



HAL
open science

Impact d'une exposition au fer sur l'axe S1P/S1PR dans la lignée ostéoblastique humaine MG-63

Lucas Peltier

► To cite this version:

Lucas Peltier. Impact d'une exposition au fer sur l'axe S1P/S1PR dans la lignée ostéoblastique humaine MG-63. Médecine humaine et pathologie. Université de Rennes, 2017. Français. NNT : 2017REN1B059 . tel-02459659

HAL Id: tel-02459659

<https://theses.hal.science/tel-02459659>

Submitted on 29 Jan 2020

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 / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

pour le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : Biologie et Science de la Santé (Médecine)

Ecole doctorale Biologie Santé

présentée par

Lucas PELTIER

Préparée à l'unité de recherche UMR 1241 **NuMeCan**

Nutrition, Métabolismes et Cancer

**Impact d'une
exposition au fer sur
l'axe S1P/S1PR dans
la lignée
ostéoblastique
humaine MG-63**

**Thèse soutenue à Rennes
le 21/12/2017**

devant le jury composé de :

Thierry LEVADE

Professeur des Universités / Praticien Hospitalier
Université Toulouse III / *rapporteur*

Cyrille CONFAVREUX

Maître de Conférences Universitaire / Praticien Hospitalier
Université de Lyon / *rapporteur*

Diane DUFOUR

Maître de Conférences Universitaire / Praticien Hospitalier
Université François Rabelais-Tours / *examineur*

Claude BENDAVID

Professeur des Universités / Praticien Hospitalier
Université Rennes 1 / *examineur*

Olivier LOREAL

Directeur de Recherches
Université Rennes 1 / *examineur*

Pascal GUGGENBUHL

Professeur des Universités / Praticien Hospitalier
Université Rennes 1 / *directeur de thèse*

Remerciements

A mon directeur de Thèse, Monsieur le Professeur Pascal Guggenbuhl,

Pour m'avoir proposé ce sujet et permis de le mener à terme,
pour m'avoir fait confiance tout au long de ce projet,
pour ton écoute, ta compréhension et tes conseils,
Trouve ici, l'expression de mon plus sincère respect

A mon responsable d'équipe de recherche, Monsieur le Docteur Olivier Loréal,

Pour m'avoir intégré pleinement à ton équipe de recherche,
pour tes conseils, ton regard critique vis-à-vis de mes résultats,
pour ta disponibilité et tes remarques toujours pertinentes,
Trouve ici, l'expression de ma profonde reconnaissance

A mon Chef de Service, Monsieur le Professeur Claude Bendavid,

Pour votre confiance sans faille vis-à-vis de mon aptitude à mener ce projet à terme
pour votre aide dans l'élaboration des outils à l'origine des résultats que je présente aujourd'hui,
pour votre disponibilité et votre écoute lors de nos échanges,
Veuillez trouver ici l'expression de ma plus grande gratitude

Aux membres de mon Jury,

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Thierry Levade et Monsieur le Docteur Cyrille Confavreux
qui ont accepté de juger mon travail et me font l'honneur d'être rapporteur de cette Thèse,

Je tiens à remercier Madame le Docteur Diane Dufour pour avoir également accepté de siéger au sein
de ce jury et pris le soin d'examiner mon travail,

Une pensée et mes remerciements également pour Monsieur le Professeur Yves Maugars qui devait
initialement siéger parmi ce jury,

Je tiens aussi à remercier...

L'intégralité des membres de l'équipe de recherche qui se nomme désormais CIMIAD,
Une pensée particulière pour Patricia, Marie-Laure, et Lenaïck : un grand merci pour vos conseils au quotidien, votre bonne humeur permanente et votre soutien dans les moments difficiles,
Je n'oublierai pas

Les membres de l'institut NuMeCan et son directeur,
Toutes les personnes que j'ai pu croiser durant ses années de travail et qui par leur écoute,
Leur disponibilité et leurs conseils ont contribué à la réussite de ce projet,
Je n'ai trouvé ici que des portes ouvertes et des personnes prêtes à rendre service,
Tout simplement merci

L'ensemble du Laboratoire de Biochimie du CHU de Rennes,
Tous les biologistes, techniciens, secrétaires, aide-laboratoires et internes,
Cinq ans désormais que nous travaillons ensemble,
Je voulais tout simplement vous remercier,
J'ai appris de chacun d'entre vous,
Si ce projet a abouti c'est aussi grâce à vous tous,
Que chacun des membres de cette grande équipe se retrouve dans ces quelques mots

L'ensemble de l'U.F d'hormonologie,
Pour votre accueil au sein de cette équipe, votre travail au quotidien
Pour votre soutien dans ce projet, tout particulièrement dans la dernière ligne droite
Un grand merci

Madame le Professeur Véronique David pour ses conseils avisés

Une pensée également...

Pour ma fille, ma petite princesse Alix, ma raison de vivre,
Tu illumines notre vie depuis ton arrivée,
Tu es l'incarnation de la joie de vivre,
Je suis fier de toi (déjà),

Pour Caroline, ma compagne
Sans toi rien de tout cela n'aurait été possible,
Nous avons eu à accueillir le meilleur et affronter le pire,
Mais nous l'avons fait ensemble,
Ce travail, c'est aussi le tien,
Cette réussite, c'est aussi la tienne,

Pour ma famille,
Mon papa, qui nous a quittés bien trop tôt,
Ma maman, qui fait tout ce qu'elle peut pour nous faciliter la vie,
Mon frerot qui agrandit la famille et ma Moma qui est toujours là,
Ma belle-famille, toujours présente et prête à nous aider,

Pour mes amis,
Il y en a beaucoup, ils viennent de tous horizons,
Ils sont désormais pour la plupart très loin et pour autant la plupart sont toujours présents,
Merci

Tables des matières

Liste des abréviations.....	7
Introduction	9
I Organisation et physiologie du tissu osseux sain.....	11
1. Généralités	11
2. Anatomie et structure macroscopique du tissu osseux	12
2.1. Catégories d'os	12
2.2. Organisations architecturales du tissu osseux	13
2.2.1. Tissu osseux cortical	13
2.2.2. Tissu osseux trabéculaire	13
3. Composition du tissu osseux.....	15
3.1. Matrice extracellulaire	15
3.1.1. Matrice organique	15
3.1.1.1. Collagène de type I.....	15
3.1.1.2. Protéines non collagéniques	16
3.1.2. Phase minérale	16
3.2. Éléments cellulaires.....	17
3.2.1. Ostéoclastes	18
3.2.1.1. Description	18
3.2.1.2. Origine et différenciation	19
3.2.1.3. Fonction de résorption.....	21
3.2.2. Lignée ostéoblastique.....	23
3.2.2.1. Description	23
3.2.2.2. Origine et différenciation	23
3.2.2.3. Stades cellulaires de la lignée ostéoblastique.....	26
3.3. Autres constituants	30
3.3.1. Eau	30
3.3.2. Lipides.....	31
4. Physiologie du tissu osseux.....	33
4.1. Le modelage osseux	34
4.2. Le remodelage osseux.....	34
4.2.1. Un site anatomiquement et fonctionnellement ultraspécialisé	36
4.2.1.1. Organisation de la BMU dans l'os cortical	36
4.2.1.2. Organisation de la BMU dans l'os trabéculaire.....	39
4.2.1.3. Organisation du microenvironnement de la BMU : le BRC.....	42
4.2.2. Sous-processus 1 : phase d'initiation	43
4.2.3. Sous-processus 2 : recrutement des précurseurs ostéoclastiques et ostéoblastiques	45

4.2.3.1.	Provenance et attraction des précurseurs ostéoclastiques	45
4.2.3.2.	Provenance et attraction des précurseurs ostéoblastiques	46
4.2.4.	Sous-processus 3 : différenciation des précurseurs ostéoclastiques et ostéoblastiques	48
4.2.4.1.	Différenciation ostéoclastique et acquisition des fonctions de résorption	48
4.2.4.2.	Différenciation ostéoblastique et acquisition des fonctions minéralisantes	49
4.2.5.	Sous-processus 4 : couplage des activités ostéoclastiques et ostéoblastiques	50
4.2.6.	Synthèse du processus de remodelage osseux	52
II	Ostéoporose	53
1.	Définition	53
2.	Epidémiologie	56
2.1.	Epidémiologie de l'ostéoporose densitométrique	56
2.2.	Epidémiologie des fractures ostéoporotiques	58
2.3.	Evaluation financière de la prise en charge des fractures ostéoporotiques	59
3.	Etiologies et Physiopathologie	60
3.1.	Ostéoporose primitive	60
3.2.	Ostéoporose secondaire	64
3.2.1.	Ostéoporose liée à un trouble endocrinien	64
3.2.1.1.	Hyperparathyroïdie primaire et secondaire	64
3.2.1.2.	Hyperthyroïdie	65
3.2.1.3.	Hypercortisolisme	65
3.2.1.4.	Hypogonadisme	66
3.2.1.5.	Anorexie	67
3.2.2.	Ostéoporose associée aux surcharges en fer	68
4.	Synthèse	68
III	Métabolisme du fer et situations de surcharge	69
1.	Métabolisme du fer	69
1.1.	Généralités	69
1.2.	Distribution du fer dans l'organisme	70
1.3.	Cycle du fer dans l'organisme	70
1.3.1.	Besoins quotidiens en fer	70
1.3.2.	Recyclage du fer érythrocytaire	71
1.3.3.	Absorption intestinale du fer	72
1.3.3.1.	Fer non-héminique	72
1.3.3.2.	Fer héminique	72
1.3.4.	Circulation plasmatique du fer	73
1.3.5.	Régulation cellulaire du fer	74
1.3.5.1.	Incorporation cellulaire et utilisation	74
1.3.5.2.	Stockage intracellulaire	75
1.3.5.3.	Coordination de la régulation intracellulaire	75

1.3.6.	Élimination du fer	77
1.4.	Régulation du fer dans l'organisme.....	78
1.4.1.	L'hepcidine : hormone peptidique régulatrice du fer	78
1.4.2.	Mécanismes cellulaires de régulation de l'hepcidine par le fer	79
1.4.2.1.	Concentration hépatocytaire en fer et régulation de l'hepcidine	80
1.4.2.2.	Concentration systémique en fer et régulation de l'hepcidine	81
1.4.3.	Autres mécanismes cellulaires principaux de régulation de l'hepcidine	82
2.	Situations de surcharge en fer.....	83
2.1.	Surcharges en fer génétiques.....	83
2.1.1.	Hémochromatose lié au gène HFE (type1).....	84
2.1.2.	Hémochromatose juvénile (type 2).....	85
2.1.3.	Hémochromatose de type 3	85
2.1.4.	Hémochromatose de type 4	85
2.1.5.	Autres surcharges génétiques en fer.....	86
2.1.6.	Synthèse	86
2.2.	Surcharges en fer secondaires.....	88
2.2.1.	Origines de la surcharge en fer.....	88
2.2.1.1.	Hémolyse	88
2.2.1.2.	Hyperabsorption digestive du fer.....	89
2.2.1.3.	Transfusion	89
2.2.2.	Répercussions cliniques des surcharges en fer secondaires	89
IV	Fer et ostéoporose.....	91
1.	Ostéoporose et situations de surcharges en fer chronique.....	91
1.1.	Surcharge en fer d'origine génétique.....	91
1.2.	Surcharge en fer secondaires	93
1.2.1.	Thalassémies	93
1.2.2.	Drépanocytose	94
1.3.	Surcharge en fer physiologique.....	94
2.	Modèles d'étude animaux	95
2.1.	Modèles murins.....	96
2.2.	Modèles de rat	97
2.3.	Autres animaux.....	97
2.4.	Conclusions.....	98
3.	Modèles d'étude cellulaire	98
3.1.	Modèles ostéoclastiques.....	98
3.2.	Modèles ostéoblastiques	99
4.	Synthèse	100
V	Sphingosine-1-phosphate et homéostasie osseuse	102
1.	Famille des sphingolipides	103
1.1.	Généralités	103

1.2.	Métabolisme des sphingolipides	105
2.	Sphingosine-1-phosphate	108
2.1.	Généralités	108
2.2.	Métabolisme de la S1P	108
2.2.1.	Formation	108
2.2.2.	Dégradation	109
2.3.	Mode d'action cellulaire de la S1P	110
2.3.1.	Action intracellulaire	110
2.3.2.	Action extracellulaire.....	111
2.4.	Efflux cellulaire de la S1P.....	112
2.4.1.	Transporteurs de la famille des ATP binding cassette (ABC).....	113
2.4.2.	SPNS2 (Spinster homolog 2).....	114
2.5.	Concentrations plasmatiques et tissulaires de S1P.....	119
2.6.	Récapitulatif	119
3.	Actions de la sphingosine-1-phosphate sur les cellules osseuses	120
3.1.	Actions sur la lignée ostéoclastique	120
3.1.1.	Migration des précurseurs ostéoclastiques	120
3.1.2.	Différenciation ostéoclastique	121
3.2.	Actions sur la lignée ostéoblastique.....	122
3.2.1.	Migration des précurseurs ostéoblastiques.....	122
3.2.2.	Prolifération ostéoblastique.....	122
3.2.3.	Différenciation ostéoblastique.....	123
3.3.	Actions sur les ostéocytes	124
3.4.	Synthèse	124
VI	Cadre et objectifs du travail	126
VII	Résultats.....	127
VIII	Discussion.....	133
IX	Conclusion	168
	Bibliographie.....	169
	Liste des publications	188
	Liste des communications orales	188
	Liste des communications par affiches	188
	Liste des travaux d'encadrement	189

Liste des abréviations

ABC : *ATP-binding cassette*

BMPs : *Bone Morphogenetic Proteins*

BMPRs : *Bone Morphogenetic Proteins Receptors*

BMU : *Basic Multicellular Unit*

BRC : *Bone Remodeling Compartment*

CFU-GM : *colony forming units - granulocyte macrophage*

CSM : cellule souche mésenchymateuse

CST : coefficient de saturation de la transferrine

dhS1P : dihydrosphingosine-1-phosphate

DCYTB : *duodenal cytochrome b*

DMO : densité minérale osseuse

DMT1 : *divalent metal transporter 1*

DXA : *Dual energy X-ray Absorptiometry* / l'absorption bi-photonique aux rayons X

EPO : érythropoïétine

ERFE : érythroferrone

FAC : fer ammonium citrate

FGFs : *Fibroblast Growth Factors*

HAP : hydroxyapatite

HCP1 : *heme carrier protein 1*

HG : hémochromatose génétique

HJV : hémojuvéline

HMGB1 : *high mobility group box 1*

IGFs : *Insulin-like Growth Factors*

Ihh : *Indian Hedgehog*

IL-6 : *Interleukine 6*

IRE : *Iron Responsive Element*

IRP : *Iron Responsive Protein*

LPI : *labile Plasma Iron*

LPPs : *lipide phosphate phosphatases*

M-CSF : *macrophage colony-stimulating factor*

μCT : *micro-computed tomography*

MEC : matrice extracellulaire

NTBI : *Non-Transferrin Bound Iron*

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OPG : ostéoprotégérine

Osx : osterix

PAL : phosphatase alcaline

PDGF : Platelet-derived growth factor

PNCs : protéines non collagéniques

QCT : *Quantitative Computed Tomography*

RANKL : *receptor activator of nuclear factor κB ligand*

RER : réticulum endoplasmique rugueux

ROS : *reactive oxygen species* / espèces réactives de l'oxygène

RT-qPCR : PCR quantitative en Temps Réel

RUNX2 : *Runt-related transcription factor 2*

S1P : sphingosine-1-phosphate

S1PRs : *sphingosine-1-phosphate receptors*

SPHKs : *sphingosine kinases*

SPL : S1P lyase

SPNS2 : *Spinster homolog 2*

SPT : *sérine palmitoyl transférase*

SPPs : *sphingosine phosphate phosphatases*

STAT3 : *signal transducer and activator of transcription 3*

TfR1 : récepteur de la transferrine de type 1

TGF-β : *Transforming Growth Factor-β*

UTR : *Untranslated Transcribed Region*

Introduction

L'ostéoporose est une pathologie du squelette responsable d'une fragilité osseuse accrue susceptible d'entraîner la survenue de fractures, même lors de traumatismes à faible énergie. Il s'agit d'un problème de santé publique majeur touchant environ 3,5 millions de français et responsable de 370000 fractures en 2010. La baisse de résistance mécanique du tissu osseux qu'elle entraîne est habituellement un phénomène physiologique lié à l'âge qui peut, dans les cas d'ostéoporose dite secondaire, être provoquée par une situation pathologique. C'est le cas des situations de surcharges en fer. Qu'elles soient d'origine génétique (hémochromatoses) ou secondaire (thalassémies), les surcharges en fer favorisent la baisse de densité minérale osseuse et par conséquent l'apparition d'une ostéoporose. Bien que des liens entre excès de fer et perte osseuse aient pu être établis *in vivo* et *in vitro*, les mécanismes cellulaires mis en jeu restent à ce jour incomplètement caractérisés, notamment au niveau de l'ostéoblaste.

Notre objectif, avec ce travail, a donc été d'identifier et préciser les mécanismes conduisant à l'altération phénotypique et fonctionnelle de la cellule ostéoblastique constatée en présence d'une surcharge en fer. Les travaux présentés ci-après ont porté sur l'étude de la voie de signalisation S1P/S1PR au sein d'un modèle cellulaire ostéoblastique humain : la lignée MG-63. Ceux-ci ont été motivés par réalisation préalable d'une étude transcriptomique nous ayant permis d'identifier, dans cette lignée, une régulation par le fer de l'expression du gène *SPNS2*, dont la protéine permet l'export de la Sphingosine-1-Phosphate (S1P).

Avant l'exposition des travaux, présentés sous forme d'un article scientifique, une mise au point bibliographique initiale est proposée afin de présenter tous les éléments nécessaires à la compréhension et à la discussion des résultats obtenus. Il a ainsi été abordé dans le chapitre I les principaux éléments de la physiologie du tissu osseux sain et dans le chapitre II, la physiopathologie de l'ostéoporose. Dans le chapitre III sera présenté le métabolisme du fer ainsi que les principales situations conduisant à l'apparition d'une surcharge de ce métal dans l'organisme. Le chapitre IV

proposera quant à lui une revue bibliographique complète des études réalisées sur le lien entre l'excès de fer et l'altération du tissu osseux. Enfin, sera abordé dans le chapitre V une revue du métabolisme des sphingolipides ainsi que des actions de la S1P sur l'homéostasie du tissu osseux.

Après l'exposition des travaux, une discussion générale des résultats obtenus sera présentée ainsi que les conclusions qui en sont issues.

I Organisation et physiologie du tissu osseux sain

1. Généralités

Le tissu osseux constitue, au sein de l'organisme, un système de soutien rigide essentiel à la réalisation des mouvements chez tous les vertébrés. Il s'agit d'un tissu conjonctif d'un type particulier car celui-ci est physiologiquement minéralisé. Il est constitué d'une population cellulaire hétérogène (ostéocytes, ostéoblastes et ostéoclastes) et d'une importante matrice extracellulaire principalement constituée de fibres de collagène minéralisées par de l'hydroxyapatite. L'os est donc un matériau composite ayant des propriétés de résistance mécanique permettant au squelette d'assurer à la fois maintien, protection et locomotion de l'organisme. Ce tissu, hautement vascularisé, est également le siège de fonctions biologiques et métaboliques importantes telles que l'hématopoïèse et le maintien de l'homéostasie phosphocalcique. Sous l'apparence rigide de l'os se cache en réalité un tissu très vivant en perpétuel renouvellement car soumis en permanence à un processus de dégradation / réparation appelé remodelage osseux. Ce processus, dont l'objectif principal est le remplacement de l'os endommagé, résulte d'une action coordonnée entre résorption et formation de tissu osseux. Il s'agit d'un phénomène essentiel pour le maintien de la densité et de l'intégrité structurale de l'os au cours du temps. Il est chaque année à l'origine d'un renouvellement de 5 à 10% du squelette, ce qui aboutit à terme au remplacement d'un squelette adulte complet tous les 10 ans. Le maintien de la qualité du tissu osseux est donc conditionné par le contrôle étroit de ce processus de remodelage et par conséquent de l'équilibre entre destruction et formation de l'os. Toute rupture de cet équilibre est ainsi génératrice de troubles osseux localisés ou systémiques et va de ce fait altérer la robustesse de la structure osseuse.

