogenesis metabolism in rat. *Int J Toxicol* 27:323-328
- Gritsaenko T, Pierrefite-Carle V, Lorivel T, et al (2017) Natural uranium impairs the differentiation and the resorbing function of osteoclasts. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 1861:715-726
- Guéguen Y, Grandcolas L, Baudelin C, et al (2007) Effect of acetaminophen administration to rats chronically exposed to depleted uranium. *Toxicology* 229:62-72
- Gueguen Y, Rouas C, Monin A, et al (2014) Molecular, cellular, and tissue impact of depleted uranium on xenobiotic-metabolizing enzymes. *Arch Toxicol* 88:227-239
- Guglielmotti MB, Ubios AM, Cabrini RL (1985) Alveolar wound healing alteration under uranyl nitrate intoxication. *J Oral Pathol Med* 14:565-572

H

- Hasegawa T (2018) Ultrastructure and biological function of matrix vesicles in bone mineralization. *Histochem Cell Biol* 149:289-304
- Hayashida C, Ito J, Nakayachi M, et al (2014) Osteocytes produce interferon- β as a negative regulator of osteoclastogenesis. *J Biol Chem* 289:11545-11555
- He G, Gajjerman S, Schultz D, et al (2005) Spatially and temporally controlled biomineralization is facilitated by interaction between self-assembled dentin matrix protein 1 and calcium phosphate nuclei in solution. *Biochemistry* 44:16140-16148
- He G, George A (2004) Dentin Matrix Protein 1 Immobilized on Type I Collagen Fibrils Facilitates Apatite Deposition in Vitro. *J Biol Chem* 279:11649-11656
- Henge-Napoli MH, Ansoborlo E, Chazel V, et al (1999) Efficacy of ethane-1-hydroxy-1, 1-bisphosphonate (EHBP) for the decorporation of uranium after intramuscular contamination in rats. *Int J Radiat Biol* 75:1473-1477
- Henge-Napoli MH, Archimbaud M, Ansoborlo E, et al (1995) Efficacy of 3,4,3-LIHOPO for reducing the retention of uranium in rat after acute administration. *Int J Radiat Biol* 68:389-393
- Hock JM, Gunness-Hey M, Poser J, et al (1986) Stimulation of undermineralized matrix formation by 1,25 dihydroxyvitamin D3 in long bones of rats. *Calcif Tissue Int* 38:79-86
- Hocking LJ, Whitehouse C, Helfrich MH (2012) Autophagy: A new player in skeletal maintenance? *J Bone Miner Res* 27:1439-1447
- Holmbeck K, Bianco P, Pidoux I, et al (2005) The metalloproteinase MT1-MMP is required for normal development and maintenance of osteocyte processes in bone. *J Cell Sci* 118:147-156
- Hu Y, Ek-Rylander B, Karlström E, et al (2008) Osteoclast size heterogeneity in rat long bones is associated with differences in adhesive ligand specificity. *Exp Cell Res* 314:638-650
- Hughes DE, Salter DM, Simpson R (1994) CD44 expression in human bone: A novel marker of osteocytic differentiation. *J Bone Miner Res* 9:39-44

Hwang S-Y, Kim J-Y, Kim K-W, et al (2004) IL-17 induces production of IL-6 and IL-8 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via NF-kappaB- and PI3-kinase/Akt-dependent pathways. *Arthritis Res Ther* 6:120-8

Hwang SJ, Choi B, Kang SS, et al (2012) Interleukin-34 produced by human fibroblast-like synovial cells in rheumatoid arthritis supports osteoclastogenesis. *Arthritis Res Ther* 14:1-10

I

Ielsch G, Cuney M, Buscail F, et al (2017) Estimation and mapping of uranium content of geological units in France. *J Environ Radioact* 166:210-219

Igarashi Y, Yamakawa A, Ikeda N (1987) Plutonium and Uranium in Japanese Human Tissues. *Radioisotopes* 36:433-439

Ikeda T, Utsuyama M, Hirokawa K (2001) Expression profiles of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand, receptor activator of nuclear factor kappaB, and osteoprotegerin messenger RNA in aged and ovariectomized rat bones. *J Bone Miner Res* 16:1416-25

IRSN (2010) Fiche Radionucléide environnement : Uranium naturel et environnement. https://www.irsn.fr/FR/professionnels_sante/documentation/Documents/IRSN-fiche_uranium-naturel.pdf

IRSN (2011) Gestion des sites potentiellement pollués par des substances radioactives

J

Jahnen-Dechent W, Heiss A, Schäfer C, Ketteler M (2011) Fetuin-A regulation of calcified matrix metabolism. *Circ Res* 108:1494-1509

James AC, Sasser LB, Stuit DB, et al (2007) USTUR whole body case 0269: Demonstrating effectiveness of i.v. Ca-DTPA for Pu. *Radiat Prot Dosimetry* 127:449-455

James KA, Meliker JR (2013) Environmental cadmium exposure and osteoporosis: A review. *Int J Public Health* 58:737-745

Jing D, Baik AD, Lu XL, et al (2014) In situ intracellular calcium oscillations in osteocytes in intact mouse long bones under dynamic mechanical loading. *FASEB J* 28:1582-1592