2. Anatomie et structure macroscopique du tissu osseux

L'organisation du tissu osseux est extrêmement variable que ce soit au niveau de la forme elle-même de l'os ou au niveau de sa structure interne. En effet, les os composant le squelette humain présentent des contraintes physiques différentes ayant nécessité au cours de l'évolution une adaptation structurelle interne et externe. Il existe ainsi plusieurs types d'os regroupés en différentes catégories ainsi que plusieurs schémas d'organisation structurale interne répondant aux besoins spécifiques de chaque partie du squelette.

2.1. Catégories d'os

La classification des os selon leur forme n'est pas chose aisée, mais l'utilisation de critères anatomiques très généraux a permis leur regroupement en quatre catégories : longs, courts, plats et irréguliers. Les **os longs** présentent la particularité d'être beaucoup plus longs sur un axe que sur l'autre (ex. : fémur, phalange). Un **os court** ne présente pas, quant à lui, une telle dissymétrie et est globalement de longueur, largeur et épaisseur égale (ex. : os du carpe). Les **os plats** (os du crâne, scapulas et côtes) présentent quant à eux une épaisseur moins importante que leur longueur et leur largeur. Enfin, les **os irréguliers** comme les vertèbres comprennent deux formes différentes ou plus.

2.2. Organisations architecturales du tissu osseux

En plus de leur différence de forme, les os présentent au sein même de leur structure interne une organisation architecturale hétérogène. Deux schémas d'organisation peuvent être définis, chacun présentant des propriétés physiques et métaboliques différentes. Ainsi la plupart des os présentent à la fois en leur sein une organisation de type **corticale** et une organisation de type **trabéculaire** (1).

2.2.1. Tissu osseux cortical

L'os cortical (os compact) représente environ **80 %** de l'ensemble du squelette humain. Il constitue la paroi externe de tout os ainsi que la partie centrale cylindrique des os longs (diaphyse) où il entoure le canal médullaire. Il est organisé en structures cylindriques appelées ostéons dont l'axe central est constitué par le canal de Havers contenant capillaires sanguins et système nerveux. Les ostéons sont reliés entre eux, ainsi qu'à la cavité médullaire et la surface de l'os, par l'intermédiaire de canaux transverses appelés canaux de Volkmann (**Figure 1**). Cette disposition confère à l'os cortical un maximum de résistance mais peu de surfaces d'échanges ce qui en fait une zone métaboliquement peu active.

2.2.2. Tissu osseux trabéculaire

L'os trabéculaire (spongieux) représente quant à lui **20 %** de la masse osseuse totale et présente une organisation architecturale lui conférant des propriétés différentes de l'os cortical. En effet, sa structure, constituée de travées anastomosées, forme un réseau tridimensionnel alvéolaire plus aéré, délimitant des cavités inter-trabéculaires principalement remplies de moelle osseuse

(**Figure 1**). Il se situe essentiellement dans les os courts, plats et irréguliers ainsi que dans les parties distales des os longs (épiphyses). Cette architecture lui confère à la fois résistance et flexibilité ainsi qu'une surface d'échange importante avec le microenvironnement osseux, ce qui en fait un site métaboliquement actif où le renouvellement osseux (remodelage) est cinq à six fois plus important que dans l'os cortical (2).

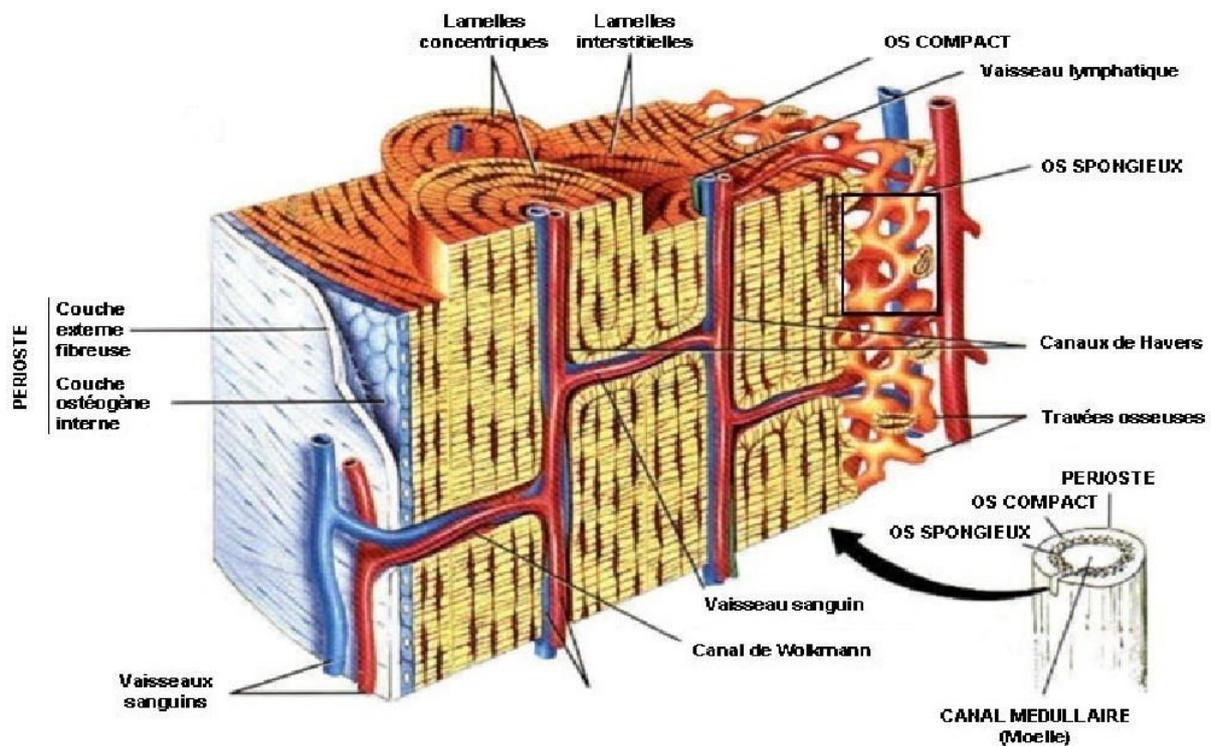


Figure 1: Organisation architecturale du tissu osseux (3)

3. Composition du tissu osseux

Le tissu osseux est principalement composé d'une matrice extracellulaire (**MEC**) qui doit être, d'un point de vue de sa composition, considérée comme un matériau composite. Elle est constituée d'une matrice organique sur laquelle viennent se former des cristaux d'hydroxyapatite (**HAP**) par un processus de nucléation. Ceux-ci représentent la phase dite « minérale ». En plus de la MEC, le tissu osseux va également abriter différents éléments cellulaires ainsi que d'autres constituants tels que de l'eau et des composants lipidiques.

3.1. Matrice extracellulaire

3.1.1. Matrice organique

La matrice organique, également appelée tissu ostéoïde, représente environ 32% du volume du tissu osseux. Elle est composée à 90% par du **collagène de type I**, le reste étant constitué d'un ensemble varié de protéines dites « non collagéniques » (**PNCs**) (4). Ces dernières, bien qu'étant quantitativement moins importantes, possèdent un rôle physiologique essentiel. En effet, nombres d'entre-elles interviennent de manière plus ou moins directe dans le processus de minéralisation de la trame collagénique.

3.1.1.1. Collagène de type I

Le collagène de type I est une protéine fibrillaire synthétisée dans le tissu osseux par les cellules responsables de la formation de l'os : les ostéoblastes. Chaque molécule est constituée de deux chaînes identiques $\alpha 1$ et d'une chaîne $\alpha 2$ codées respectivement par les gènes *COL1A1* et

COL1A2. Produites tout d'abord sous forme de procollagène, ces trois chaînes vont s'agencer de manière à constituer une structure superhélicoïdale. Ainsi constituées, les triples hélices vont ensuite s'assembler de façon à former des fibrilles qui elles-mêmes se rassemblent pour former des fibres d'environ 10 µm de diamètre (4) (**Figure 2**).

3.1.1.2. Protéines non collagéniques

Tout ce qui au sein de la MEC est protéique et n'est pas du collagène de type I est regroupé sous le terme de « protéines non collagéniques ». A ce jour plus de 200 PNCs ont pu être identifiées et bien que très nombreuses, celles-ci ne représentent que 10% des protéines de la MEC. Elles peuvent résulter d'une synthèse *in situ* par les cellules osseuses ou provenir des liquides interstitiels en contact avec le tissu osseux. Les plus importantes d'un point de vue physiologique sont l'**ostéopontine**, la **Bone Sialoprotein**, l'**ostéonectine** et l'**ostéocalcine**.

3.1.2. Phase minérale

Elle représente environ 43 % du volume du tissu osseux (4) et est constituée de cristaux d'apatite phosphocalcique hydroxylé (ou hydroxyapatite (**HAP**)) de composition $[(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$. Ces cristaux croissent principalement dans les espaces intermoléculaires des fibrilles de collagène (4) (**Figure 2**). Ils assurent la minéralisation du tissu ostéoïde et confèrent à l'os sa rigidité. Ils sont un facteur essentiel de la compétence biomécanique du tissu osseux qui est un matériau à la fois léger et résistant. La phase minérale constitue également, de par sa composition, une réserve d'ions calcium (Ca^{2+}) et phosphates (PO_4^{3-}) facilement mobilisable pour assurer le maintien de l'homéostasie phosphocalcique de l'organisme.

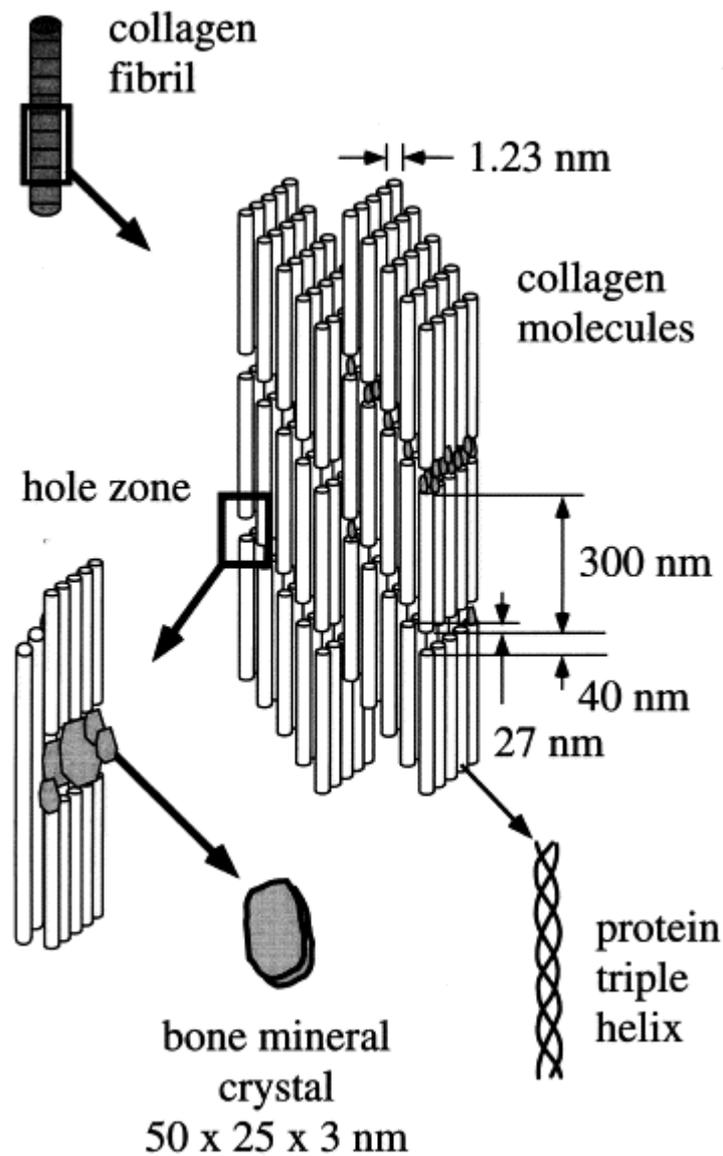


Figure 2 : Organisation architecturale de la matrice extracellulaire (MEC) (1)

3.2. Éléments cellulaires

En dehors des cellules sanguines et hématopoïétiques présentes dans l'os, on trouve principalement trois types de cellules participant activement au maintien de l'intégrité structurelle de ce tissu : les **ostéoclastes**, les **ostéoblastes** et les **ostéocytes**.

3.2.1. Ostéoclastes

3.2.1.1. Description

Les ostéoclastes sont des cellules géantes (~ 150 µm), multinucléées, responsables de la **résorption** du tissu osseux. Ce sont les seules cellules de l'organisme à posséder cette propriété biologique et représentent environ 1 à 2% des cellules osseuses (5). L'ostéoclaste est une cellule dont la structure va évoluer au cours de son cycle de vie. Sans polarité pendant la majeure partie de son existence, l'ostéoclaste va subir de profonds changements structurels lorsque celui-ci va acquérir sa capacité à résorber une matrice collagénique minéralisée. Il va ainsi à terme présenter une polarité importante lorsqu'il sera en activité au contact d'une surface osseuse (6). Il va en effet former une membrane apicale hyperspécialisée constituée de deux zones distinctes aux fonctionnalités très différentes. Tout d'abord la « *sealing membrane* » formant la bordure extérieure de la zone apposée sur l'os. Cette zone, grâce à la présence de podosomes, va permettre à l'ostéoclaste de s'ancrer et de former contre l'os un compartiment isolé de l'environnement extérieur. Le cytoplasme adjacent, dépourvu d'organelles, se nomme « *Clear zone* » et l'ensemble des deux va former la « *sealing zone* ». Au centre de la zone d'apposition va se trouver une membrane plissée, fonctionnement hyperspécialisée, appelée « *ruffled border* ». En opposition à cette membrane apicale va se trouver une membrane basolatérale exposée à l'environnement extérieur. L'organisation interne est elle aussi asymétrique : les multiples noyaux sont situés du côté basolatéral et entourés par un appareil de golgi et un réticulum endoplasmique rugueux clairsemé. Les très nombreuses mitochondries sont quant à elles principalement localisées à proximité de la « *Ruffled border* ». Il en est de même pour l'ensemble des vacuoles et lysosomes. L'organisation cellulaire d'une cellule ostéoclastique en fonction est représentée sur la **figure 3**.

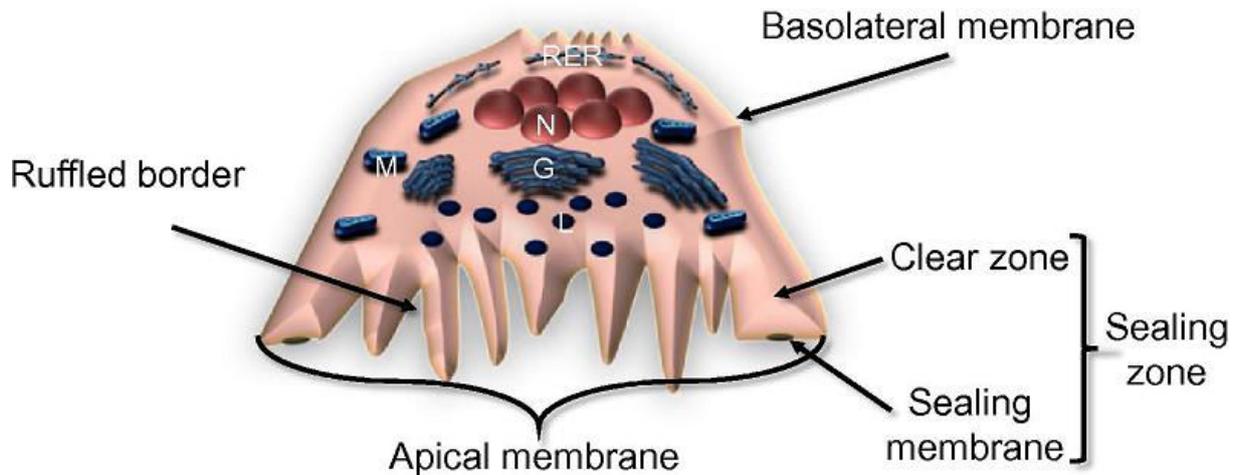


Figure 3 : Représentation d'un ostéoclaste ayant acquis ses fonctions de résorption (6)

Abréviations : N : Noyaux ; M : Mitochondries ; G : appareil de Golgi ; L : Lysosomes ; RER : Réticulum Endoplasmique Rugueux

3.2.1.2. Origine et différenciation

Les ostéoclastes sont des cellules d'origine hématopoïétique dérivées de la lignée monocytaire-macrophagique (CFU-GM) et dont la formation résulte de la fusion plusieurs précurseurs mononucléés. Le processus de différenciation permettant la formation d'ostéoclastes matures se réalise principalement sous l'impulsion de deux molécules :

- **M-CSF** : *macrophage colony-stimulating factor*
- **RANKL** : *receptor activator of nuclear factor κ B ligand*

Néanmoins, l'ostéoclastogénèse est un processus complexe faisant intervenir de multiples acteurs. En effet de nombreuses hormones et facteurs de croissance tel que l'**interleukine 6**, les **œstrogènes**, la **1,25-dihydroxyvitamine D₃** et la **parathormone** prennent part à celui-ci. Ils agissent notamment en régulant l'expression du M-CSF, de RANKL et de l'ostéoprotégérine (**OPG**) qui est un

« récepteur leurre » de RANKL (7). L'ostéoclastogénèse est un processus finement régulé dans le temps et l'espace nécessitant l'intervention de plusieurs acteurs cellulaires. En effet, les principales molécules nécessaires à l'ostéoclastogénèse (notamment RANKL) sont majoritairement produites dans le tissu osseux par les cellules de la lignée ostéoblastique (ostéoblastes, cellules bordantes et ostéocytes) (8). La séquence d'évènements constituant l'ostéoclastogénèse est résumée dans la **figure 4**.

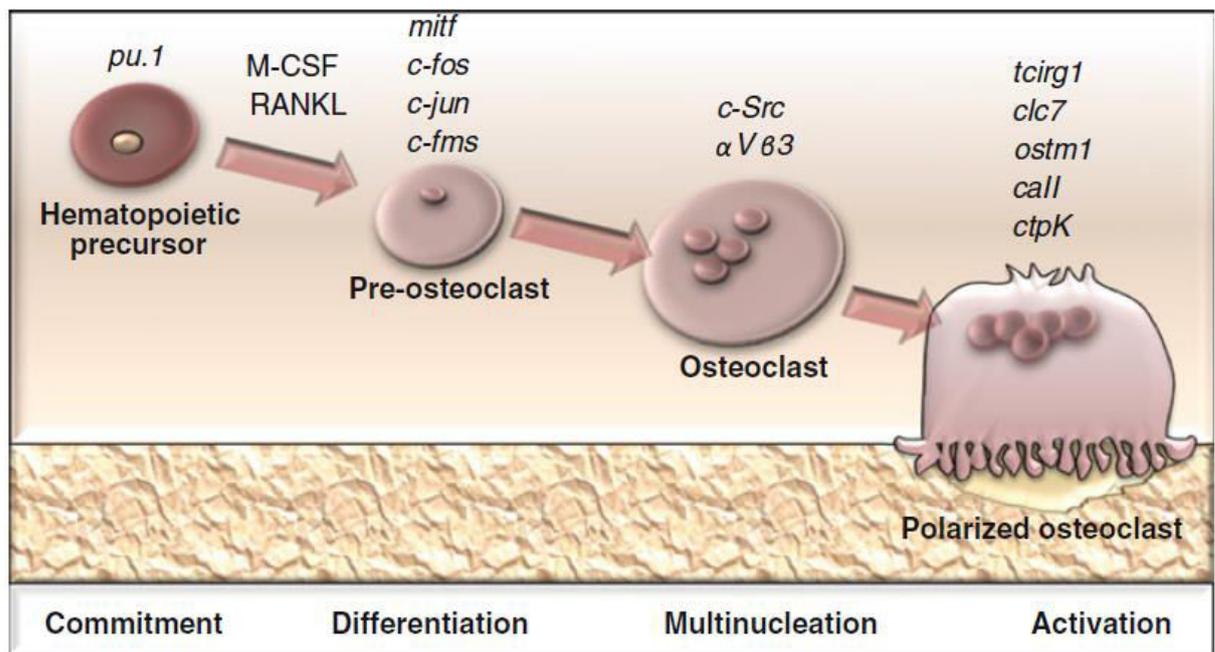


Figure 4 : Résumé des différentes étapes constituant l'ostéoclastogénèse (9)

Représentation schématique des différentes phases de l'ostéoclastogénèse faisant figurer les principaux gènes associés à chaque étape de différenciation

3.2.1.3. Fonction de résorption

La capacité de l'ostéoclaste à résorber une matrice minéralisée provient entre autre de son aptitude à former un compartiment clos entre lui-même et la MEC sous-jacente à dégrader. C'est au niveau de cette zone que l'ostéoclaste mature va former une membrane spécialisée, la « *ruffled border* » devant son nom à la présence de nombreux replis contenant pompes à proton ATP-dépendantes et canaux chlorure. Le compartiment formé va ainsi être acidifié par la production massive d'acide chlorhydrique, entraînant la dissolution de la phase minérale, première étape du processus de résorption. Il va s'ensuivre une protéolyse, principalement sous l'action de la **cathepsine K**, de la matrice collagénique précédemment mise à nu. Les produits de dégradation sont ensuite éliminés dans le milieu extracellulaire par transcytose. Une fois l'étape de résorption achevée, l'ostéoclaste va entrer en apoptose ou se déplacer pour entrer à nouveau en phase de résorption (10). L'ensemble du processus de résorption est représenté dans la **figure 5**.

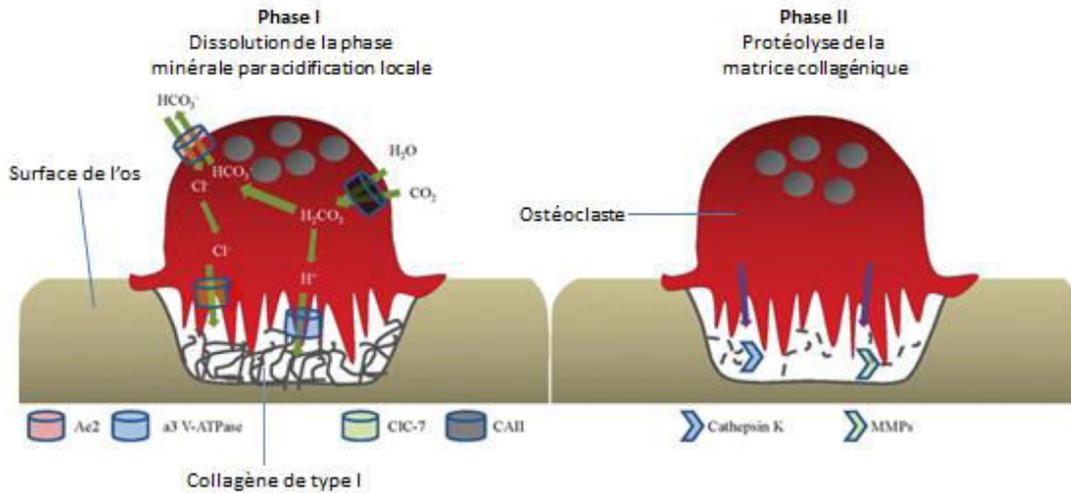


Figure 5 : Processus de résorption ostéoclastique (10)

Phase I : La dissolution de phase minérale est possible grâce à la sécrétion active de protons *via* l'**a3 V-ATPase** et le transport passif d'ions chlorure *via* **CIC-7** permettant localement la formation d'acide chlorhydrique. La génération de quantité suffisante de protons et d'ions chlorure est obtenue grâce à l'action de la **CAII** catalysant la formation de d' H_2CO_3 se dissociant spontanément en protons et HCO_3^- . Ce dernier est ensuite échangé contre un ion Cl^- *via* **Ae2**.

Phase II : La protéolyse du collagène de type I est principalement réalisée grâce à l'action de la cathepsine K ; des **MMPs** interviennent également mais de façon plus minoritaire.

Abréviations : **Ae2**, Anion exchanger 2 ; **a3 V-ATPase**, a3 subunit of the osteoclast-specific V-ATPase ; **CIC-7**, chloride channel 7 ; **CAII**, carbonic anhydrase 2 ; **MMPs**, matrix metalloproteinases

3.2.2. Lignée ostéoblastique

3.2.2.1. Description

La cellule ostéoblastique est souvent assimilée à l'ostéoblaste mature responsable de la synthèse du tissu ostéoïde et de sa minéralisation. Cependant le rôle de la cellule ostéoblastique ne se limite pas à cette unique fonction car c'est une cellule, ou plutôt une lignée cellulaire qui va évoluer dans le temps et assurer différentes activités au cours de son processus de différenciation (11,12).

3.2.2.2. Origine et différenciation

La lignée ostéoblastique prend sa source à partir d'un précurseur pluripotent présent dans le stroma cellulaire de la moelle osseuse : la cellule souche mésenchymateuse (**CSM**). Ce précurseur, également capable d'engendrer chondrocytes, adipocytes et myocytes (13), va engager sa différenciation ostéoblastique principalement sous l'action du facteur de transcription **RUNX2** (*Runt-related transcription factor 2*) (14,15). Celle-ci va se poursuivre et aboutir à la formation d'ostéoblastes dits « immatures » ne possédant pas encore la capacité fonctionnelle de former du tissu ostéoïde minéralisé. La cellule ostéoblastique va ensuite exprimer plusieurs caractères phénotypiques tels que le **collagène de type I** et la phosphatase alcaline (**PAL**) définissant ainsi le stade « ostéoblaste mature ». Elle va pouvoir alors prendre part à la constitution et au renouvellement du tissu osseux notamment grâce à ces deux marqueurs essentiels pour la synthèse de tissu osseux (16). Une fois sa fonction de synthèse effectuée, l'ostéoblaste va ensuite entrer en apoptose pour environ 60 à 80% de sa population (17). La fraction restante va pouvoir quant à elle

évoluer de deux manières : rester au niveau de la surface osseuse et se différencier en cellules bordantes ou se faire emprisonner dans la matrice et se différencier en ostéocytes. (Figure 6).

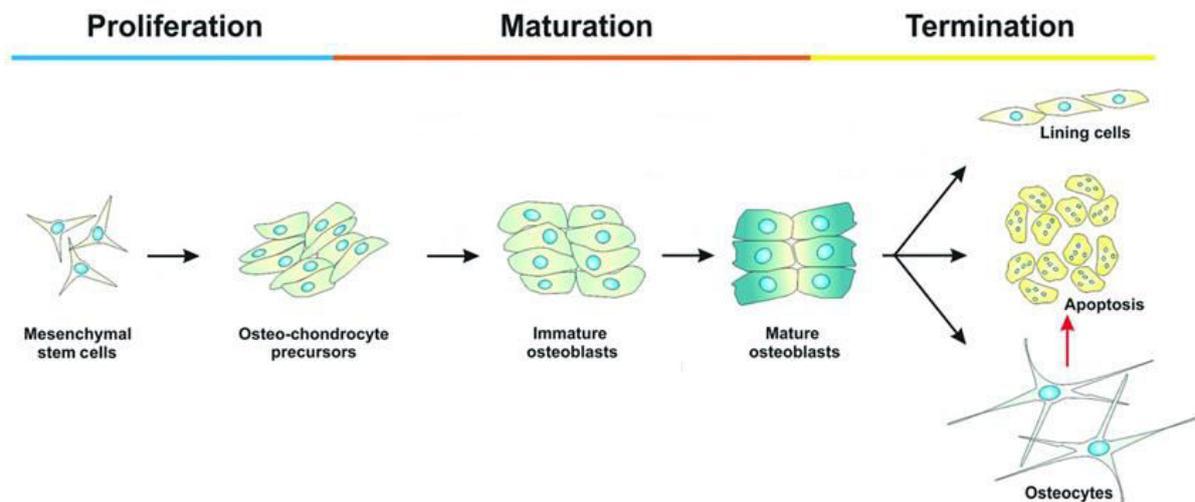


Figure 6 : Evolution de la lignée ostéoblastique au cours du processus de différenciation (5)

L'ensemble du processus de différenciation de la lignée ostéoblastique est régulé dans le temps par l'action séquentielle de plusieurs facteurs de transcription dont l'expression est conditionnée par de nombreux intervenants (hormones, facteurs de croissance, cytokines, interactions mécaniques et physico-chimiques). On peut citer, en plus de RUNX2 précédemment évoqué, les facteurs de transcription suivants :

- **Osterix (Osx)** décrit pour permettre l'engagement du précurseur ostéoblastique vers l'ostéoblaste immature (18) ;
- **LEF/TCF** qui, liés à la **β -caténine** produite par l'intermédiaire de la **voie canonique Wnt**, vont interagir avec RUNX2 et d'autres facteurs de transcription induisant l'ostéoblastogénèse (19) ;
- **ATF4** dont l'inactivation induit une importante diminution de la formation osseuse (20) ;

- La famille des facteurs de transcription **AP-1** (21) ;
- Les facteurs de transcription **Msx1**, **Msx2**, **Dlx5** et **Dlx6** appartenant la famille des protéines *Homeobox*, essentiels pour une ossification normale et donc susceptibles de participer à la différenciation ostéoblastique (22) ;
- **PPAR γ 2** qui possède la propriété d'inhiber la transcription de RUNX2 (23) et d'orienter la différenciation des CSM vers l'adipocyte (24) ;
- La famille de facteurs de transcription **C/EBPs** dont l'inactivation de certains membres va entraîner chez la souris une ostéopénie (25).

A l'exception d'Osterix qui est une cible de RUNX2 (26), la majorité des facteurs de transcription suscités vont agir en modulant l'expression de RUNX2 aux différentes étapes de la différenciation ostéoblastique (22). L'expression de ces facteurs de transcription va elle-même être conditionnée par de nombreux médiateurs cellulaires appartenant à différentes familles biologiques. On peut ainsi citer des hormones telles que la **parathormone**, **l'hormone de croissance**, la **1,25 dihydroxyvitamineD₃** et les **œstrogènes**, des facteurs de croissance comme le **TGF- β** (*Transforming Growth Factor- β*), **BMP-2** (*Bone Morphogenetic Protein 2*), **IGF-1** (*Insulin-like Growth Factor-1*) et la protéine **Ihh** (*Indian Hedgehog*) (22). C'est également le cas de quelques médiateurs lipidiques de la famille des sphingolipides dont le plus étudié à ce jour est la **sphingosine-1-phosphate** (S1P) (27).

3.2.2.3. Stades cellulaires de la lignée ostéoblastique

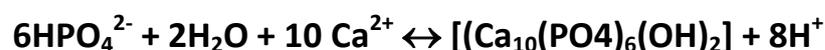
3.2.2.3.1. *Ostéoblaste mature minéralisant*

Description

Les ostéoblastes matures sont des cellules mononucléées de forme cuboïdale, caractérisées par leur capacité à synthétiser puis minéraliser le tissu ostéoïde. C'est une cellule hautement spécialisée, riche en PAL, contenant un appareil de golgi juxtanucléaire abondant, un réticulum endoplasmique rugueux (**RER**) développé ainsi que de nombreuses mitochondries (28). Ces caractéristiques cytologiques sont le reflet d'une activité de synthèse importante. Les ostéoblastes actifs sont organisés en un épithélium serré, présent uniquement au niveau de la zone de minéralisation appelée ligne cimentante (ou front de minéralisation).

Fonctions

La fonction principale de la cellule ostéoblastique mature est de synthétiser et minéraliser la matrice extracellulaire osseuse. Pour cela, l'ostéoblaste va, au niveau de sa surface apicale, entrer en contact avec ligne cimentante et former une zone isolée, aux conditions maîtrisables par la cellule. Il va en premier lieu y sécréter une quantité très importante de collagène de type I ainsi qu'une faible quantité de PNCs (principalement **ostéopontine** et **ostéocalcine**) (29). Vient ensuite le processus de minéralisation à proprement parler. Celui-ci n'est possible qu'à la condition d'une alcalinisation locale du milieu rendue possible grâce à l'extrusion de protons par l'ostéoblaste. Le pH ainsi modifié va autoriser la précipitation des ions phosphates et calcium présents sous la forme de cristal d'HAP selon l'équation suivante (30) :



Une fois l'étape de minéralisation localement achevée, une fraction des ostéoblastes matures va rester emprisonnée dans les espaces lacunaires de la matrice nouvellement synthétisée et évoluer vers un autre stade de la différenciation ostéoblastique : l'ostéocyte. L'ensemble du processus de minéralisation est représenté de façon schématique dans la **figure 7**.

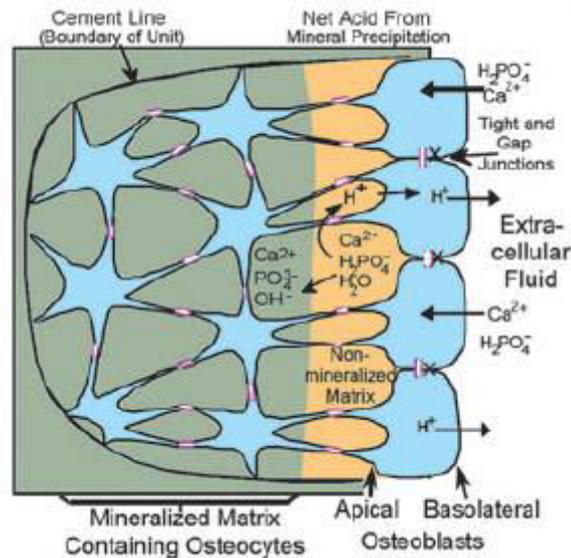


Figure 7 : Représentation schématique du processus de minéralisation (30)

La formation de cristaux d'HAP est possible grâce à une alcalinisation locale permise par l'extrusion de protons réalisée par les ostéoblastes ainsi que l'apport *in situ* d'ions calcium et phosphates en provenance des liquides extracellulaires.

3.2.2.3.2. Ostéocytes

Description

Les ostéocytes sont les cellules les plus abondantes de l'os puisqu'elles représentent environ 90 à 95% de l'ensemble des cellules osseuses (5). Ils peuvent vivre plusieurs décennies là où les ostéoclastes ne vivent que quelques jours et les ostéoblastes matures quelques semaines (31). Ces cellules sont régulièrement dispersées le long de la MEC, connectées les unes aux autres ainsi qu'aux cellules de la surface osseuse par l'intermédiaire d'importantes expansions dendritiques (32). Un réseau canaliculaire ostéocytaire est représenté dans la **Figure 8**.

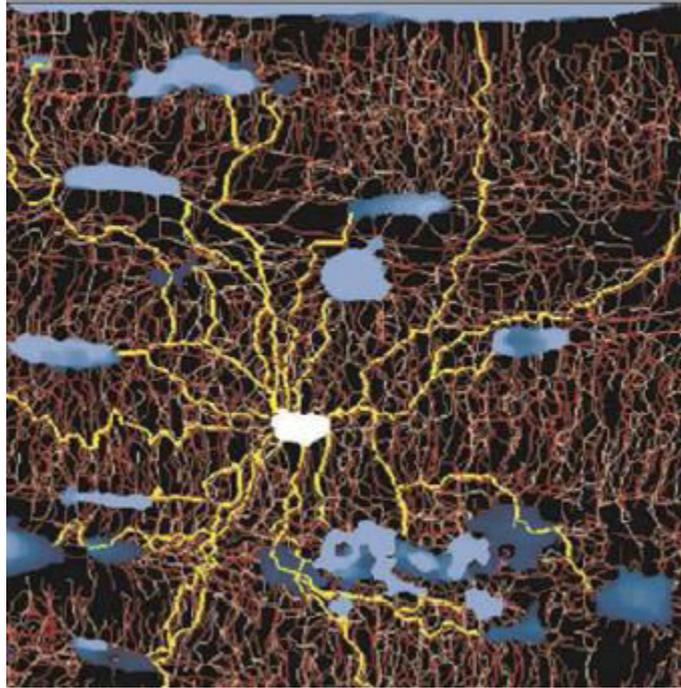


Figure 8 : Réseau canaliculaire ostéocytaire (33)

Visualisation d'un réseau canaliculaire (jaune) émanant d'un ostéocyte (blanc) reliant les cellules ostéocytaires les plus proches (bleues)

Leur différenciation à partir des ostéoblastes emprisonnés dans la matrice minéralisée est un processus actif entraînant un changement morphologique, génotypique et phénotypique. Le panel des gènes et marqueurs exprimés chez l'ostéocyte va se différencier de l'ostéoblaste tout en gardant une base commune (34). La liste des principaux marqueurs spécifiques des ostéocytes est représentée dans le **tableau 1**.

Protein	Main function
E11/gp38	Formation of cell process
MT1-MMP	Matrix degradation and canalicular formation
PHEX	Regulating phosphate metabolism
DMP1	Regulating phosphate metabolism and mineralization
FGF23	Controlling phosphate metabolism
Dkk1	Inhibiting bone formation
Sclerostin	Inhibiting bone formation
RANKL	Osteoclast differentiation and survival
OPG	Inhibitor of osteoclast differentiation

Tableau 1 : Principaux marqueurs et leur fonction exprimé par l'ostéocyte (35)

Fonctions

L'ostéocyte est le principal intégrateur de l'ensemble des signaux mécaniques, chimiques et cellulaires permettant l'initiation et la coordination des processus de résorption et de formation (31,34,36). Il est ainsi décrit pour participer activement à la régulation de l'activité ostéoblastique *via* la voie Wnt/ β caténine (34). Mais cette régulation ne se limite pas à la lignée ostéoblastique puisqu'il a été démontré que l'ostéocyte exprimait de puissants régulateurs de l'ostéoclastogénèse comme le M-CSF, le RANKL et l'OPG. Certains auteurs suggèrent même que l'ostéocyte soit la principale source de RANKL permettant ainsi l'initiation de l'ostéoclastogénèse (8,37). D'ailleurs l'inactivation ciblée de RANKL au sein de l'ostéocyte conduit chez la souris à une situation d'ostéopétrose (38). L'ostéocyte possède également des fonctions endocrines. Il est notamment le principal producteur de **FGF-23** (*Fibroblast Growth Factor-23*), un puissant régulateur de l'homéostasie des ions phosphates (39).

3.2.2.3.3. Cellules bordantes

Description

Les cellules bordantes sont des cellules affiliées à la lignée ostéoblastique, de forme aplatie, formant une monocouche à la surface du tissu osseux. Elles sont en général considérées comme étant des ostéoblastes quiescents ayant terminés leur fonction de minéralisation (12). Elles sont définies par leur localisation et leur morphologie, mais l'absence de marqueurs spécifiques et leur relative inaccessibilité rend difficile la détermination exacte de leur rôle dans l'homéostasie osseuse.

Fonctions

La fonction première attribuée aux cellules bordantes est de permettre une séparation physique entre la MEC du tissu osseux et les liquides extracellulaires en contact avec celui-ci (30). Cette séparation permettrait, en outre, un contrôle strict de l'accessibilité à la surface de l'os. Cela serait notamment le cas lors de l'initiation du processus de remodelage où il a été décrit que les cellules bordantes se détachaient pour faciliter l'accès des précurseurs ostéoclastiques à la MEC (40). Il a également été décrit que les cellules bordantes seraient susceptibles de se différencier en ostéoblastes matures, notamment sous l'action d'administrations intermittentes de parathormone (41).

3.3. Autres constituants

La matrice extracellulaire et les éléments cellulaires associés ne sont pas les seuls constituants du tissu osseux. En effet, l'os contient également une proportion importante d'eau ainsi qu'une quantité non négligeable de lipides.

3.3.1. Eau

L'eau est un constituant à part entière du tissu osseux puisqu'elle occupe environ 25 % du volume de l'os. Elle est distribuée de façon uniforme et est présente sous deux formats (4) :

- **libre** à l'intérieur des espaces vasculaires, lacunaires et canaliculaires,
- **liée** à l'intérieur de la matrice collagénique et de la phase minérale.