Jurdic P (2009) Film : Résorption de l'apatite et zones de scellement. https://www.canal-u.tv/video/tele2sciences/resorption_de_l_apatite_et_zones_de_scellement.10236

K

Kalinich JF, Ramakrishnan N, Villa V, McClain DE (2002) Depleted uranium-uranyl chloride induces apoptosis in mouse J774 macrophages. *Toxicology* 179:105-114

Kalliolias GD, Zhao B, Triantafyllopoulou A, et al (2010) Interleukin-27 inhibits human osteoclastogenesis by abrogating RANKL-mediated induction of nuclear factor of activated T cells c1 and suppressing proximal RANK signaling. *Arthritis Rheum* 62:402-413

Kanaji A, Orhue V, Caicedo MS, et al (2014) Cytotoxic effects of cobalt and nickel ions on osteocytes in vitro. *J Orthop Surg Res* 9:1-8

Kane R, Ma PX (2013) Mimicking the nanostructure of bone matrix to regenerate bone. *Mater Today* 16:418-423

Kar R, Riquelme MA, Werner S, Jiang JX (2013) Connexin 43 channels protect osteocytes against oxidative stress-induced cell death. *J Bone Miner Res* 28:1611-1621

Kathren RL, Burklin RK (2008) Acute chemical toxicity of uranium. *Health Phys* 94:170-179

Kato Y, Boskey A, Spevak L, et al (2001) Establishment of an osteoid preosteocyte-like cell MLO-A5 that spontaneously mineralizes in culture. *J Bone Miner Res* 16:1622-1633

Kato Y, Windle JJ, Koop BA, et al (2010) Establishment of an Osteocyte-like Cell Line, MLO-Y4. *J Bone Miner Res* 12:2014-2023

Katsuragi Y, Ichimura Y, Komatsu M (2015) P62/SQSTM1 functions as a signaling hub and an autophagy adaptor. *FEBS J* 282:4672-4678

Kennedy OD, Herman BC, Laudier DM, et al (2012) Activation of resorption in fatigue-loaded bone involves both apoptosis and active pro-osteoclastogenic signaling by distinct osteocyte populations. *Bone* 50:1115-1122

- Kim JH, Jin HM, Kim K, et al (2009) The Mechanism of Osteoclast Differentiation Induced by IL-1. *J Immunol* 183:1862-1870
- Kneissel M, Luong-Nguyen NH, Baptist M, et al (2004) Everolimus suppresses cancellous bone loss, bone resorption, and cathepsin K expression by osteoclasts. *Bone* 35:1144-1156
- Kobayashi S, Nagase M, Honda N, Hishida A (1984) Glomerular alterations in uranyl acetate-induced acute renal failure in rabbits. *Kidney Int* 26:808-815
- Kohara H, Kitaura H, Fujimura Y, et al (2011) IFN- γ directly inhibits TNF- α -induced osteoclastogenesis in vitro and in vivo and induces apoptosis mediated by Fas/Fas ligand interactions. *Immunol Lett* 137:53-61
- Komori T (2013) Functions of the osteocyte network in the regulation of bone mass. *Cell Tissue Res* 352:191-198
- Kopacek J, Ondrias K, Sedlakova B, et al (2009) Type 2 IP3 receptors are involved in uranyl acetate induced apoptosis in HEK 293 cells. *Toxicology* 262:73-79
- Kroemer G (2015) Autophagy : a druggable process th a t is deregulated in aging and hum an disease. *J Clin Invest* 125:1-4
- Kroemer G, Mariño G, Levine B (2010) Autophagy and the Integrated Stress Response. *Mol Cell* 40:280-293
- Kudo O, Sabokbar A, Pocock A, et al (2003) Interleukin-6 and interleukin-11 support human osteoclast formation by a RANKL-independent mechanism. *Bone* 32:1-7
- Kular J, Tickner J, Chim SM, Xu J (2012) An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level. *Clin Biochem* 45:863-873
- Kullgren B, Jarvis EE, An DD, Abergel RJ (2013) Actinide chelation: Biodistribution and in vivo complex stability of the targeted metal ions. *Toxicol Mech Methods* 23:18-26
- Kurttio P, Auvinen A, Salonen L, et al (2002) Renal effects of uranium in drinking water. *Environ Health Perspect* 110:337-342
- Kurttio P, Harmoinen A, Saha H, et al (2006) Kidney Toxicity of Ingested Uranium From Drinking Water. *Am J Kidney Dis* 47:972-982

Kurttio P, Komulainen H, Leino A, et al (2005) Bone as a possible target of chemical toxicity of natural uranium in drinking water. *Environ Health Perspect* 113:68-72

L

La Touche YD, Willis DL, Dawydiak OI (1987) Absorption and biokinetics of U in rats following an oral administration of uranyl nitrate solution. *Health Phys* 53:147-162

Larivière D, Tolmachev SY, Kochermin V, Johnson S (2013) Uranium bone content as an indicator of chronic environmental exposure from drinking water. *J Environ Radioact* 121:98-103

Lees RL, Sabharwal VK, Heersche JNM (2001) Resorptive state and cell size influence intracellular pH regulation in rabbit osteoclasts cultured on collagen-hydroxyapatite films. *Bone* 28:187-194