3.3.2. Lipides

Il est traditionnellement admis que les lipides présents au sein du tissu osseux ne proviennent que de la moelle osseuse hématopoïétique. Néanmoins, il s'avère que le tissu minéralisé contient lui-même une quantité non négligeable de lipides. En effet la quantité de lipides présents dans cette fraction de l'os peut représenter jusqu'à 5 % du poids total de tissu délesté de moelle hématopoïétique. Alors que la fraction lipidique présente dans la moelle osseuse est quasi exclusivement constituée de triglycérides (localisés dans les adipocytes), il apparaît que la composition des lipides extraits de la MEC minéralisée est moins homogène (42). Ainsi chez l'homme, les principales fractions mises en évidence sont constituées de triglycérides, cholestérol libre, cholestérol estérifié, acide gras libres et phospholipides (43). Classiquement reléguées à des fonctions uniquement structurelles ou énergétiques, certaines molécules lipidiques sont dorénavant considérées comme de véritables médiateurs cellulaires possédant une activité biologique propre, dont les changements de concentration aboutissent à des conséquences fonctionnelles (44). Ces médiateurs, généralement synthétisés *in situ*, exercent leur action biologique *via* des récepteurs cellulaires spécifiques. Parmi ces médiateurs lipidiques, nombreux sont décrits pour exercer une action biologique sur les cellules constituantes du tissu osseux et par conséquent sur la physiologie de l'os. Un résumé est présenté dans la **figure 9**.

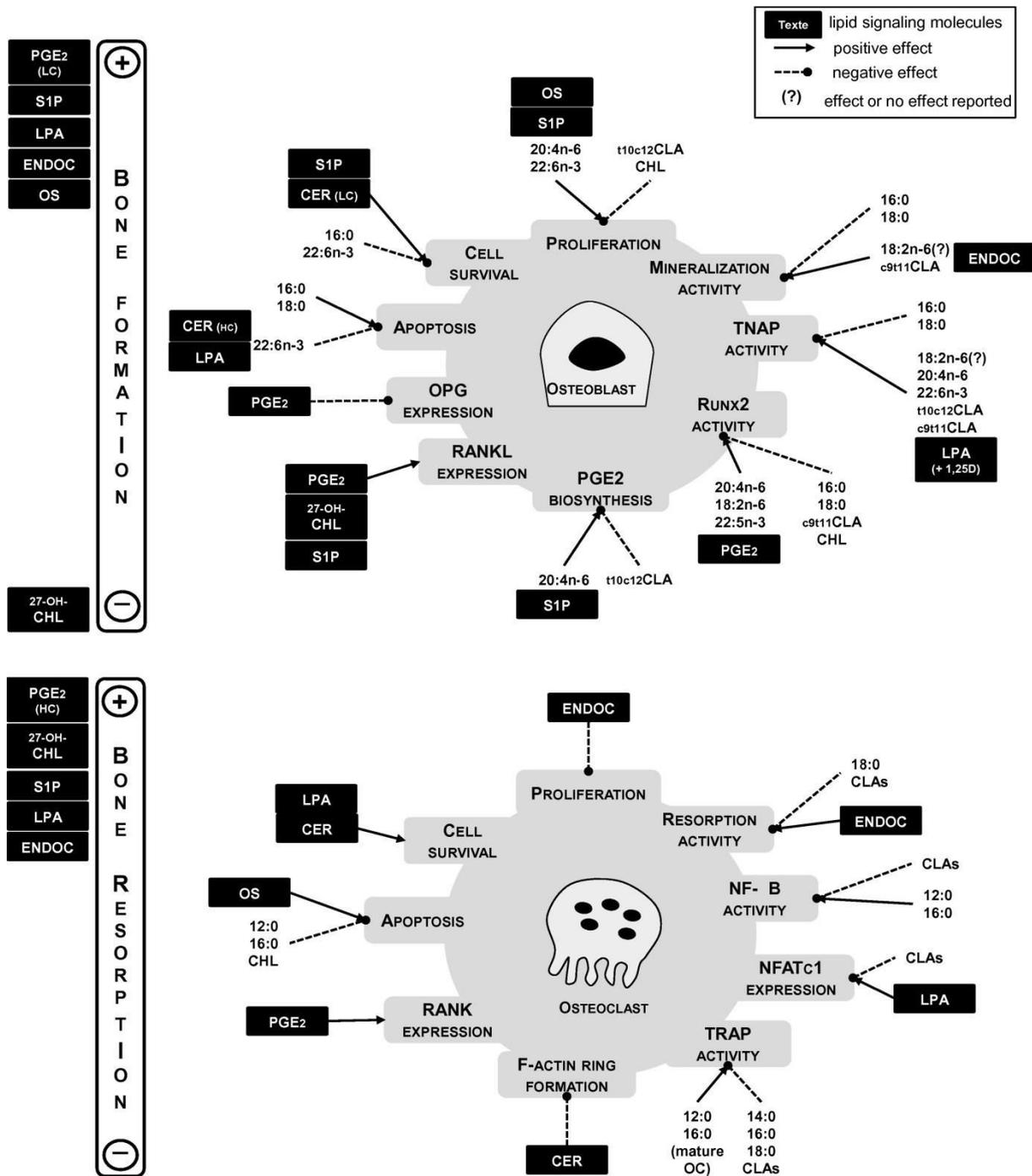


Figure 9 : Médiateurs Lipidiques possédant une action biologique sur les ostéoblastes et les ostéoclastes (42).

Abréviations : CHL, cholestérol ; CER, céramides ; CLA, isomères conjugués de l'acide linoléique ; ENDOC, endocannabinoïdes ; LPA, acide lysophosphatidique ; NFATc1, nuclear factor of activated T cells ; NF-κB, nuclear factor κB ; OPG, ostéoprotégérine ; OS, N-oleoyl-L-Sérine ; PGE₂, prostaglandine E₂ ; RANK, receptor activator of nuclear factor-κB ; RANKL, receptor activator of nuclear factor-κB ligand ; Runx2, runt related transcription factor 2 ; S1P, sphingosine-1-phosphate ; TNAP, phosphatase alcaline tissu non-spécifique ; TRAP, phosphatase acide tartrate résistante, 1,25D, 1,25-dihydroxyvitamine D₃

4. Physiologie du tissu osseux

Sous son apparence rigide, le tissu osseux est en réalité un tissu très dynamique en permanente évolution et adaptation au cours de la vie d'un individu. Deux processus distincts contrôlent notre capital osseux : le **modelage** et le **remodelage**. D'apparence similaire, ces deux termes font en réalité référence à deux mécanismes très différents dans leur fonctionnement. En effet, alors que le processus de remodelage nécessite le couplage de plusieurs effecteurs cellulaires osseux au sein d'une unité structurale circonscrite, le processus de modelage, lui, en est exempt (45). Le modelage permet aux os de changer de forme et de taille et autorise la réalisation d'une croissance harmonieuse pendant l'enfance et l'adolescence. Le remodelage possède quant à lui un autre rôle : celui de détruire le tissu osseux endommagé afin de le remplacer par la même quantité de matériel, au même endroit. Il permet ainsi de maintenir l'intégrité structurale de l'os ainsi qu'une densité minérale optimale tout au long de la vie d'un individu. La **figure 10** illustre de façon schématique les différences entre les deux processus.

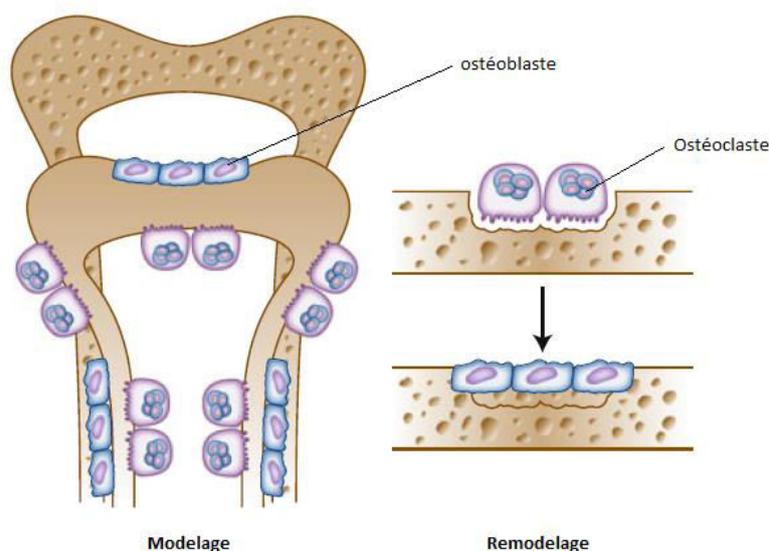


Figure 10 : Représentation schématique des processus de modelage et remodelage osseux (46)

4.1. Le modelage osseux

Le modelage osseux (ou ostéogénèse) est le processus permettant la constitution puis la croissance du tissu osseux lors de la période fœtale, l'enfance et l'adolescence et ceci jusqu'à maturation complète du squelette (entre 18 et 25 ans). Deux mécanismes distincts pilotent l'ostéogénèse : **i) l'ossification intramembranaire** provoquant une conversion directe de tissu mésenchymateux en tissu osseux ; **ii) l'ossification endochondrale** induisant le remplacement des ébauches cartilagineuses préformées par du tissu osseux. Dans les deux cas, l'os nouvellement formé est constitué d'un tissu fibreux appelé *os primaire* qui sera ensuite remplacé par du tissu osseux lamellaire lors de l'ossification secondaire. Contrairement au remodelage, la constitution et la croissance du tissu osseux implique une réduction du processus de résorption osseuse au profit de celui de formation et nécessite un **découplage** de ces processus dans des sites anatomiquement distincts (46).

4.2. Le remodelage osseux

Le remodelage osseux est un processus physiologique effectif tout au long de la vie d'un individu permettant le remplacement du tissu osseux endommagé et donc le maintien de la compétence biomécanique de l'os. C'est un processus différent du modelage dans la mesure où l'activité de formation osseuse est obligatoirement précédée d'une phase de résorption. Il nécessite donc l'interaction et l'action coordonnée à la fois dans le temps et l'espace des effecteurs ostéoclastiques et ostéoblastiques. Cette coordination porte le nom de **couplage** et prend place au sein d'une structure anatomique appelée **BMU** pour **Basic Multicellular Unit**. Ces BMU sont délimitées et isolées par une couche de cellules d'origine mésenchymateuses (47) formant ainsi une structure vascularisée et hautement spécialisée : le **Bone Remodeling Compartment (BRC)** (48). Le

processus de remplacement de l'os s'effectue donc par l'intermédiaire de ces unités de remodelage anatomiquement distinctes les unes des autres et fonctionnellement indépendantes. L'ensemble des BRC répartis sur le squelette travaillent de manière totalement asynchrone et tandis que certaines initient leur phase de résorption d'autres achèvent leur phase de formation (12).

La compréhension du remodelage osseux étant la résultante d'une myriade d'expérimentations explorant chacune des facettes de ce phénomène complexe, il est actuellement difficile d'établir la mécanistique exacte de l'intégralité de ce processus tant la quantité et la diversité de facteurs y prenant part sont importants et interdépendants. Néanmoins, pour être opérationnel, il est établi que le remodelage osseux doit associer quatre sous-processus au sein d'une structure spécialisée (le BRC) créée extemporanément en fonction des besoins.

Le remodelage osseux est donc la combinaison :

- d'une structure anatomique : le BRC, qui forme un lieu confiné permettant une régulation étroite du processus de remodelage,
- d'une phase d'initiation ciblée permettant la constitution du BRC (*sous-processus 1*),
- de précurseurs cellulaires (ostéoclastiques et ostéoblastiques) qui doivent :
 - être recrutés sur site (*sous-processus 2*)
 - se différencier (*sous-processus 3*)
- d'un couplage des activités de résorption et de formation (*sous-processus 4*).

L'ensemble de ces sous-processus constituant *in fine* le remodelage osseux sont soumis à l'action de facteurs locaux et systémiques assurant leur régulation et leur coordination.

4.2.1. Un site anatomiquement et fonctionnellement ultraspécialisé

Le remodelage osseux prend donc place au sein d'une structure anatomique spécialisée nommée BMU, comprenant une lacune osseuse (lacune de Howship) où sont présents à la fois ostéoclastes, ostéoblastes et ostéocytes. La BMU est caractérisée à la fois par son aspect anatomique (la lacune) et son aspect fonctionnel. En tant que site exclusif du renouvellement osseux, celle-ci présente en son sein plusieurs zones distinctes, sièges d'activités diamétralement opposées et pourtant géographiquement très proches. Ainsi coexistent au sein d'une même lacune des zones de résorption et de formation selon un schéma organisationnel dépendant du type d'os. En effet les BMU présentes dans l'os cortical vont être différentes dans leur structure et leur manière de remplacer le tissu osseux de celles présentes dans l'os trabéculaire. Dans l'os cortical les ostéoclastes vont ainsi creuser des tunnels à travers le tissu osseux alors que dans l'os trabéculaire ils vont creuser des tranchées en surface. Les ostéoblastes comblant par la suite ces tunnels et tranchées vont ainsi respectivement créer des ostéons et héli-ostéons (49).

4.2.1.1. Organisation de la BMU dans l'os cortical

Dans l'os cortical, une BMU en pleine activité est constituée d'un cylindre allongé, rétréci en ses deux extrémités, mesurant environ 2 mm de long pour 0,2 mm de large. Il prend naissance à la surface d'un canal de Havers ou de Wolkmann et va progresser à travers le tissu cortical selon une trajectoire généralement alignée sur l'axe de l'os à la vitesse d'environ 20 à 40 μm / jour sur une distance généralement comprise entre 2 et 6 mm (49). Tout au long de son existence, la BMU va conserver l'organisation structurelle et temporelle de tous les éléments la composant et progresser dans la direction appropriée en étant guidé par les contraintes mécaniques subies par l'os (50). Chaque cylindre est constitué de la façon suivante : à l'avant va se trouver le *cône de résorption*, où une dizaine d'ostéoclastes multinucléés vont résorber l'os (51) ; juste après, coïncidant avec l'arrêt

de l'activité ostéoclastique, va se trouver une *zone de transition* (« reversal phase »). Cette zone est recouverte de cellules dérivées de la lignée ostéoblastique appelées « *reversal cells* ». C'est à ce niveau qu'apparaît la ligne de ciment démarquant l'os ancien de l'os nouvellement synthétisé. Puis immédiatement après vient la *zone de formation*, bordée par environ 2000 ostéoblastes matures minéralisant le tissu ostéoïde nouvellement synthétisé (52). Au centre de la lacune cylindrique se trouve un capillaire sanguin contourné entouré de tissu conjonctif. Il est important de noter que le maintien de cette organisation structurelle tout au long de la vie de la BMU (~ 120 jours (53)) implique le recrutement continu de cellules ostéoclastiques et ostéoblastiques ainsi que la croissance coordonnée de l'ensemble des structures supports (capillaire, tissu conjonctif). La **figure 11** illustre de façon schématique la section longitudinale d'une BMU corticale.

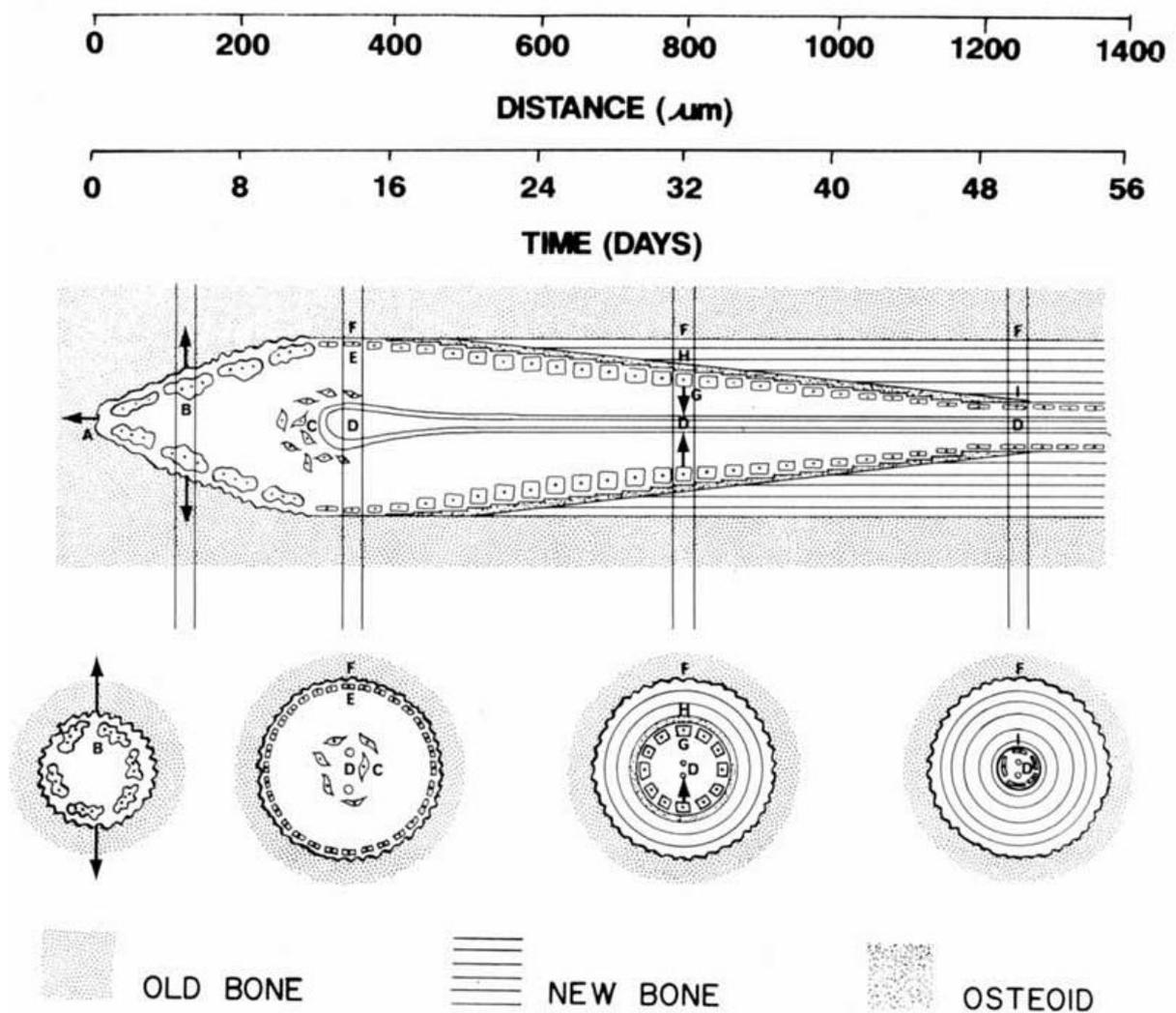


Figure 11 : Représentation schématique d'une section longitudinale d'une BMU corticale (49)

Le diagramme présenté fait apparaître une section longitudinale de BMU corticale ainsi que plusieurs coupes transverses au niveau des différentes zones qui la compose :

- A** : Extrémité de la zone de résorption (progression de la droite vers la gauche)
- B** : Ostéoclastes multinucléés élargissant la zone de résorption
- C** : Précurseurs ostéoblastiques et ostéoclastiques
- D** : Boucle du capillaire sanguin central
- E** : Zone de transition (« Reversal phase »)
- F** : Ligne de ciment
- G** : Ostéoblastes (progression centripète)
- H** : Tissu ostéoïde
- I** : Cellules bordantes

4.2.1.2. Organisation de la BMU dans l'os trabéculaire

L'organisation de la BMU au sein de l'os trabéculaire est différente de celle existante au sein de l'os cortical. En effet, la zone de résorption créée par les ostéoclastes dans l'os trabéculaire va constituer une tranchée à la surface des trabécules en lieu et place du cône cylindrique observé dans l'os cortical. Ainsi, l'organisation d'une BMU trabéculaire peut être envisagée comme étant la partie inférieure d'une demi-BMU corticale (54). Tout comme dans l'os cortical, la BMU va conserver l'organisation structurelle et temporelle de tous les éléments la composant au cours de la progression de la tranchée (49). Celle-ci va s'effectuer à la surface de l'os et progresser dans le sens de la contrainte mécanique dominante subie par la partie osseuse où se localise la tranchée (50). La **figure 12** représente de façon schématique l'organisation d'une BMU trabéculaire. Celle-ci est composée de plusieurs segments juxtaposés correspondant chacun à une séquence du cycle du remodelage osseux. Tout comme dans la BMU corticale, chaque zone est recouverte d'éléments cellulaires différents exerçant leurs activités respectives et complémentaires. L'objectif reste ici le même : chaque zone de résorption initiée est remplacée par une quantité équivalente de tissu nouvellement synthétisé. Ainsi vont se succéder plusieurs zones segmentées selon la population cellulaire présente à la surface de l'os : en premier lieu la **zone de résorption** creusée grâce à l'intervention d'ostéoclastes actifs. Celle-ci va s'achever lorsque les ostéoclastes présents vont entrer en apoptose et libérer la surface érodée (55). Immédiatement colonisée après la disparition des ostéoclastes, cette surface n'est quasiment jamais exempte de cellules (56). Il s'ensuit ainsi immédiatement une **zone de transition** tapissée de cellules mononuclées (« *reversal cells* ») constituant un « pont » entre ostéoclastes et ostéoblastes. Ces cellules de forme allongée sont réparties de façon plus dense que les cellules bordantes et leur forme devient de plus en plus cuboïdale au fur et à mesure de leur proximité avec les ostéoblastes minéralisants (57). Leur filiation a été longuement discutée et une étude récente a permis d'établir leur origine ostéoblastique grâce à la mise en évidence d'une expression importante de marqueurs tels que la PAL et RUNX2 (57). De

nombreuses observations suggèrent que cette zone de transition participe activement au couplage des activités biologiques de la BMU en permettant notamment l'initiation de la phase de formation (40) en :

- « préparant » la surface de l'os érodé par les ostéoclastes,
- contribuant à la formation de la ligne de ciment,
- participant à la différenciation des précurseurs ostéoblastiques recrutés dans la BMU.