Legendre A, Elie C, Ramambason C, et al (2016) Endocrine effects of lifelong exposure to low-dose depleted uranium on testicular functions in adult rat. *Toxicology* 368-369:58-68

Leggett RW, Harrison JD (1995) Fractional absorption ingested uranium in humans. *Health Phys* 68:484-498

Leggett RW, Pellmar TC (2003) The biokinetics of uranium migrating from embedded DU fragments. *J Environ Radioact* 64:205-225

Lest CHA Van De, Vaandrager AB, Van De Lest CHA, Vaandrager AB (2007) Mechanism of cell-mediated mineralization. *Curr Opin Orthop* 18:434-443

Lestaevel P, Bussy C, Paquet F, et al (2005) Changes in sleep-wake cycle after chronic exposure to uranium in rats. *Neurotoxicol Teratol* 27:835-840

Li H, Li D, Ma Z, et al (2018) Defective autophagy in osteoblasts induces endoplasmic reticulum stress and causes remarkable bone loss. *Autophagy* 14:1726-1741

Liesch T, Hinrichsen S, Goldscheider N (2015) Uranium in groundwater - Fertilizers versus geogenic sources. *Sci Total Environ* 536:981-995

Limson Zamora M, Tracy BL, Zielinski JM, et al (1998) Chronic Ingestion of Uranium in Drinking

- Water: A Study of Kidney Bioeffects in Humans Chronic Ingestion of Uranium in Drinking Water A Study of Kidney Bioeffects in Humans. *Toxicol Sci* 43:68-77
- Lin C, Jiang X, Dai Z, et al (2009) Sclerostin mediates bone response to mechanical unloading through antagonizing Wnt/ β -catenin signaling. *J Bone Miner Res* 24:1651-1661
- Linares V, Bellés M, Albina ML, et al (2006) Assessment of the pro-oxidant activity of uranium in kidney and testis of rats. *Toxicol Lett* 167:152-161
- Linares V, Sánchez DJ, Bellés M, et al (2007) Pro-oxidant effects in the brain of rats concurrently exposed to uranium and stress. *Toxicology* 236:82-91
- Liu D, Yao S, Wise GE (2006) Effect of interleukin-10 on gene expression of osteoclastogenic regulatory molecules in the rat dental follicle. *Eur J Oral Sci* 114:42-49
- Liu S, Rowe PSN, Vierthaler L, et al (2007) Phosphorylated acidic serine-aspartate-rich MEPE-associated motif peptide from matrix extracellular phosphoglycoprotein inhibits phosphate regulating gene with homologies to endopeptidases on the X-chromosome enzyme activity. *J Endocrinol* 192:261-267
- Lorget F, Kamel S, Mentaverri R, et al (2000) High extracellular calcium concentrations directly stimulate osteoclast apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 268:899-903
- Lu XL, Huo B, Park M, Guo XE (2012) Calcium response in osteocytic networks under steady and oscillatory fluid flow. *Bone* 51:466-473
- Lubberts E, van den Bersselaar L, Oppers-Walgreen B, et al (2003) IL-17 Promotes Bone Erosion in Murine Collagen-Induced Arthritis Through Loss of the Receptor Activator of NF- κ B Ligand/Osteoprotegerin Balance. *J Immunol* 170:2655-2662
- Lundquist P, Murer H, Biber J (2007) Type II Na⁺-P_i Cotransporters in Osteoblast Mineral Formation: Regulation by Inorganic Phosphate. *Cell Physiol Biochem* 19:43-56
- Lutter AH, Hempel U, Wolf-Brandstetter C, et al (2010) A novel resorption assay for osteoclast functionality based on an osteoblast-derived native extracellular matrix. *J Cell Biochem* 109:1025-1032

M

- Mahamid J, Sharir A, Gur D, et al (2011) Bone mineralization proceeds through intracellular calcium phosphate loaded vesicles: A cryo-electron microscopy study. *J Struct Biol* 174:527-535
- Mann V, Huber C, Kogianni G, et al (2006) The influence of mechanical stimulation on osteocyte apoptosis and bone viability in human trabecular bone. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 6:408-17
- Manolagas SC (2010) From estrogen-centric to aging and oxidative stress: A revised perspective of the pathogenesis of osteoporosis. *Endocr Rev* 31:266-300
- Manolagas SC, Parfitt AM (2010) What old means to bone. *Trends Endocrinol. Metab.* 21:369-374
- Martin A, Liu S, David V, et al (2011) Bone proteins PHEX and DMP1 regulate fibroblastic growth factor Fgf23 expression in osteocytes through a common pathway involving FGF receptor (FGFR) signaling. *FASEB J* 25:2551-2562
- Milgram S (2008) Effets cytotoxiques et phénotypiques de l'uranium
- Milgram S, Carrière M, Malaval L, Gouget B (2008a) Cellular accumulation and distribution of uranium and lead in osteoblastic cells as a function of their speciation. *Toxicology* 252:26-32
- Milgram S, Carrière M, Thiebault C, et al (2008b) Cytotoxic and phenotypic effects of uranium and lead on osteoblastic cells are highly dependent on metal speciation. *Toxicology* 250:62-69
- Miller AC, Blakely WF, Livengood D, et al (1998) Transformation of human osteoblast cells to the tumorigenic phenotype by depleted uranium-uranyl chloride. *Environ Health Perspect* 106:465-471
- Miyamoto K, Ito M, Kuwahata M, et al (2005) Inhibition of intestinal sodium-dependent inorganic phosphate transport by fibroblast growth factor 23. *Ther Apher Dial* 9:331-5

- Mizushima N, Komatsu M (2011) Autophagy: Renovation of cells and tissues. *Cell* 147:728-741
- Monfoulet L, Malaval L, Aubin JE, et al (2010) Bone sialoprotein, but not osteopontin, deficiency impairs the mineralization of regenerating bone during cortical defect healing. *Bone* 46:447-452
- Monleau M, Bussy C, Lestaevel P, et al (2005) Bioaccumulation and behavioural effects of depleted uranium in rats exposed to repeated inhalations. *Neurosci Lett* 390:31-36
- Montavon G, Apostolidis C, Bruchertseifer F, et al (2009) Spectroscopic study of the interaction of U(VI) with transferrin and albumin for speciation of U(VI) under blood serum conditions. *J Inorg Biochem* 103:1609-1616
- Montessuit C, Bonjour JP, Caverzasio J (1995) Expression and Regulation of Na-Dependent Pi Transport in Matrix Vesicles Produced by Osteoblast-like Cells. *J Bone Miner Res* 10:625-631
- Morrell AE, Brown GN, Robinson ST, et al (2018) Mechanically induced Ca²⁺ oscillations in osteocytes release extracellular vesicles and enhance bone formation. *Bone Res* 6:1-11
- Mousny M, Omelon S, Wise L, et al (2008) Fluoride effects on bone formation and mineralization are influenced by genetics. *Bone* 43:1067-1074
- Mullen CA, Haugh MG, Schaffler MB, et al (2013) Osteocyte differentiation is regulated by extracellular matrix stiffness and intercellular separation. *J Mech Behav Biomed Mater* 28:183-194
- Mullender MG, Huiskes R, Versleyen H, Buma P (1996) Osteocyte density and histomorphometric parameters in cancellous bone of the proximal femur in five mammalian species. *J Orthop Res* 14:972-979
- Muller DS, Houpert P, Cambar J, Hengé-Napoli MH (2008) Role of the sodium-dependent phosphate cotransporters and absorptive endocytosis in the uptake of low concentrations of uranium and its toxicity at higher concentrations in LLC-PK1 cells. *Toxicol Sci* 101:254-262

N

- Nagata N, Kitaura H, Yoshida N, Nakayama K (2003) Inhibition of RANKL-induced osteoclast formation in mouse bone marrow cells by IL-12: Involvement of IFN- γ possibly induced from non-T cell population. *Bone* 33:721-732
- Nah J, Yuan J, Jung Y-K (2015) Autophagy in Neurodegenerative Diseases: From Mechanism to Therapeutic Approach. *Mol Cells* 38:381-389
- Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, et al (2011) Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med* 17:1231-1234
- Noble BS, Peet N, Stevens HY, et al (2003) Mechanical loading: biphasic osteocyte survival and targeting of osteoclasts for bone destruction in rat cortical bone. *AJP Cell Physiol* 284:C934-C943
- Nollet M, Santucci-Darmanin S, Breuil V, et al (2014) Autophagy in osteoblasts is involved in mineralization and bone homeostasis. *Autophagy* 10:1965-1977

O

- O'Brien CA, Nakashima T, Takayanagi H (2013) Osteocyte control of osteoclastogenesis. *Bone* 54:258-263
- Ochotny N, Voronov I, Owen C, et al (2013) The R740S mutation in the V-ATPase $\alpha 3$ subunit results in osteoclast apoptosis and defective early-stage autophagy. *J Cell Biochem* 114:2823-2833
- Okabe I, Kikuchi T, Mogi M, et al (2017) IL-15 and RANKL Play a Synergistically Important Role in Osteoclastogenesis. *J Cell Biochem* 118:739-747
- Oliveira H, Monteiro C, Pinho F, et al (2014) Cadmium-induced genotoxicity in human osteoblast-like cells. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen* 775-776:38-47
- Onal M, Piemontese M, Xiong J, et al (2013) Suppression of autophagy in osteocytes mimics skeletal aging. *J Biol Chem* 288:17432-17440

Ondrias K, Sirova M, Kubovcakova L, Krizanova O (2008) Uranyl acetate modulates gene expression and protein levels of the type 2 , but not type 1 inositol 1 , 4 , 5-trisphosphate receptors in mouse kidney. *Mol Physiol* 187-193

P

Paquet F, Chazel V, Houpert P, et al (2003) Efficacy of 3,4,3-LI(1,2-HOPO) for decorporation of Pu, Am and U from rats injected intramuscularly with high-fired particles of MOX. *Radiat Prot Dosimetry* 105:521-5

Paquet F, Houpert P, Blanchardon E, et al (2006) Accumulation and distribution of uranium in rats after chronic exposure by ingestion. *Health Phys* 90:139-147