En conséquence, la zone de transition est donc immédiatement suivie de la *zone de formation* où la surface de l'os est recouverte d'une monocouche d'ostéoblastes minéralisants. Il est possible de discerner au sein de cette zone deux segments différenciés par la morphologie changeante des ostéoblastes. Tout d'abord de forme cuboïdale, ils deviennent progressivement plats et fins au fur et à mesure qu'ils s'éloignent de la zone de transition. Leurs capacités de formation du tissu osseux diminuent de façon concomitante ; ceci est probablement provoqué par l'augmentation de la surface couverte par une même cellule ainsi que par son vieillissement (49). On peut ainsi arbitrairement délimiter deux zones, une « *précoce* » et une « *tardive* », en rapport avec l'aspect et la capacité de minéralisation des ostéoblastes présents. Cette capacité de formation devient quasiment nulle lorsque la lacune est totalement comblée ; c'est à ce niveau qu'une partie des ostéoblastes terminent leur différenciation en cellules bordantes quiescentes, délimitant ainsi la fin de la zone active de formation osseuse.

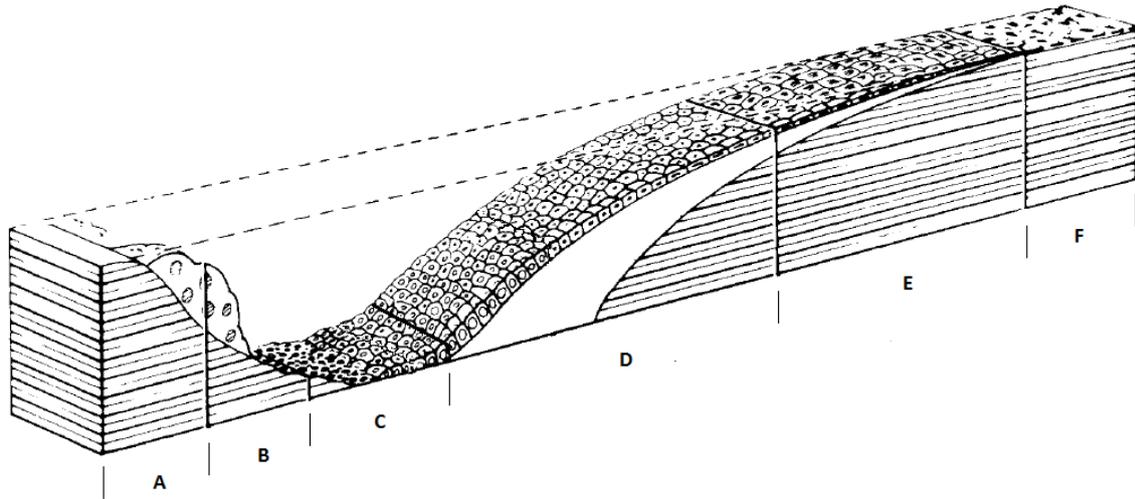


Figure 12 : Représentation schématique tridimensionnelle d'une BMU trabéculaire
(d'après Parfitt (49))

Le diagramme présenté fait apparaître les différentes sections fonctionnelles composant une BMU trabéculaire selon une progression allant de la droite vers la gauche :

- A** : Extrémité de la zone de résorption initiée par les ostéoclastes
- B** : Zone d'élargissement de la zone de résorption
- C** : Zone de transition (« *Reversal Phase* ») tapissée de cellules mononucléées (« *Reversal Cells* »)
- D** : Zone de minéralisation « précoce »
- E** : Zone de minéralisation « tardive »
- F** : Héli-Ostéon complété

Une BMU trabéculaire mesure entre 2 et 3 mm selon son plus grand axe (58) pour une profondeur maximum d'environ 50 μm soit légèrement moins que le rayon d'une BMU corticale ($\sim 80 \mu\text{m}$) (48). La durée complète d'un cycle de remodelage dans l'os trabéculaire est d'environ 200 jours dont 30 à 40 jours attribués à la résorption (59) et environ 150 jours à la formation (60).

4.2.1.3. Organisation du microenvironnement de la BMU : le BRC

Il apparait, depuis la réalisation des travaux de Hauge *et al.* que le contenu des BMU trabéculaires n'est pas en contact direct avec le compartiment hématopoïétique grâce à la présence d'une couche monocellulaire recouvrant la BMU appelée « canopée » (61). La continuité de cette dernière avec les cellules bordantes présentes à la surface de l'os quiescent permet ainsi à la BMU d'être totalement isolée de l'environnement extérieur (**Figure 13**). Ce confinement permet la création d'un microenvironnement directement associé à la BMU facilitant ainsi le contrôle de l'ensemble des sous-processus constituant le remodelage osseux. Il est en effet probable que cet espace clos permette de maintenir localement des concentrations adaptées de médiateurs cellulaires nécessaires au couplage des différentes activités biologiques de la BMU.

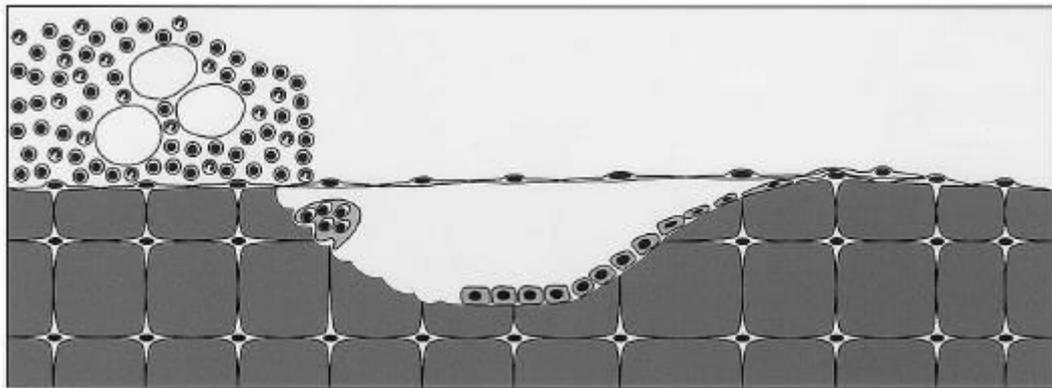


Figure 13 : Représentation schématique de la canopée recouvrant une BMU (61)

Représentation schématique (non à l'échelle) d'une BMU trabéculaire, avec l'ensemble des éléments cellulaires du cycle de remodelage, et isolée au sein de la lacune osseuse par la présence d'une fine couche cellulaire mononucléée d'origine ostéoblastique : la canopée.

Il apparaît également grâce aux travaux de Kristensen *et al.* (47,62) que cet espace est étroitement vascularisé par un réseau de capillaires particulièrement dense au niveau de la canopée. Cette organisation constitue également un élément essentiel du processus de remodelage en permettant l'accès et donc le recrutement des précurseurs cellulaires osseux. L'ensemble structurel représenté par l'association d'une BMU, sa canopée et son réseau capillaire dédié constitue le compartiment de remodelage osseux (« **Bone Remodeling Compartment** »). Il est à noter que le même type d'organisation a été observé au sein de BMU corticales avec toutefois une vascularisation différente (capillaire central en boucle) (48).

4.2.2. Sous-processus 1 : phase d'initiation

La compétence biomécanique de l'os est maintenue dans un état stable tout au long de l'existence d'un os physiologiquement sain uniquement parce que le processus de remodelage ne s'initie qu'à des sites nécessitant le remplacement d'un os ancien ou endommagé. Pour cette raison une étape essentielle du remodelage est la **sélection des sites à renouveler parmi l'ensemble des possibilités offertes au même moment dans le squelette**. L'initiation du remodelage osseux est donc une étape cruciale pouvant être définie comme le passage d'une surface osseuse d'un état quiescent à un état actif. Il a longtemps été considéré que la première étape de cette initiation était représentée par l'activation de la population ostéoclastique. Ceci n'est pas tout à fait correct dans la mesure où aucune cellule ostéoclastique n'est présente à la surface de l'os quiescent (49). Bien que l'activation ostéoclastique soit effectivement un événement précoce du processus de remodelage, la première étape de l'initiation est en réalité représentée par la constitution de la **canopée**. Cet événement, probablement piloté par l'entrée en apoptose d'ostéocytes situés à proximité de zones osseuses détériorées (63,64), va potentiellement induire l'émission de signaux à l'origine du décollement de la couche de cellules mésenchymateuses (47) recouvrant les cellules bordantes quiescentes présentes à la surface de l'os. La dissociation de ces deux couches est visible au moment

de la phase d'initiation du remodelage où l'on peut observer la couche de cellules mésenchymateuses passer par-dessus des ostéoclastes pour ensuite former la canopée recouvrant l'intégralité de la BMU comme illustré sur la **figure 14**. Il est supposé que l'élévation de cette enveloppe mésenchymateuse est provoquée par la transmigration de précurseurs ostéoclastiques (65). Il a été proposé que la constitution du réseau capillaire associé à la canopée coïncide avec la formation de cette dernière et fasse partie intégrante de la phase d'initiation du remodelage osseux (62). Néanmoins, la contribution de ce réseau vasculaire à l'initiation du site de remodelage est toujours en cours d'investigation.

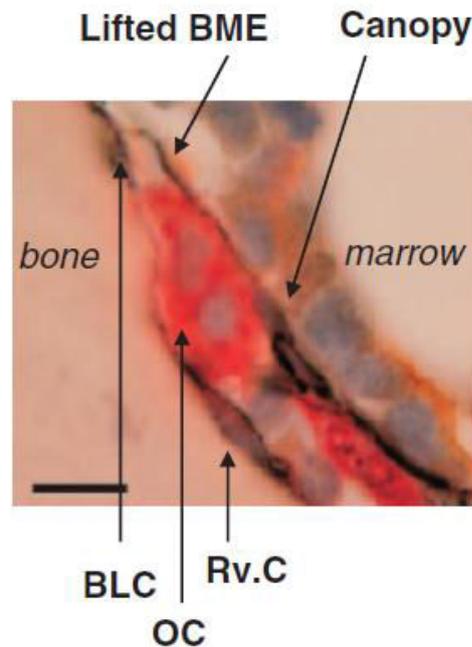


Figure 14 : Coupe transversale au point d'initiation d'une unité de remodelage (40)

L'enveloppe hématopoïétique d'origine mésenchymateuse est soulevée par un ostéoclaste au point d'initiation d'une unité de remodelage osseux.

Abréviations:

BME : bone marrow envelope

BLC : bone-lining cell

OC : osteoclast

Rv.C : reversal cell

4.2.3. Sous-processus 2 : recrutement des précurseurs ostéoclastiques et ostéoblastiques

4.2.3.1. Provenance et attraction des précurseurs ostéoclastiques

Le recrutement des précurseurs ostéoclastiques est un composant crucial du remodelage osseux. En effet, l'absence de cellules inactives ou de précurseurs dans le tissu osseux implique un recrutement extérieur au BRC. Plusieurs hypothèses sont envisageables quant à leur acheminement. L'existence d'un réseau capillaire connecté à la canopée (62) représente une voie potentielle, notamment pour les précurseurs en provenance de la circulation générale (66). La moelle osseuse adjacente aux sites de remodelage représente également une source de précurseurs. Leur migration pourrait se réaliser directement par diapédèse à travers la canopée. Les mécanismes responsables de l'attraction des précurseurs ostéoclastiques restent à ce jour méconnus. Néanmoins, plusieurs facteurs chimiotactiques possiblement impliqués viennent d'être identifiés. Nous pouvons tout d'abord citer **SDF-1 (CXCL12)**, capable d'exercer un effet chémo-attracteur sur des précurseurs ostéoclastiques murins (67) tout comme les trois chémokines **MIP-1 α** , **RANTES** et **MCP-3** (68). Néanmoins, le facteur le plus documenté à ce jour implique un médiateur lipidique : la **sphingosine-1-phosphate (S1P)**. Il a en effet été démontré que la S1P était capable d'exercer sur les précurseurs ostéoclastiques un pouvoir chémo-attracteur (69) ou chémo-répulsif (70) en fonction du récepteur impliqué (respectivement **S1PR1** et **S1PR2**). Les études réalisées *in vivo* démontrent même que le trafic des précurseurs ostéoclastiques serait guidé par le gradient de concentration en S1P existant entre la circulation sanguine (concentration élevée) et les liquides interstitiels (concentration faible). Il a également été observé (*in vitro* et *in vivo*) que la 1,25(OH)₂ VitamineD₃ inhibait l'expression du récepteur S1PR2. Elle augmenterait ainsi la migration des précurseurs ostéoclastiques vers le compartiment sanguin (riche en S1P) et limiterait par ce mécanisme la perte osseuse (71).

4.2.3.2. Provenance et attraction des précurseurs ostéoblastiques

Le recrutement des précurseurs ostéoblastiques est également un élément capital du remodelage osseux. Il a récemment été proposé par Kristensen *et al.* un modèle faisant coexister trois sources potentielles de précurseurs ostéoblastiques acheminés par trois voies différentes (47) (**Figure 15**). Ces trois sources auraient pour finalité de constituer et maintenir la zone de transition pourvoyeuse de précurseurs ostéoblastiques destinés à alimenter la zone de formation (40).

Route 1 : en provenance des cellules bordantes

Hypothèse : les cellules bordantes viendraient coloniser la surface de l'os érodé laissée vacante au moment de la rétraction des ostéoclastes pour constituer la zone de transition qui alimenterait ensuite la zone de formation en précurseurs ostéoblastiques.

Route 2 : en provenance de la canopée

Hypothèse : la canopée contribuerait à l'enrichissement cellulaire observé au niveau de la zone de transition nécessaire à l'induction de la zone de formation.

Route 3 : en provenance du réseau capillaire associé au BRC

Hypothèse : les péricytes associés au réseau capillaire connecté à la canopée seraient susceptibles de contribuer à l'enrichissement cellulaire observé au niveau de la zone de transition.

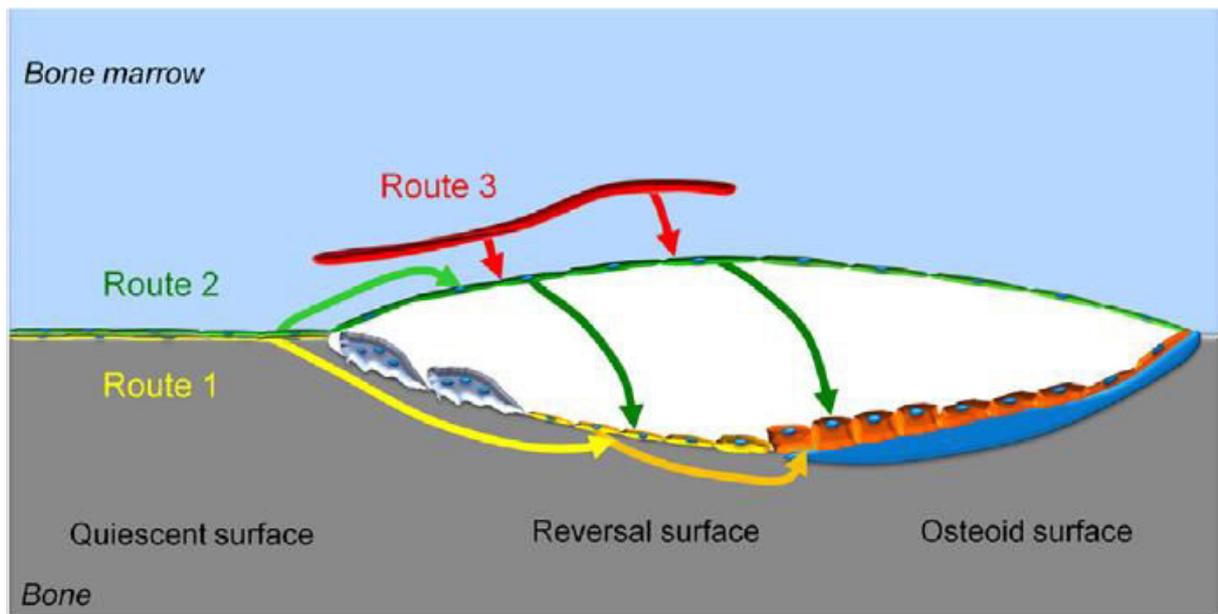


Figure 15 : Représentation schématique du recrutement des précurseurs ostéoblastiques au sein d'un BRC trabéculaire (47)

Les effecteurs cellulaires responsables de la migration des précurseurs ostéoblastiques lors de leur recrutement vers la zone de transition ne sont actuellement pas connus. Néanmoins, un certain nombre de molécules exerçant un effet chimiotactique sur les précurseurs ostéoblastiques ont pu être à ce jour identifiées. Nous pouvons tout d'abord citer le **TGF- β 1**, connu pour être présent en quantité importante dans la MEC et dont le relargage en réponse à une résorption ostéoclastique induit la migration sur site de cellules souches mésenchymateuses (72). C'est également le cas du **Platelet-derived growth factor (PDGF)** qui exerce un effet chémo-attracteur sur des précurseurs ostéoblastiques murins (73). C'est enfin le cas de la **sphingosine-1-phosphate (S1P)** qui *via* ses récepteurs **S1PR1** et/ou **S1PR2** va moduler la migration des précurseurs ostéoblastiques avec des résultats parfois contradictoires (73–76). Il est à noter qu'aucune étude n'a été réalisée afin de déterminer *in vivo* les conséquences d'une altération de la voie de signalisation S1P/S1PR sur la migration des précurseurs ostéoblastiques.

4.2.4. *Sous-processus 3 : différenciation des précurseurs ostéoclastiques et ostéoblastiques*

La différenciation des précurseurs ostéoclastiques et ostéoblastiques recrutés au sein du BRC est un élément essentiel du remodelage osseux. Cette étape est indispensable à l'acquisition des compétences fonctionnelles de la cellule ostéoclastique et ostéoblastique, à savoir la résorption et la formation du tissu osseux.

4.2.4.1. Différenciation ostéoclastique et acquisition des fonctions de résorption

L'ostéoclastogénèse (précédemment décrite dans le § 1.3.2.1.2) va permettre la constitution de cellules différenciées et multinucléées susceptibles d'être incluses dans une unité de remodelage. L'ultime stade de différenciation va être alors représenté par l'acquisition des fonctions de résorption de l'ostéoclaste. Celle-ci va s'effectuer lorsque l'ostéoclaste va entrer en contact direct avec la surface de l'os à détruire. Cette étape va induire :

- la polarisation de la cellule,
- l'organisation de la « *sealing membrane* »,
- la création de la membrane plissée « *ruffled border* »,
- l'organisation du trafic endosomal et lysosomal.

Cette séquence d'évènements semble être déclenchée par le contact de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ avec la matrice minéralisée. Ce récepteur va s'activer en reconnaissant la séquence **Arg-Gly-Asp** de protéines contenues dans la MEC telles que l'**ostéopontine** et la **bone sialoprotein 2** (77). Il va ainsi induire la constitution de podosomes à la périphérie de l'ostéoclaste et contribuer à l'organisation de

la « *sealing membrane* ». Cette dernière va permettre l'adhésion de l'ostéoclaste et la création d'un espace isolé de l'environnement extracellulaire. C'est à l'intérieur de cet environnement que va prendre place l'activité de résorption grâce à la création de la bordure plissée. L'activité de résorption va prendre fin au moment où l'ostéoclaste va entrer en apoptose et ainsi libérer la surface d'os précédemment occupé.

4.2.4.2. Différenciation ostéoblastique et acquisition des fonctions minéralisantes

La différenciation ostéoblastique (précédemment décrite dans le § 1.3.2.2.2) va permettre l'obtention d'une population d'ostéoblastes matures ayant la capacité de réaliser la synthèse et la minéralisation de la MEC. L'acquisition de cette capacité fonctionnelle va, comme pour l'ostéoclaste, s'obtenir au moment où l'ostéoblaste va entrer en contact avec la surface osseuse à reconstruire. Il a en effet été récemment démontré que l'ablation fonctionnelle d'intégrines permettant l'attachement des précurseurs ostéoblastiques à la MEC induisait un défaut de minéralisation (78). Deux autres arguments suggèrent également que cette différenciation s'achève dans le BRC au contact de la zone de formation : les capacités prolifératrices s'atténuent au contact du tissu ostéoïde ; l'expression d'**Osx** s'élève à proximité de la zone de formation (47).

4.2.5. *Sous-processus 4 : couplage des activités ostéoclastiques et ostéoblastiques*

Un élément essentiel nécessaire à la réalisation d'un processus de remodelage équilibré est la nécessité de faire coïncider exactement au sein de chaque BRC la quantité de tissu formé à la taille de la cavité élaborée par les ostéoclastes. Cet impératif n'est possible qu'à la condition d'une **coordination stricte** des activités de résorption et de formation. C'est à cette coordination que fait référence le terme de « **couplage** » lorsqu'il est employé dans le cadre du remodelage osseux. Il existe ainsi de nombreux facteurs participant au couplage des activités du BRC : facteurs de croissance libérés par la MEC, signaux ostéocytaires, médiateurs solubles et membranaires. Ils vont permettre la coordination des activités opposées de résorption et formation et permettre *in fine* la progression du BRC grâce au comblement successif de la zone de tissu osseux détruite.

La première voie de signalisation ayant fait état d'une coopération entre différent type de cellules osseuses est la voie **RANK/RANKL/OPG** (79). Elle fut la première explication moléculaire à un phénomène observé *in vitro* : la différenciation des précurseurs ostéoclastiques nécessite l'intervention d'ostéoblastes (80). Ainsi, il fut proposé que cette voie de signalisation soit responsable de la différenciation des ostéoclastes. Bien que l'implication de cette voie ne fasse désormais plus l'objet d'aucun doute, la question du contributeur majoritaire de RANKL demeure toujours ouverte. Il semblerait en effet que la population ostéoblastique ne soit pas la seule impliquée et que la population ostéocytaire puissent être la principale contributrice (37,38,81) notamment *via* les ostéocytes situés à proximité des zones de microfissures (82).

La voie de signalisation RANK/RANKL/OPG n'est pas la seule voie de communication concourant à la coordination des activités du BRC. En effet, une multitude d'interactions de ce type ont pu être mises en évidence au cours des deux dernières décennies. Ainsi, il a été démontré que l'apoptose des ostéocytes était également susceptible d'induire le recrutement des précurseurs ostéoclastiques *via* la protéine **HMGB1** (*high mobility group box 1*) (83). Il apparaît également que les ostéocytes

exercent un contrôle de l'activité ostéoblastique par l'intermédiaire de la voie Wnt. En effet, il a été mis en évidence *in vivo* que l'expression ostéocytaire de la **sclérostine** (inhibiteur de la voie Wnt) était diminuée en cas d'exposition à des charges mécaniques, favorisant ainsi la formation osseuse (84). Les ostéoclastes vont également contribuer à la régulation de l'activité ostéoblastique. En exerçant leur activité de résorption, ces derniers vont en effet induire le relargage de nombreux facteurs pro-ostéoblastiques emprisonnés dans la MEC (**TGF- β** , **BMPs**, **PDGF**, **FGFs**, **IGFs**) (85). D'autres facteurs similaires vont également être directement produits par les ostéoclastes ; c'est le cas de la **S1P** (86,87), de **Wnt 10b** (87), de **BMP-6** (87), de **CTHRC1** (88), du **C3a** (89), de la **cardiotrophin-1** (90), de **TRAcP** (91) et de l'**Ephrin-B2** (92). Il est probable que la cible de ces facteurs pro-ostéoblastiques soit les précurseurs ostéoblastiques plutôt que les ostéoblastes minéralisants eux-mêmes.

Il apparaît donc que l'ensemble des populations cellulaires du BRC communiquent entre elles afin de coordonner leurs activités *via* une multitude de facteurs de couplage. Leur identification *in vitro* représente à chaque fois une potentielle cible thérapeutique ; néanmoins, seule la validation *in vivo* de leur action permettra d'évaluer leur réelle contribution à ce phénomène.

4.2.6. Synthèse du processus de remodelage osseux

Le remodelage osseux est un processus physiologique unique permettant le maintien de la compétence biomécanique de l'os au cours de la vie d'un individu. Il est rendu possible grâce à une maîtrise totale du microenvironnement au niveau des sites de remodelage. Cette maîtrise est permise grâce à la création d'espaces clos très localisés et hermétiques à l'environnement extérieur. La sécrétion de facteurs de régulation à l'intérieur de ces espaces confinés va ainsi permettre une régulation ciblée du remodelage osseux en limitant l'action potentiellement interférente de facteurs de croissance émis par les cellules hématopoïétiques de l'espace médullaire. L'action séquentielle et coordonnée des différents protagonistes par l'intermédiaire de facteurs locaux et/ou systémiques peut ainsi être très finement régulée. Il en résulte une balance équilibrée entre les activités de résorption et de formation au sein du BRC. Tout déséquilibre de cette balance naturellement neutre est alors susceptible de favoriser la destruction ou la formation osseuse avec des répercussions désastreuses en terme d'augmentation du risque fracturaire ou de syndrome de compression (48). L'ostéoporose constitue la pathologie du tissu osseux la plus fréquemment associée à la perturbation de cet équilibre.

II Ostéoporose

1. Définition

En mars 2000, une conférence de consensus réalisée sous l'égide du NIH (*National Institutes of Health*) s'est tenu avec l'objectif de « clarifier les facteurs associés à la prévention, le diagnostic et le traitement de l'ostéoporose ». Il a ainsi été proposé, afin de répondre à cet objectif, d'adresser 5 questions à un comité d'expert afin d'établir des réponses consensuelles permettant *in fine* une meilleure prise en charge de cette pathologie. Il a ainsi été posé la question suivante : « **qu'est-ce que l'ostéoporose et quelles sont ses conséquences ?** ». La réponse élaborée a ainsi permis de redéfinir cette pathologie et de faire évoluer la définition proposée en 1993 (93). L'ostéoporose a donc été définie comme étant « *une maladie du squelette caractérisée par une diminution de la résistance osseuse prédisposant à un risque fracturaire élevé, le terme de résistance osseuse faisant ici tout aussi bien référence à la densité de l'os qu'à sa qualité* » (94).

Cette définition, avec l'emploi du terme « résistance », fait directement référence à la compétence biomécanique de l'os et à sa capacité à résister à un choc. Elle précise également les contours de ce terme en incluant les notions de densité et de qualité osseuse. Ainsi, il est défini lors de cette même conférence que la **densité osseuse** correspond à la quantité de minéral présente dans le tissu osseux. La **qualité de l'os** fait, quant à elle, référence aux propriétés intrinsèques de ce tissu représentées par (94) :

- sa microarchitecture,
- sa capacité de renouvellement,
- la qualité de sa minéralisation,
- la quantité et la nature d'éventuels dommages subis (ex. micro-fractures).

D'un point de vue plus fonctionnel, l'ostéoporose est donc une pathologie responsable d'une fragilité osseuse accrue susceptible d'entraîner la survenue de fractures, même lors de traumatismes à faible cinétique. La fragilisation du squelette n'étant pas un phénomène douloureux, l'expression clinique de l'ostéoporose repose donc sur la survenue de fractures conséquentes à cet état de fragilisation. Une des conséquences de cet aspect est donc l'inexistence de critères cliniques permettant l'évaluation du risque fracturaire. Ainsi, la compétence biomécanique (c'est à dire la résistance) du tissu osseux ne va pouvoir être déterminée que sur la base d'examens paracliniques. Parmi les examens paracliniques disponibles, un seul est actuellement inclus par l'Organisation Mondiale de la Santé (**OMS**) en tant que critère diagnostique de l'ostéoporose : il s'agit de l'absorption bi-photonique aux rayons X (**DXA** pour *Dual energy X-ray Absorptiometry*). Cet examen permet de déterminer la densité minérale osseuse (**DMO**) en mesurant la quantité de substance minérale présente au site étudié. Cette quantité est ensuite rapportée à la surface (ou volume) de la zone évaluée et aboutit à l'expression d'un résultat en g/cm² (ou g/cm³). Afin de s'affranchir de la variabilité inhérente aux calibrations effectuées sur différents types d'appareils, le résultat de DMO obtenu est normalisé sur une population de référence. La DMO suivant chez le jeune adulte une distribution Gaussienne, cette normalisation va s'effectuer sur l'écart-type (ET) de cette distribution selon la formule ci-après. Le résultat obtenu va être nommé le **T-score**.

$$\text{T-Score} = \frac{DMO_{\text{patient}} - DMO_{\text{référence}}}{ET_{\text{référence}}}$$

Quatre catégories ont ainsi été proposées par l'OMS (puis révisées par l'*International Osteoporosis Foundation*) pour interpréter les résultats obtenus au moyen de cette technique chez la femme post-ménopausée (95,96) :

Normalité :	T-Score ≥ -1
Ostéopénie :	T-Score < -1 et $> -2,5$
Ostéoporose :	T-Score $\leq -2,5$
Ostéoporose sévère :	T-Score $\leq -2,5$ en présence d'une ou plusieurs fractures de fragilité

Cette interprétation est proposée pour les mesures réalisées au niveau de la hanche. Il est recommandé d'utiliser comme référence les valeurs issues de la **NHANES III** (*National Health and Nutrition Examination Survey*) chez les femmes âgées de 20 à 29 ans (96). Il n'existe pas de recommandations officielles émanant de l'OMS pour l'interprétation des DMO mesurées sur d'autres sites anatomiques ainsi que dans d'autres populations que la femme post-ménopausée. Il est néanmoins d'usage d'utiliser les mêmes seuils dans ces cas de figure en dépit du fait que la prédiction en terme de risque fracturaire associé ne soit pas identique (97). Des ajustements ont ainsi été proposés par l'**ISCD** (*International Society for Clinical Densitometry*) (98) et les recommandations des sociétés savantes quant à leur utilisation font régulièrement l'objet de réactualisations avec parfois des conclusions différentes, notamment au niveau des sites anatomiques à évaluer (99,100).

2. Epidémiologie

2.1. Epidémiologie de l'ostéoporose densitométrique

L'ostéoporose est un problème de santé publique majeur comme l'attestent les dernières estimations de prévalence réalisées aux Etats-Unis à partir des données densitométriques issues de la NHANES 2005-2010. En effet, il a été estimé qu'en 2010, **10,3%** de la population américaine de plus de 50 ans (ne vivant pas en institution) souffrait d'ostéoporose, l'ostéopénie concernant quant à elle **43,9%** de cette même population. Ainsi, en cumulant ces deux prévalences, il a été donc estimé qu'environ **54 millions** d'américains de plus de 50 ans présentaient une densité minérale osseuse insuffisante (101). En se basant sur les projections d'évolution de la population américaine, **17,2 millions** de personnes supplémentaires (+32%) devraient être concernées en 2030 (101).

Cette même étude nous permet également d'apprécier l'importance du sex-ratio clairement en défaveur de la population féminine du fait de l'accélération de la perte osseuse liée à la carence œstrogénique provoquée par la ménopause. En effet, alors que l'ostéoporose ne concerne que **4,3%** de la population masculine de plus de 50 ans, cette prévalence atteint **15,4%** pour les femmes du même âge. Il en est de même pour la prévalence de l'ostéopénie (qui n'est pas une maladie) qui atteint respectivement **35,2%** et **51,4%** des populations masculine et féminine de plus de 50 ans. La prévalence de l'ostéoporose augmente avec l'âge quel que soit le sexe concerné et il existe des disparités en fonction de l'origine ethnique de la population concernée. L'ensemble des données est présenté dans le **tableau 2**.

	Total Population, N	OP Prevalence ^a % (SE)	OP, N (95% CI) ^b	LBM Prevalence ^a % (SE)	LBM, N (95% CI) ^b
Both Sexes					
Total Population	99,048,838	10.3 (0.37)	10.2 (9.4,10.9)	43.9 (0.72)	43.4 (42.0,44.8)
<i>Age</i>					
50–59	41,962,930	5.1 (0.60)	2.2 (1.7,2.6)	40.2 (1.12)	16.9 (16.0,17.8)
60–69	29,253,187	8.0 (0.87)	2.3 (1.8,2.8)	43.6 (1.18)	12.8 (12.1,13.4)
70–79	16,595,961	16.4 (0.94)	2.7 (2.4,3.0)	47.3 (1.41)	7.9 (7.4,8.3)
80+	11,236,760	26.2 (1.59)	2.9 (2.6,3.4)	52.9 (2.22)	5.9 (5.5,6.4)
<i>Race/Ethnicity^c</i>					
NH-White	75,272,609	10.2 (0.47)	7.7 (7.0,8.4)	44.9 (0.89)	33.8 (32.5,35.1)
NH-Black	9,830,977	4.9 (0.65)	0.5 (0.4,0.6)	29.7 (1.51)	2.9 (2.6,3.2)
Mexican American	4,595,535	13.4 (1.10)	0.6 (0.5,0.7)	43.2 (1.41)	2.0 (1.9,2.1)
Women					
Total Population	53,151,456	15.4 (0.63)	8.2 (7.5,8.9)	51.4 (0.93)	27.3 (26.3,28.3)
<i>Age</i>					
50–59	21,506,008	6.8 (0.83)	1.5 (1.1,1.8)	49.3 (1.69)	10.6 (9.9,11.3)
60–69	15,323,140	12.3 (1.44)	1.9 (1.5,2.3)	53.4 (1.54)	8.2 (7.7,8.6)
70–79	9,169,601	25.7 (1.56)	2.4 (2.1,2.6)	51.8 (1.70)	4.7 (4.4,5.1)
80+	7,152,707	34.9 (2.44)	2.5 (2.2,2.8)	52.7 (3.07)	3.8 (3.3,4.2)
<i>typoRace/Ethnicity^c</i>					
NH-White	40,089,289	15.8 (0.81)	6.3 (5.7,7.0)	52.6 (1.17)	21.1 (20.2,22.0)
NH-Black	5,534,149	7.7 (1.10)	0.4 (0.3,0.5)	36.2 (2.03)	2.0 (1.8,2.2)
Mexican American	2,371,091	20.4 (1.70)	0.5 (0.4,0.6)	47.8 (2.33)	1.1 (1.0,1.2)
Men					
Total Population	45,897,382	4.3 (0.40)	2.0 (1.6,2.3)	35.2 (0.93)	16.1 (15.3,17.0)
<i>Age</i>					
50–59	20,456,922	3.4 (0.68)	0.7 (0.4,1.0)	30.7 (1.78)	6.3 (5.6,7.0)
70–79	7,426,360	5.0 (0.78)	0.4 (0.3,0.5)	41.8 (2.51)	3.1 (2.7,3.5)
80+	4,084,053	10.9 (1.7)	0.4 (0.3,0.6)	53.1 (2.82)	2.2 (1.9,2.4)
<i>Race/Ethnicity^c</i>					
NH-White	35,183,320	3.9 (0.39)	1.4 (1.1,1.6)	36.0 (1.13)	12.7 (11.9,13.4)
NH-Black	4,296,828	1.3* (0.40)	0.1 (0.02,0.1)	21.3 (1.75)	0.9 (0.8,1.1)
Mexican American	2,224,444	5.9 (1.08)	0.1 (0.1,0.2)	38.3 (2.55)	0.9 (0.7,1.0)

^a Prevalence from NHANES 2005–2010 has been adjusted to the age, sex, and race/ethnic distribution of the US population at the time of the 2010 Census using the direct method.

^b Count expressed in millions; 95% CI=95% confidence limits

^c Other races not shown separately

* may be statistically unreliable, standard error/percent is 31–39% or sample size is < 30

OP = osteoporosis; LBM= low bone mass; NH= non-Hispanic

Tableau 2 : Estimation du nombre de résidents américains atteints d’ostéoporose ou d’ostéopénie densitométrique au niveau du col du fémur ou du rachis lombaire en 2010 (101)

En France, il a été estimé qu'en 2010, parmi la population âgée de plus de 50 ans, environ **3,48 millions** de personnes souffraient d'ostéoporose (T-Score $\leq -2,5$ au niveau du col du fémur) (102). Cette importante prévalence, également constatée pour l'ensemble des pays européens, a pour conséquence d'augmenter considérablement la survenue de fractures liées à cet état et d'impacter gravement la qualité ainsi que l'espérance de vie des personnes atteintes.

2.2. Epidémiologie des fractures ostéoporotiques

C'est la survenue de fractures ostéoporotiques qui fait toute la gravité de la maladie. Une fracture survient lorsqu'une force appliquée à un os est supérieure à sa résistance. L'ostéoporose, en diminuant les compétences biomécaniques du tissu osseux, a donc pour conséquence d'augmenter le risque de survenue de fracture dite de fragilité, survenant après un traumatisme à faible cinétique (ex. une chute de sa hauteur) qui en temps normal n'entraîne pas de fracture. C'est ce qui fait toute la différence avec les fractures dites traumatiques. Ainsi, pour l'année 2010, il a été estimé qu'en France, **377 000** fractures étaient la conséquence d'un état ostéoporotique (102). L'ensemble de ces fractures était réparti de la façon suivante :

- **Hanche** : ~ 74 000
- **Vertèbres** : ~ 56 000
- **Avant-bras** : ~ 56 000
- **Autres** (pelvis, côtes, humérus, tibia, fibula, clavicule, scapula, sternum et autres fractures fémorales) : ~ 191 000

Le capital osseux diminuant avec l'âge, la population la plus exposée au risque fracturaire lié à l'ostéoporose se trouve donc également être la population la plus exposée au risque de chute. En effet, la baisse d'acuité visuelle, la polymédication (psychotropes), les troubles locomoteurs, neuromusculaires et autres pathologies neurodégénératives sont autant de facteurs augmentant le risque de chute chez la personne âgée. Ainsi, la survenue de fractures ostéoporotiques est très souvent synonyme de morbidité et de mortalité associée très importantes, notamment en cas de fractures dites « sévères » (extrémité supérieure et diaphyse fémorale, extrémité supérieure de l'humérus, vertèbres, pelvis, sacrum). Il a été évalué *via* l'indice **QALYs** (*Quality adjusted life years*) que 139 400 années de « qualité de vie » étaient perdues en France, en 2010, à cause de l'ostéoporose (102). Quant à la mortalité, il a été déterminé au Royaume-Uni que **22%** des patients ayant été hospitalisés pour une fracture de la hanche sont décédés dans l'année suivante (103). Enfin, tout comme pour la prévalence de l'ostéoporose densitométrique, les projections à l'horizon 2025 prévoient une augmentation d'environ **30%** du nombre de fractures ostéoporotiques annuelles ce qui portera en France ce nombre de fractures à **491 000** (102).

2.3. Evaluation financière de la prise en charge des fractures ostéoporotiques

Comme nous avons pu le voir ci-dessus, l'importante prévalence de l'ostéoporose densitométrique est responsable d'une forte incidence de fractures sévères chez le sujet de plus de 50 ans. Les morbidités et mortalités associées à ce type de fracture étant très importantes, les coûts engendrés pour leur prise en charge sont par conséquent très élevés. Il a ainsi été estimé qu'elles étaient responsables en France, pour l'année 2010, d'une dépense d'environ 4 853 millions d'euros (102).