Paredes E, Avazeri E, Malard V, et al (2016) Evidence of isotopic fractionation of natural uranium in cultured human cells. *Proc Natl Acad Sci* 113:14007-14012

Paternain JL, Domingo JL, Ortega A, Llobet JM (1989) The effects of uranium on reproduction, gestation, and postnatal survival in mice. *Ecotoxicol Environ Saf* 17:291-296

Pavalko FM, Norvell SM, Burr DB, et al (2003) A model for mechanotransduction in bone cells: The load-bearing mechanosomes. *J Cell Biochem* 88:104-112

Pellmar TC, Fuciarelli AF, Ejniak JW, et al (1999) Distribution of uranium in rats implanted with depleted uranium pellets. *Toxicol Sci* 49:29-39

Periyakaruppan A, Kumar F, Sarkar S, et al (2007) Uranium induces oxidative stress in lung epithelial cells. *Arch Toxicol* 81:389-395

Peter G. Bullough (2010) Chapter 1 Normal Skeletal Structure and Development. In: Orthopaedic Pathology (Fifth Edition). p 1-39

Petitot F, Frelon S, Moreels AM, et al (2007) Incorporation and distribution of uranium in rats after a contamination on intact or wounded skin. *Health (Irvine Calif)* 92:464-474

Petitot F, Lestaevel P, Tournalias E, et al (2013) Inhalation of uranium nanoparticles: Respiratory tract deposition and translocation to secondary target organs in rats. *Toxicol Lett* 217:217-225

- Piemontese M, Onal M, Xiong J, et al (2016) Low bone mass and changes in the osteocyte network in mice lacking autophagy in the osteoblast lineage. *Sci Rep* 6:1-13
- Pierrefite-Carle V, Santucci-Darmanin S, Breuil V, et al (2015) Autophagy in bone: Self-eating to stay in balance. *Ageing Res Rev* 24:206-217
- Pierrefite-Carle V, Santucci-Darmanin S, Breuil V, et al (2016) Effect of natural uranium on the UMR-106 osteoblastic cell line: impairment of the autophagic process as an underlying mechanism of uranium toxicity. *Arch Toxicol* 91:1903-1914
- Ponpuak M, Mandell MA, Kimura T, et al (2015) Secretory autophagy. *Curr Opin Cell Biol* 35:106-116
- Prat O, Berenguer F, Malard V, et al (2005) Transcriptomic and proteomic responses of human renal HEK293 cells to uranium toxicity. *Proteomics* 5:297-306
- Prat O, Vercouter T, Ansoborlo E, et al (2009) Uranium speciation in drinking water from drilled wells in Southern Finland and its potential links to health effects. *Environ Sci Technol* 43:3941-3946
- Prideaux M, Loveridge N, Pitsillides AA, Farquharson C (2012) Extracellular matrix mineralization promotes E11/gp38 glycoprotein expression and drives osteocytic differentiation. *PLoS One* 7:e36786
- Priest ND, Howells GR, Green D, Haines JW (1982) Uranium in Bone: Metabolic and Autoradiographic Studies in the Rat. *Hum Toxicol* 1:97-114

Q

- Qing H, Ardeshirpour L, Pajevic PD, et al (2012) Demonstration of Osteocytic Perilacunar/Canalicular Remodeling in Mice during Lactation. *J Bone Min Res* 27:1018-1029

R

- Ramounet-Le Gall B, Grillon G, Rateau G, et al (2003) Comparative decorporation efficacy of 3,4,3-LIHOPO, 4,4,4-LIHOPO and DTPA after contamination of rats with soluble forms of 238Pu and 233U. *Radiat Prot Dosimetry* 105:535-538
- Raschke W, Baird S, Ralph P, Nakoinz I (1978) Functional Macrophage Cell Lines Transformed by Abelson Leukaemia Virus. *Cell* 15:261-267
- Raymond-Whish S, Mayer LP, O'Neal T, et al (2007) Drinking water with uranium below the U.S. EPA water standard causes estrogen receptor-dependent responses in female mice. *Environ Health Perspect* 115:1711-1716
- Robling AG, Niziolek PJ, Baldridge LA, et al (2008) Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin. *J Biol Chem* 283:5866-5875
- Rochefort GY, Pallu S, Benhamou CL (2010) Osteocyte: The unrecognized side of bone tissue. *Osteoporos Int* 21:1457-1469
- Rodda SJ (2006) Distinct roles for Hedgehog and canonical Wnt signaling in specification, differentiation and maintenance of osteoblast progenitors. *Development* 133:3231-3244
- Rohde M, Mayer H (2007) Exocytotic process as a novel model for mineralization by osteoblasts in vitro and in vivo determined by electron microscopic analysis. *Calcif Tissue Int* 80:323-336
- Rolvien T, Krause M, Jeschke A, et al (2017) Vitamin D regulates osteocyte survival and perilacunar remodeling in human and murine bone. *Bone* 103:78-87
- Rosset EM, Bradshaw AD (2016) SPARC/osteonectin in mineralized tissue. *Matrix Biol.* 52-54:78-87
- Rowe PSN (2012) Regulation of Bone–Renal Mineral and Energy Metabolism The PHEX, FGF23, DMP1, MEPE ASARM Pathway.pdf. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 22:61-86

S

- Sambandam Y, Townsend MT, Pierce JJ, et al (2014) Microgravity control of autophagy modulates osteoclastogenesis. *Bone* 61:125-131
- Santos-Francés F, Gil Pacheco E, Martínez-Graña A, et al (2018) Concentration of uranium in the soils of the west of Spain. *Environ Pollut* 236:1-11
- Schaffler MB, Cheung WY, Majeska R, Kennedy O (2014) Osteocytes: Master orchestrators of bone. *Calcif Tissue Int* 94:5-24
- Schinke T, Amendt C, Trindl A, et al (1996) The serum protein alpha2-HS glycoprotein/fetuin inhibits apatite formation in vitro and in mineralizing calvaria cells. *J Biol Chem* 271:20789-20796
- Shah KM, Orton P, Mani N, et al (2017) Osteocyte physiology and response to fluid shear stress are impaired following exposure to cobalt and chromium: Implications for bone health following joint replacement. *J Orthop Res* 35:1716-1723
- Shaki F, Hosseini MJ, Ghazi-Khansari M, Pourahmad J (2012) Toxicity of depleted uranium on isolated rat kidney mitochondria. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 1820:1940-1950
- Shaki F, Pourahmad J (2013) Mitochondrial toxicity of depleted uranium: Protection by beta-glucan. *Iran J Pharm Res* 12:131-140
- Shapses SA, Cifuentes M, Spevak L, et al (2003) Osteopontin facilitates bone resorption, decreasing bone mineral crystallinity and content during calcium deficiency. *Calcif Tissue Int* 73:86-92
- Shimada T, Kakitani M, Yamazaki Y, et al (2004) Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. *J Clin Invest* 113:561-568
- Singh A, Gill G, Kaur H, et al (2018) Role of osteopontin in bone remodeling and orthodontic tooth movement: a review. *Prog Orthod* 19:
- Smith SW (2013) The Role of Chelation in the Treatment of Other Metal Poisonings. *J Med Toxicol* 9:355-369

- Šömen Joksić A, Katz SA (2015) Chelation therapy for treatment of systemic intoxication with uranium: A review. *J Environ Sci Heal - Part A Toxic/Hazardous Subst Environ Eng* 50:1479-1488
- Souidi M, Tissandie E, Racine R, et al (2009) Uranium: Properties and biological effects after internal contamination. *Ann Biol Clin (Paris)* 67:23-38
- Spagnul A, Bouvier-Capely C, Phan G, et al (2010) Calixarene-entrapped nanoemulsion for uranium extraction from contaminated solutions. *J Pharm Sci* 99:1375-1383
- Spatz JM, Wein MN, Gooi JH, et al (2015) The Wnt inhibitor sclerostin is up-regulated by mechanical unloading in osteocytes in vitro. *J Biol Chem* 290:16744-16758
- Squibb KS, Leggett RW, McDiarmid MA (2005) Prediction of renal concentrations of depleted uranium and radiation dose in gulf war veterans with embedded shrapnel. *Health Phys* 89:267-273
- Staines KA, Javaheri B, Hohenstein P, et al (2017) Hypomorphic conditional deletion of E11/Podoplanin reveals a role in osteocyte dendrite elongation. *J Cell Physiol* 232:3006-3019
- Stephen Sugarman by L, Baxter W, Bowen A, et al (2017) Medical Aspects of Radiation Incidents, 4th Edition. 576-1005
- Suda T, Takahashi N, Udagawa N, et al (1999) Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 20:345-357
- Sullivan MF (1980) Absorption of actinide elements from the gastrointestinal tract of rats, guinea pigs and dogs. *Health Phys* 38:159-171
- Sullivan MF, Ruemmler PS, Ryan JL, Buschom RL (1986) Influence of oxidizing or reducing agents on gastrointestinal absorption of U, Pu, Am, Cm and Pm by rats. *Health Phys* 50:223-232
- Sylvester PLD, Lopez R, Ubios AM, Cabrini RL (2002) Exposure to Subcutaneously Implanted Uranium Dioxide Impairs Bone Formation. *Arch Environ Health* 57:320-25

T

- Takahashi N, Udagawa N, Akatsu T, et al (1991) Role of colony-stimulating factors in osteoclast development. *J Bone Miner Res* 6:977-985
- Takayanagi H (2007) Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol* 7:292-304
- Takehige K, Baba M, Tsuboi S, et al (1992) Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J Cell Biol* 119:301-312
- Tan SD, Bakker AD, Semeins CM, et al (2008) Inhibition of osteocyte apoptosis by fluid flow is mediated by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 369:1150-1154
- Tang SY, Herber RP, Ho SP, Alliston T (2012) Matrix metalloproteinase-13 is required for osteocytic perilacunar remodeling and maintains bone fracture resistance. *J Bone Miner Res* 27:1936-1950
- Tartaix PH, Doulaverakis M, George A, et al (2004) In Vitro Effects of Dentin Matrix Protein-1 on Hydroxyapatite Formation Provide Insights into in Vivo Functions. *J Biol Chem* 279:18115-18120
- Tasat DR, Orona NS, Mandalunis PM, et al (2007) Ultrastructural and metabolic changes in osteoblasts exposed to uranyl nitrate. *Arch Toxicol* 81:319-326
- Tatsumi S, Ishii K, Amizuka N, et al (2007) Targeted Ablation of Osteocytes Induces Osteoporosis with Defective Mechanotransduction. *Cell Metab* 5:464-475
- Theodorakopoulos N, Chapon V, Coppin F, et al (2015) Use of combined microscopic and spectroscopic techniques to reveal interactions between uranium and *Microbacterium* sp. A9, a strain isolated from the Chernobyl exclusion zone. *J Hazard Mater* 285:285-293
- Thiébaud C, Carrière M, Milgram S, et al (2007) Uranium induces apoptosis and is genotoxic to normal rat kidney (NRK-52E) proximal cells. *Toxicol Sci* 98:479-487
- Thompkinson A, Reeve J, Shaw RW, et al (1997) The death of osteocytes via apoptosis accompanies estrogen withdrawal in human bone. *J Clin Endocrinol Metab* 82:3128-3135