3. Etiologies et Physiopathologie

Il est possible de distinguer deux types d'ostéoporoses : l'ostéoporose dite « primitive », liée à l'âge et l'ostéoporose dite « secondaire » constituée par toutes les autres causes d'ostéoporose ne correspondant pas à une évolution naturelle et physiologique du squelette humain.

3.1. Ostéoporose primitive

L'ostéoporose « primitive » correspond à l'ostéoporose liée à l'âge. Elle survient de façon quasi-inévitable chez tout individu pour peu qu'il ait une espérance de vie suffisamment importante. La diminution de la résistance mécanique de l'os est donc un processus dégénératif que l'on peut considérer comme une évolution « naturelle » et seul le délai de passage à un état pathologique va différer d'un individu à l'autre. De nombreux facteurs vont conditionner l'âge de survenue de cet état comme par exemple l'importance du capital osseux acquis lors de l'enfance et de l'adolescence. En effet, l'âge de passage d'une DMO en dessous du seuil diagnostique de l'ostéoporose densitométrique est lié à l'importance du pic atteint à la fin de la seconde décennie de vie (104). Il a ainsi été évalué (*in silico*) qu'un pic de DMO 10% supérieur à la moyenne retardait de 13 années la survenue d'ostéoporose chez un adulte (105). La ménopause est l'autre facteur essentiel à prendre en compte dans le délai d'apparition d'une DMO insuffisante. A l'origine du sex-ratio nettement en défaveur de la population féminine, la chute brutale des sécrétions œstrogéniques provoque chez la femme une diminution supplémentaire de la DMO venant se surajouter à celle déjà provoquée par le vieillissement (**Figure 16**).

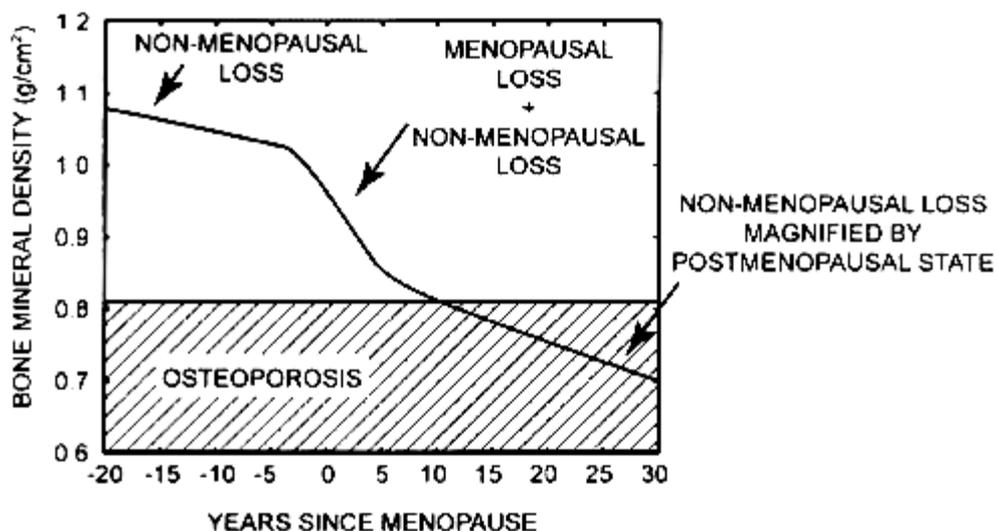


Figure 16 : Diagramme théorique illustrant l'accélération de perte osseuse en lien avec la ménopause (105)

Afin de mieux visualiser dans son ensemble les variations physiologiques de la masse osseuse chez l'homme et la femme au cours de la vie, la **figure 17** représente les mesures de densité osseuse volumétriques réalisées par *Quantitative Computed Tomography (QCT)* au niveau de l'extrémité du radius (constitué à 95% d'os cortical) et au niveau de la colonne vertébrale (constituée à 80% d'os trabéculaire) sur une population âgée de 20 à 97 ans.

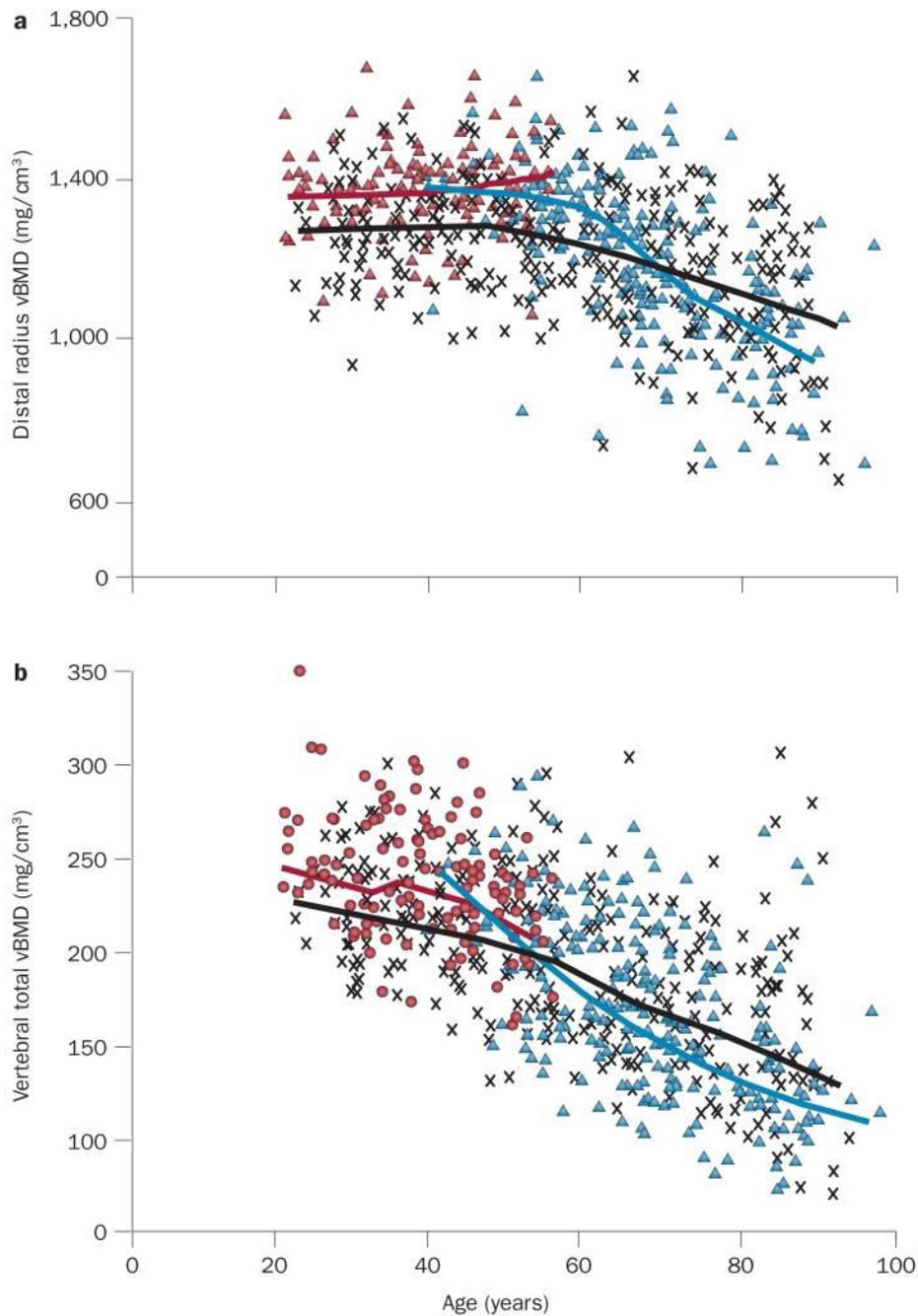


Figure 17 : Evolution de la DMO corticale et trabéculaire au cours de la vie (106)

Mesures densitométriques osseuses (mg/cm³) réalisées au niveau du radius (a) et de la colonne vertébrale (b) dans une population âgée de 20 à 97 ans. Les mesures effectuées dans la population féminine sont représentées en **rouge** pour femmes non ménopausées et en **bleu** après la ménopause. Les mesures réalisées dans la population masculine sont quant à elles représentées en **noir**.

En plus des deux facteurs principaux évoqués précédemment, d'autres éléments vont également influencer l'âge de survenue d'une ostéoporose densitométrique. Ainsi, des différences liées à l'origine ethnique s'observent dans les études de prévalence de l'ostéoporose densitométrique. En effet, aux Etats-Unis, les populations d'origine Africaine présentent une prévalence moindre que les populations Caucasiennes qui elles-mêmes sont moins touchées que les populations d'origine Sud-Américaine (101,107–109). L'activité physique va également impacter de façon importante le capital osseux d'un individu. La baisse de stimulation mécanique va avoir un impact délétère sur la résistance du tissu osseux comme cela a pu être observé chez l'homme à l'issue de vols orbitaux prolongés (110). Le tabagisme a également été associé à un risque accru de survenue de fractures ostéoporotiques (111).

3.2. Ostéoporose secondaire

L'ostéoporose dite « secondaire » correspond aux différentes causes d'ostéoporoses ne relevant pas d'une évolution naturelle du squelette humain. Il existe de très nombreuses causes d'ostéoporose secondaire, parmi celles-ci nous allons brièvement décrire celles en rapport avec un trouble endocrinien ainsi que l'ostéoporose associée aux surcharges en fer.

3.2.1. Ostéoporose liée à un trouble endocrinien

3.2.1.1. Hyperparathyroïdie primaire et secondaire

L'hyperparathyroïdie, qu'elle soit d'origine primaire ou secondaire, va induire une augmentation du remodelage osseux *via* une augmentation de la sécrétion de parathormone. Cette sécrétion, qu'elle soit appropriée ou non, va ainsi provoquer lorsqu'elle est prolongée la mobilisation du calcium contenu dans le tissu osseux. Cette mobilisation va être obtenue grâce à l'augmentation de la résorption ostéoclastique, probablement de manière indirecte *via* l'intervention des ostéoblastes (112). Elle va aboutir à une dégradation de l'os et être à l'origine d'une baisse de DMO. Ainsi la prévalence de l'ostéoporose est estimée entre 39 et 62,9% chez les patients atteints d'hyperparathyroïdie primaire (113); quant aux patients insuffisants rénaux (principale cause d'hyperparathyroïdie secondaire), la survenue de fractures est estimée pour être 2 à 14 fois plus importante que dans la population générale (114).

3.2.1.2. Hyperthyroïdie

L'hyperthyroïdie est également une source d'élévation du « *turn-over* osseux » et va induire une augmentation du nombre de sites de remodelage. Les cycles de remodelage vont également être réduits et un déséquilibre entre résorption et formation va s'installer, engendrant une perte osseuse nette d'environ 10% par cycle. En conséquence, une hyperthyroïdie va induire une baisse de DMO et une augmentation du risque fracturaire. L'ostéoporose sévère associée à une hyperthyroïdie non traitée est désormais quelque chose de rare. Néanmoins, il a été démontré qu'une l'hyperthyroïdie non diagnostiquée était chez les patients hospitalisés pour fracture un important facteur de risque d'ostéoporose secondaire. De plus, des études de population ont mis en évidence que la thyrotoxicose augmentait le risque fracturaire, particulièrement chez la femme post-ménopausée (115).

3.2.1.3. Hypercortisolisme

Le syndrome de Cushing est une maladie endocrinienne caractérisée par une exposition inappropriée à de hautes concentrations en cortisol produit par les glandes surrénaliennes. Cette production inadaptée peut être la conséquence d'un adénome hypophysaire corticotrope, d'une sécrétion ectopique d'ACTH ou encore d'une surproduction surrénalienne autonome (116). La survenue de fractures de fragilité est une complication fréquente de cette pathologie en dépit de la faible diminution de densité minérale osseuse associée (117). Ceci est peut-être la conséquence du mécanisme physiopathologique particulier de cette ostéoporose généralement considérée comme étant provoquée par une diminution de l'activité ostéoblastique (118). Il a en effet été montré *in vitro* que les glucocorticoïdes diminuaient la différenciation des CSM vers la lignée ostéoblastique (119) et qu'ils inhibaient la différenciation ostéoblastique en impactant de façon négative la voie de signalisation Wnt/ β -caténine (120). De plus, il a récemment été constaté que la canopée recouvrant

le BRC était altérée de façon prématurée chez 1/3 des patient souffrant d'hypercortisolisme (121). Tout comme dans le syndrome de Cushing, l'ostéoporose cortico-induite consécutive à la prise prolongée de glucocorticoïdes est responsable d'une augmentation du risque fracturaire importante (prévalence estimée entre 30 à 50% des patients traités de façon chronique (118)). Bien que les fractures puissent survenir en début de traitement, leur incidence est reliée à la dose et la durée d'exposition au traitement (122).

3.2.1.4. Hypogonadisme

Les situations d'hypogonadisme ne se rencontrent pas uniquement en situation physiologique de ménopause chez la femme ou de vieillissement chez l'homme. Elles se rencontrent également chez des sujets plus jeunes lors de situations pathologiques et les conséquences sur la résistance du tissu osseux sont les mêmes. Ainsi chez la jeune fille, l'ensemble des causes d'hypogonadisme hypo et hypergonadotrope sont associées à une diminution de la densité minérale osseuse (123). Il en est de même chez la femme adulte en cas d'insuffisance ovarienne précoce (124). Les conséquences de l'hypogonadisme non physiologique sont moins documentées chez l'homme. Néanmoins, il apparait qu'à âge équivalent, l'hypogonadisme est également associé à une baisse de la DMO (125). Que cela soit chez l'homme ou chez la femme, les hypogonadismes d'origine iatrogène sont également une cause de perte osseuse et doivent dans certains cas bénéficier d'une prise en charge spécifique (126).

3.2.1.5. Anorexie

L'anorexie est connue pour avoir un profond impact sur le métabolisme osseux à la fois chez les adultes et chez les adolescents. En effet, environ 92% des adultes atteints présentent au minimum une ostéopénie et une ostéoporose est constatée dans environ 38% des cas à au moins un site. Cette prévalence est moins importante chez les adolescents. Cependant, il est estimé qu'environ 50% des adolescentes anorexiques présentent au minimum une ostéopénie (127). Cette ostéopénie d'origine multifactorielle est en lien avec l'ensemble des modifications endocriniennes liées à cette pathologie. Ainsi l'hypogonadisme, la baisse d'IGF-1 circulant et la relative hypercortisolémie associée à cet état nutritionnel sont autant de facteurs favorisant la baisse de densité minérale osseuse observée (127).

3.2.2. Ostéoporose associée aux surcharges en fer

L'ostéoporose est une complication des surcharges en fer survenant tout aussi bien au cours de l'hémochromatose génétique (HG) que lors de surcharges secondaires (thalassémie, drépanocytose). Longtemps attribuée à l'hypopituitarisme engendré par la survenue de dépôts ferriques hypophysaires, il apparaît dorénavant que l'accumulation de fer puisse être un facteur indépendant à l'origine d'une baisse de DMO. Cette cause d'ostéoporose secondaire sera revue en détail ultérieurement lors du [Chapitre IV « Fer et Ostéoporose »](#).

4. Synthèse

La revue des différentes étiologies de l'ostéoporose fait apparaître qu'en dépit d'une expression clinique commune (la survenue de fractures de fragilité), les mécanismes physiopathologiques conduisant à la baisse de résistance osseuse sont divers et variés. Il en résulte des profils d'altération osseuse variés, différents pour chaque étiologie et associés à un risque fracturaire spécifique. Ainsi, il n'existe pas une mais des ostéoporoses et la compréhension des mécanismes cellulaires impliqués dans chaque processus physiopathologique est d'une importance capitale pour le développement d'un arsenal thérapeutique adapté à la prise en charge spécifique de chacune d'entre elles.

III Métabolisme du fer et situations de surcharge

1. Métabolisme du fer

1.1. Généralités

Le fer est un élément chimique faisant partie de la sous-famille des éléments de transition. Il est l'un des métaux les plus abondants sur Terre et sa capacité unique à se comporter comme accepteur ou donneur d'électrons en a fait un élément irremplaçable dans le monde du vivant. Il va ainsi être associé à de nombreuses protéines et contribuer à leur activité biologique grâce à ses caractéristiques intrinsèques. De par ses propriétés physico-chimiques, ce métal est peu soluble dans le cytosol et les liquides biologiques. Aussi, lorsqu'il n'est pas lié à des protéines, il va se retrouver sous une forme chimique réactive et devenir délétère pour les tissus environnants en générant des espèces réactives de l'oxygène (**ROS**) hautement toxiques. Ainsi est résumée toute l'ambivalence de ce métal : bien que toxique, il n'en demeure pas moins indispensable aux processus biologiques fondamentaux. En conséquence, les organismes ont su mettre en place des moyens permettant de limiter sa toxicité tout en le rendant accessible pour une utilisation physiologique. Il en résulte des mécanismes de régulation complexes, étroitement contrôlés et basés sur un ensemble de protéines capables de stabiliser et lier le fer de façon réversible.

1.2. Distribution du fer dans l'organisme

La quantité totale de fer présente dans l'organisme Humain est comprise entre 3 et 4 grammes dont plus des deux tiers est intégré au sein de l'hémoglobine présente dans les érythrocytes. Le tiers restant est réparti de la façon suivante :

- ~ **1000 mg** sont au sein des hépatocytes (lié à la ferritine),
- ~ **600 mg** sont contenus dans les macrophages du système réticulo-endothélial,
- ~ **300 mg** sont présents dans les muscles intégrés dans la myoglobine,
- ~ **8 mg** représentent l'intégralité du pool intracytoplasmique contenu dans diverses protéines et enzymes,
- ~ **1 à 2 mg** sont présents dans le plasma sous forme liée à la transferrine.

1.3. Cycle du fer dans l'organisme

1.3.1. Besoins quotidiens en fer

Le fer n'est pas produit par l'organisme ; en conséquence, celui-ci doit être apporté par l'alimentation. Sur les 10 à 20 mg ingérés chaque jour, seulement 10% sont absorbés par la muqueuse duodénale (~ **1 à 2 mg/j**) et suffisent à compenser les pertes incompressibles dues à la desquamation cellulaire, intestinale et cutanée. Néanmoins, cet apport journalier est insuffisant pour répondre à la demande en fer générée par l'érythropoïèse (~ **20 mg/jour**). C'est l'action des macrophages (en particulier spléniques) qui va combler cette demande grâce au recyclage du fer hémérique contenu dans le pool érythrocytaire sénescant.

1.3.2. Recyclage du fer érythrocytaire

Les macrophages vont, au cours du processus d'érythrophagocytose, dégrader les molécules d'hème au moyen d'hèmes oxygénases et libérer le fer ferreux inorganique (Fe^{2+}). Le fer ainsi recyclé va pouvoir, en fonction des besoins, être stocké dans la cellule au sein d'une molécule de ferritine, ou bien remis en circulation dans le plasma à un taux correspondant globalement à la demande engendrée par l'érythropoïèse (128). Pour cela, le fer va être exporté *via* un transporteur membranaire (**ferroportine**), ré-oxydé en fer ferrique (Fe^{3+}) par la céruloplasmine circulante dans le plasma, puis se lier à la transferrine (129). La balance journalière ferrique est résumée de façon schématique dans la **figure 18** ci-après.