- Tissandie E, Guéguen Y, Lobaccaro JMA, et al (2006) Effects of depleted uranium after short-term exposure on vitamin D metabolism in rat. *Arch Toxicol* 80:473-480
- Tissandie E, Guéguen Y, Lobaccaro JMA, et al (2007) In vivo effects of chronic contamination with depleted uranium on vitamin D3 metabolism in rat. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 1770:266-272
- Tooze SA, Yoshimori T (2010) The origin of the autophagosomal membrane. *Nat Cell Biol* 12:831-835
- Toraldo G, Roggia C, Qian W-P, et al (2003) IL-7 induces bone loss in vivo by induction of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand and tumor necrosis factor alpha from T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:125-30
- Toyosawa S, Shintani S, Fujiwara T, et al (2001) Dentin matrix protein 1 is predominantly expressed in chicken and rat osteocytes but not in osteoblasts. *J Bone Miner Res* 16:2017-2026
- Tye CE, Rattray KR, Warner KJ, et al (2003) Delineation of the hydroxyapatite-nucleating domains of bone sialoprotein. *J Biol Chem* 278:7949-7955
- ## U
- Ubaidus S, Li M, Sultana S, et al (2009) FGF23 is mainly synthesized by osteocytes in the regularly distributed osteocytic lacunar canalicular system established after physiological bone remodeling. *J Electron Microsc (Tokyo)* 58:381-392
- Ubios AM, Braun EM, Cabrini RL (1994) Lethality due to uranium poisoning is prevented by ethane-1-hydroxy-1, l-biphosphonate (Ehbp). *Health Phys* 66:540-544
- Ubios AM, Guglielmotti MB, Steimetz T, Cabrini RL (1991) Uranium inhibits bone formation in physiologic alveolar bone modeling and remodeling. *Environ Res* 54:17-23
- Uda Y, Azab E, Sun N, et al (2017) Osteocyte Mechanobiology. *Curr Osteoporos Rep* 15:318-325
- Ueda S, Ichiseki T, Yoshitomi Y, et al (2015) Osteocytic cell necrosis is caused by a combination of glucocorticoid-induced Dickkopf-1 and hypoxia. *Med Mol Morphol* 48:69-75

Uehara S, Udagawa N, Kobayashi Y (2018) Non-canonical Wnt signals regulate cytoskeletal remodeling in osteoclasts. *Cell Mol Life Sci* 75:3683-3692

UNSCEAR (2000) Annex B. Exposures from natural radiation sources

V

Verborgt O, Gibson GJ, Schaffler MB (2000) Loss of osteocyte integrity in association with microdamage and bone remodeling after fatigue in vivo. *J Bone Miner Res* 15:60-67

Vidaud C, Gourion-Arsiquaud S, Rollin-Genetet F, et al (2007) Structural consequences of binding of UO₂²⁺ to apotransferrin: Can this protein account for entry of uranium into human cells? *Biochemistry* 46:2215-2226

W

Waddington RJ, Langley MS (2003) Altered expression of matrix metalloproteinases within mineralizing bone cells in vitro in the presence of fluoride. *Connect Tissue Res* 44:88-95

Wade-Gueye NM, Delissen O, Gourmelon P, et al (2012) Chronic exposure to natural uranium via drinking water affects bone in growing rats. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 1820:1121-1127

Wang Z, Deng Z, Gan J, et al (2017) TiAl₆V₄ particles promote osteoclast formation via autophagy-mediated downregulation of interferon-beta in osteocytes. *Acta Biomater* 48:489-498

Wappelhorst O, Kühn I, Heidenreich H, Markert B (2002) Transfer of selected elements from food into human milk. *Nutrition* 18:316-322

Wei S, Ross FP, Teitelbaum SL, et al (2005) IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. *J Clin Invest* 115:282-290

Weinstein RS, Nicholas RW, Manolagas SC (2000) Apoptosis of osteocytes in glucocorticoid-induced osteonecrosis of the hip. *J Clin Endocrinol Metab* 85:2907-2912

Weng Y, Ke C, Kong J, et al (2018) The significant role of ATG5 in the maintenance of normal functions of Mc3T3-E1 osteoblast. 1224-1232

Woo SM, Rosser J, Dusevich V, et al (2011) Cell line IDG-SW3 replicates osteoblast-to-late-osteocyte differentiation in vitro and accelerates bone formation in vivo. *J Bone Miner Res* 26:2634-2646

World Health Organisation (2001) Uranium appauvri: sources, exposition et effets sur la santé. 2009

World Health Organization (2012) Uranium in Drinking-water

Wronski TJ, Halloran BP, Bikle DD, et al (1986) Chronic Administration of 1,25-Dihydroxyvitamin D 3 : Increased Bone but Impaired Mineralization*. *Endocrinology* 119:2580-2585

Wysolmerski JJ (2013) Osteocytes remove and replace perilacunar mineral during reproductive cycles. *Bone* 54:230-236

X

Xie H, LaCerte C, Thompson WD, Wise Sr. JP (2010) Depleted uranium induces neoplastic transformation in human lung epithelial cells. *Chem Res Toxicol* 23:373-378

Xiong J, Onal M, Jilka RL, et al (2011) Matrix-embedded cells control osteoclast formation. *Nat Med* 17:1235-1241

Xiong Q, Zhang L, Ge W, Tang P (2016) The roles of interferons in osteoclasts and osteoclastogenesis. *Jt Bone Spine* 83:276-281

Yang D, Turner AG, Wijenayaka AR, et al (2015) 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and extracellular calcium promote mineral deposition via NPP1 activity in a mature osteoblast cell line MLO-A5. *Mol Cell Endocrinol* 412:140-147

Y

Yang J, Shah R, Robling AG, et al (2008) HMGB1 is a bone-active cytokine. *J Cell Physiol* 214:730-739

- Yang W, Lu Y, Kalajzic I, et al (2005) Dentin matrix protein 1 gene cis-regulation: Use in osteocytes to characterize local responses to mechanical loading in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 280:20680-20690
- Yang Y, Zheng X, Li B, et al (2014) Increased activity of osteocyte autophagy in ovariectomized rats and its correlation with oxidative stress status and bone loss. *Biochem Biophys Res Commun* 451:86-92
- Yang YH, Chen K, Li B, et al (2013) Estradiol inhibits osteoblast apoptosis via promotion of autophagy through the ER-ERK-mTOR pathway. *Apoptosis* 18:1363-1375
- Yavropoulou MP, Michopoulos A, Yovos JG (2017) PTH and PTHR1 in osteocytes. New insights into old partners. *Hormones* 16:150-160
- Yin J, Han L, Cong W (2018) Alpinumisoflavone rescues glucocorticoid-induced apoptosis of osteocytes via suppressing Nox2-dependent ROS generation. *Pharmacol Reports* 70:270-276
- Yogesha SD, Khapli SM, Wani MR (2005) Interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor inhibits tumor necrosis factor (TNF)- α -induced osteoclast differentiation by down-regulation of expression of TNF receptors 1 and 2. *J Biol Chem* 280:11759-11769
- Yu C, Huang D, Wang K, et al (2017) Advanced oxidation protein products induce apoptosis, and upregulate sclerostin and RANKL expression, in osteocytic MLO-Y4 cells via JNK/p38 MAPK activation. *Mol Med Rep* 15:543-550
- Yue Y, Li M, Wang H, et al (2018) The toxicological mechanisms and detoxification of depleted uranium exposure. 1-9

Z

- Zaiss MM, Kurowska-Stolarska M, Bohm C, et al (2011) IL-33 Shifts the Balance from Osteoclast to Alternatively Activated Macrophage Differentiation and Protects from TNF- α -Mediated Bone Loss. *J Immunol* 186:6097-6105
- Zhang B, Hou R, Zou Z, et al (2018) Mechanically induced autophagy is associated with ATP

metabolism and cellular viability in osteocytes in vitro. *Redox Biol* 14:492-498

Zhang K, Barragan-Adjemian C, Ye L, et al (2006) E11/gp38 Selective Expression in Osteocytes: Regulation by Mechanical Strain and Role in Dendrite Elongation. *Mol Cell Biol* 26:4539-4552

Zhang W, Pantschenko AG, McCarthy MB, Gronowicz G (2007) Bone-targeted overexpression of Bcl-2 increases osteoblast adhesion and differentiation and inhibits mineralization in vitro. *Calcif Tissue Int* 80:111-122

Zhao Y, Chen G, Zhang W, et al (2012) Autophagy regulates hypoxia-induced osteoclastogenesis through the HIF-1 α /BNIP3 signaling pathway. *J Cell Physiol* 227:639-648

Zhou Z, Shi G, Zheng X, et al (2018) Autophagy activation facilitates mechanical stimulation-promoted osteoblast differentiation and ameliorates hindlimb unloading-induced bone loss. *Biochem Biophys Res Commun* 498:667-673

Zhu L, Chen J, Zhang J, et al (2017) Parathyroid Hormone (PTH) Induces Autophagy to Protect Osteocyte Cell Survival from Dexamethasone Damage. *Med Sci Monit* 23:4034-4040

Zoriy P, Schläger M, Murtazaev K, et al (2018) Monitoring of uranium concentrations in water samples collected near potentially hazardous objects in North-West Tajikistan. *J Environ Radioact* 181:109- 117