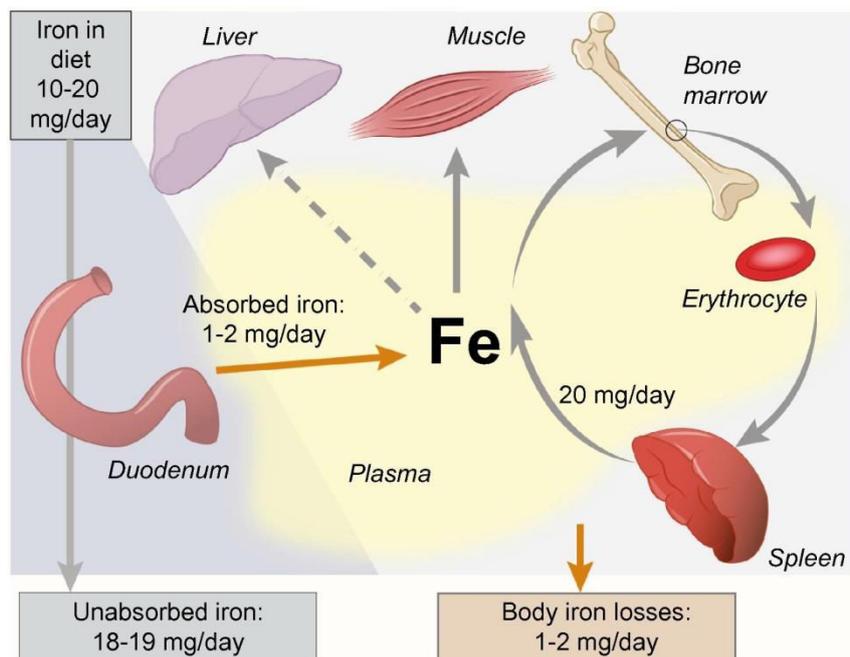


Figure 18 : Représentation schématique de la balance ferrique journalière (130)

1.3.3. Absorption intestinale du fer

L'absorption du fer alimentaire est principalement effectuée au niveau du duodénum et de la partie haute du jéjunum (131). Afin de maintenir le pool de fer présent dans l'organisme, la quantité de fer alimentaire absorbée au niveau intestinal doit être équivalente à celle éliminée par l'organisme chaque jour. Chez l'Homme, aucun mécanisme de contrôle ne permet de réguler les pertes en fer de l'organisme. En conséquence, le maintien de l'homéostasie du fer est dépendant de la régulation intestinale de son absorption (132,133). Pour atteindre la circulation systémique, le fer alimentaire doit traverser les membranes apicales et basolatérales des entérocytes. Deux types de fer sont susceptibles d'être assimilés et les mécanismes de franchissement de la membrane apicale entérocytaire vont différer en fonction de leur intégration ou non dans une molécule d'hème.

1.3.3.1. Fer non-héminique

Pour franchir la lumière apicale, le fer non-héminique (principalement sous forme ferrique Fe^{3+}) doit préalablement être réduit par une ferriréductase : **DCYTB** (*duodenal cytochrome b*) (134). Il va pouvoir ainsi être pris en charge par le transporteur membranaire **DMT1** (*divalent metal transporter 1*) et franchir la membrane apicale de l'entérocyte (135).

1.3.3.2. Fer héminique

Le franchissement apical du fer héminique fait intervenir (bien que cela reste discuté) le transporteur spécialisé de l'hème **HCP1** (*heme carrier protein 1*). L'hème va ensuite être dégradé au niveau intracellulaire par une hème oxygénase qui va libérer du fer ferreux (Fe^{2+}).

Une fois à l'intérieur de l'entérocyte, le fer ferreux (Fe^{2+}) intégré va être pris en charge par un mécanisme peu connu puis exporté à travers la membrane basolatérale grâce à la ferroportine. Après cet export, le fer ferreux va être ré-oxydé *via* une ferroxidase membranaire, l'**héphaestine**, afin d'être pris en charge par la transferrine. L'ensemble des mécanismes d'absorption entérocytaire du fer sont représentés dans la **figure 19**.

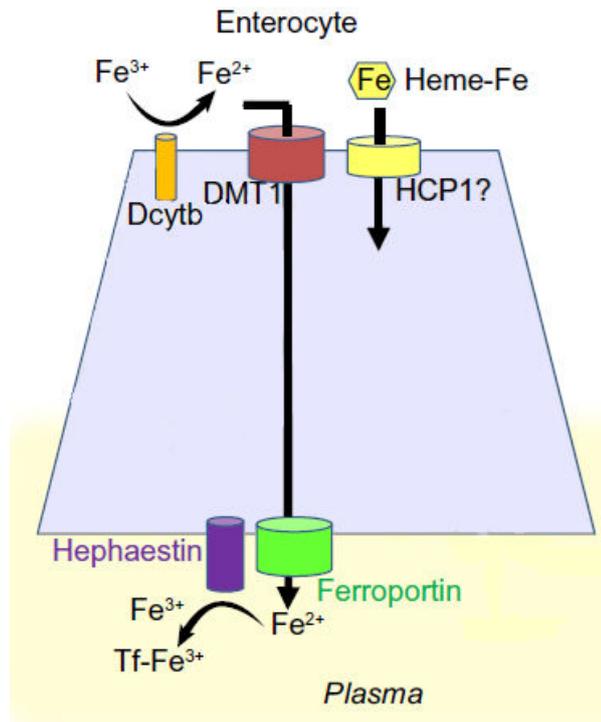


Figure 19 : Représentation schématique des mécanismes entérocytaires d'absorption du fer (d'après (130))

1.3.4. Circulation plasmatique du fer

Le fer n'est pas un élément soluble dans le plasma. De par sa susceptibilité à générer des espèces réactives de l'oxygène, il ne peut ni circuler, ni être stocké sous forme libre dans l'organisme. Dans le compartiment sanguin, le fer plasmatique est ainsi physiologiquement pris en charge par la transferrine à raison de 2 atomes de fer ferrique (Fe^{3+}) par molécule. Toutes les molécules de transferrine circulantes ne sont pas porteuses de fer et la détermination de leur saturation peut être

évaluée par le calcul du coefficient de saturation de la transferrine (**CST**). Cette saturation va ainsi être influencée par : l'apport alimentaire en fer, la quantité de fer recyclé par les macrophages du système réticulo-endothélial et la quantité de fer consommée par l'érythropoïèse et les autres tissus. En situation normale, le CST est compris entre 20 et 45 % et un CST inférieur à 15 % indique la présence d'un déficit plasmatique en fer. Un CST supérieur à 45 % peut faire évoquer la présence d'un trouble du métabolisme du fer pouvant favoriser le développement d'une surcharge en fer. Quand la CST dépasse les 45 %, une nouvelle espèce de fer fait son apparition dans le plasma : le fer non lié à transferrine (**NTBI** pour *Non-Transferrin Bound Iron*) (136). Celui-ci est en fait lié aux groupements carboxyliques de l'albumine ou à de petits acides organiques type citrate ou acétate ; il va néanmoins présenter des caractéristiques biologiques bien différentes du fer lié à la transferrine. Il va notamment montrer un tropisme préférentiel pour les cellules parenchymateuses et tout particulièrement les hépatocytes (137,138). Quand le CST est supérieur à 75 % une forme particulière de fer non lié à la transferrine, appelée fer labile plasmatique (**LPI** pour *labile Plasma Iron*) va faire son apparition. Ce type de fer, parfois dénommé « *reactive plasma iron* », est caractérisé par sa capacité à produire des espèces réactives de l'oxygène et donc une importante toxicité cellulaire.

1.3.5. Régulation cellulaire du fer

1.3.5.1. Incorporation cellulaire et utilisation

La mise à disposition du fer pour les cellules consommatrices fait principalement intervenir le récepteur membranaire de la transferrine de type 1 (**TfR1**) permettant l'incorporation du fer lié à la transferrine par endocytose (139). Une fois à l'intérieur du compartiment endosomal, le fer ferrique (Fe^{3+}) libéré de la transferrine va devoir à nouveau être réduit par **STEAP3** pour traverser la membrane endosomale *via* **DMT1** et ainsi rejoindre le cytoplasme. Le fer ainsi présent dans le

compartiment cytoplasmique va alors incorporer de façon transitoire un pool labile de fer (140) avant d'être associé à des protéines cytosoliques ou d'être adressé à la mitochondrie *via* la **mitoferrine** (141,142). Une fois à l'intérieur de la mitochondrie, le fer va être majoritairement utilisé pour la biosynthèse de molécules hémiques (principalement l'hémoglobine) et de protéines fer-souffre.

1.3.5.2. Stockage intracellulaire

Le fer intracellulaire non immédiatement incorporé dans une voie métabolique peut rester dans le cytosol sous une forme non toxique grâce à l'action de la ferritine. Cette protéine constituée de 24 sous-unités (de deux types H et L) va en effet former une « coquille » capable de contenir en son sein environ 4500 atomes de fer sous forme ferrique (Fe^{3+}). La ferritine constitue ainsi le pool de stockage du fer intracellulaire (143). La ferritine est également retrouvée dans le plasma. Sa concentration est un reflet, plus ou moins précis, de la charge en fer tissulaire ; néanmoins, il est peu probable qu'elle joue un rôle significatif dans le transport plasmatique du fer.

1.3.5.3. Coordination de la régulation intracellulaire

L'incorporation, l'utilisation, le stockage et le transport du fer intracellulaire sont étroitement contrôlés et coordonnés grâce à l'action d'un mécanisme de régulation post-transcriptionnel appelé système **IRE/IRP** (*Iron Responsive Element / Iron Responsive Protein*). Un certain nombre de protéines du métabolisme du fer contiennent dans leur ARNm une ou plusieurs séquences IRE dans leurs régions non traduites (**UTR** ; *Untranslated Transcribed Region*). Ces séquences, dites « en épingles à cheveux » (« *Hairpin structure* »), constituent un site de liaison pour des protéines IRP (**IRP1** et **IRP2**), disponibles pour se lier sur les séquences IRE lorsque la cellule est en manque de fer (144). L'interaction IRE/IRP va inhiber la traduction des ARNm de protéines telles que la ferritine et la

ferroportine *via* leur séquence IRE localisée en 5'-UTR. A l'inverse, l'interaction IRE/IRP va stabiliser les ARNm du récepteur à la transferrine de type 1 et de DMT1 grâce à la présence d'une séquence IRE dans leur zone 3'-UTR. Ainsi, en situation de carence cellulaire en fer, les principales protéines intervenant dans le trafic du fer sont régulées de façon à contrecarrer cette carence. Le système IRE/IRP fonctionne également en cas d'excédent en fer en réduisant la fixation des IRP sur les séquences IRE, ce qui aboutit à l'exacte régulation opposée. Les principes de régulation du système IRE/IRP sont résumés dans la **figure 20**.

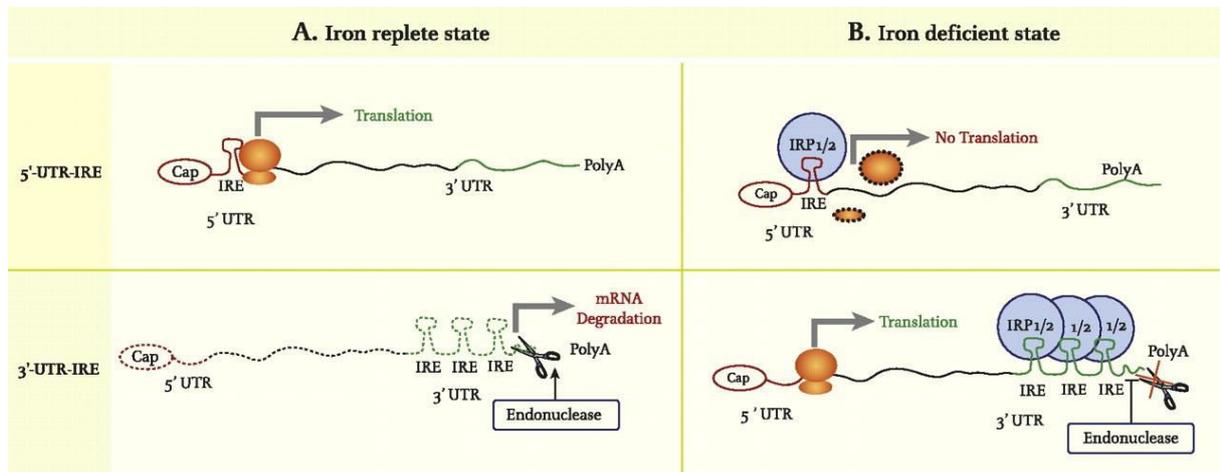


Figure 20 : Représentation schématique des mécanismes de régulation IRE/IRP d'après (145)

A. Etat d'excès de fer : les protéines IRP ne sont pas capables de se lier aux séquences IRE

Conséquences :

- 5'-UTR-IRE : augmentation de la traduction
- 3'-UTR-IRE : dégradation de l'ARNm

B. Etat de carence en fer : les protéines IRP se lient aux séquences IRE

Conséquences :

- 5'-UTR-IRE : diminution de la traduction
- 3'-UTR-IRE : stabilisation de l'ARNm

1.3.6. Elimination du fer

Une faible fraction du fer (~1 à 2 mg) est éliminée de l'organisme chaque jour au travers de plusieurs mécanismes non spécifiques. Ainsi, l'exfoliation intestinale, la desquamation cutanée, la transpiration, l'urine, la bile et les menstruations chez la femme engendrent une perte incompressible de cet élément. Il est généralement admis que le corps humain n'est pas capable de réguler ses sorties en fer. En conséquence, toute modification de la balance ferrique ne peut être adaptée par le contrôle des sorties. De ce fait, le corps humain est particulièrement sensible à toute modification positive de sa balance en fer et présente naturellement une susceptibilité au risque de surcharge en fer.

1.4.Régulation du fer dans l'organisme

1.4.1. L'hepcidine : hormone peptidique régulatrice du fer

L'absorption intestinale du fer représente un point critique de la régulation systémique de ce métal qui permet de prévenir dans une certaine mesure les risques de déficit ou d'excès. Cette tâche complexe est assurée par l'**hepcidine** (gène *HAMP*), une hormone peptidique d'origine hépatique dont la synthèse est régulée par plusieurs constantes biologiques telles que l'hypoxie, l'anémie, l'érythropoïèse, la disponibilité du fer et l'inflammation.

L'hepcidine exerce son action biologique en se liant à la ferroportine membranaire. Elle va induire la phosphorylation, l'internalisation et enfin la dégradation lysosomale de cette dernière (146). La ferroportine est l'unique exportateur cellulaire du fer chez les mammifères (147). La baisse de son expression entérocytaire et macrophagique sous l'effet de l'hepcidine va donc diminuer la quantité de fer absorbée au niveau intestinal et celle libérée par le système réticulo-endothélial. L'hepcidine est donc un régulateur négatif du fer plasmatique dans l'organisme. Les niveaux d'hepcidine vont s'élever en cas d'augmentation des concentrations en fer de l'organisme afin de prévenir tout risque de surcharge en limitant la quantité de fer biodisponible dans le plasma et son absorption digestive du fait de la dégradation de la ferroportine (148). La régulation inverse est également vraie en cas de carence ou d'augmentation des besoins en fer. Le mode d'action et les principes de régulation des concentrations en fer de l'organisme par l'hepcidine sont schématisés dans la **figure 21**.

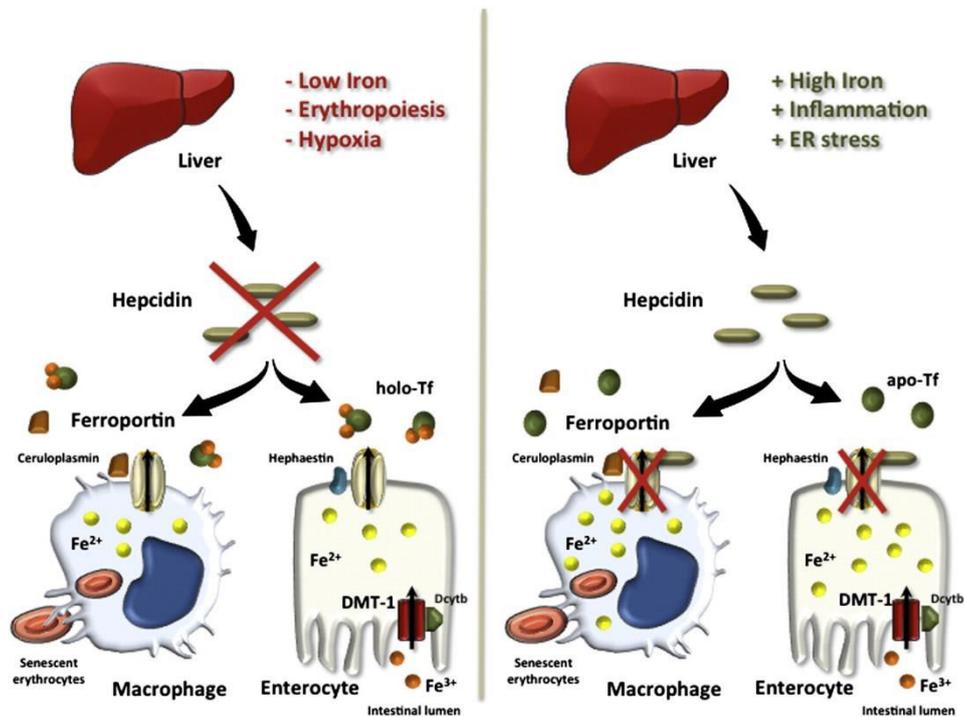


Figure 21 : Représentation schématique des modes et principes de régulation des concentrations en fer de l'organisme par l'hepcidine (131)

1.4.2. Mécanismes cellulaires de régulation de l'hepcidine par le fer

Les études cliniques chez l'homme et *in vivo* chez la souris ont mis en évidence que l'expression d'hepcidine était modulée par les concentrations hépatiques et systémiques en fer. Les données expérimentales suggèrent d'ailleurs un mécanisme cellulaire de régulation différent pour chacune de ces sources de fer. Ainsi, il est admis que l'expression d'hepcidine est régulée par le fer hépatique *via* la voie de signalisation **BMP6/SMAD** tandis que le fer circulant exerce son action via le complexe **HFE/TfR2** (131).

1.4.2.1. Concentration hépatocytaire en fer et régulation de l'hepcidine

Le fer hépatique va induire l'expression d'hepcidine *via* une voie de signalisation faisant intervenir les **BMPs** (*Bone Morphogenetic Proteins*). Parmi l'ensemble des BMPs connues, **BMP6** est la plus à même d'être impliquée dans la régulation de l'hepcidine. Par un mécanisme inconnu, l'expression de BMP6 va être augmentée par le fer contenu dans l'hépatocyte et va former un complexe avec les récepteurs BMPRI et II et l'hémojuvéline (**HJV**). Ce complexe va ensuite induire la phosphorylation intracellulaire des SMAD1, SMAD5 et SMAD8 qui vont alors interagir avec SMAD4. L'ensemble va être transloqué dans le noyau et se lier avec deux séquences situées sur le promoteur de l'hepcidine et ainsi activer sa transcription (149,150). Le modèle évoqué ci-dessus est représenté schématiquement dans la **figure 22**.

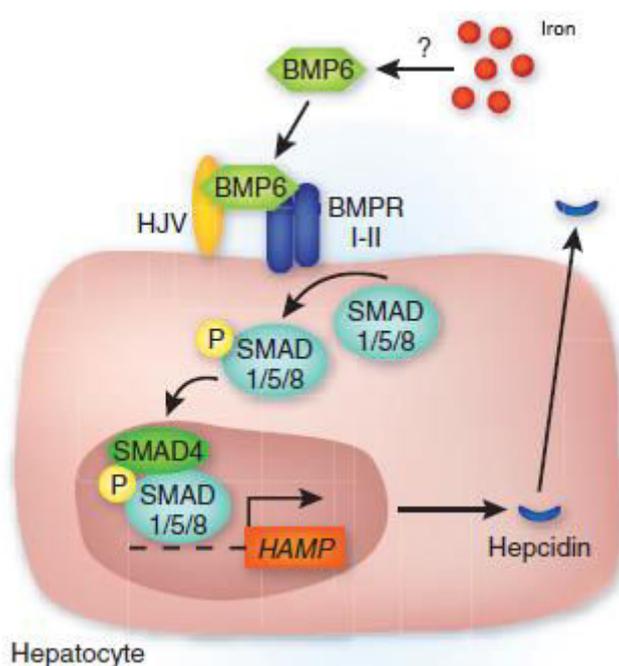


Figure 22 : Représentation schématique du mode de régulation de l'hepcidine par le fer hépatocytaire (151)

1.4.2.2. Concentration systémique en fer et régulation de l'hepcidine

La régulation de l'hepcidine par le niveau de saturation de la transferrine est probablement contrôlée par la protéine **HFE** et les récepteurs de la transferrine 1 et 2, capables de percevoir les changements de saturation en fer de la transferrine. Le modèle actuellement établi fait l'hypothèse que le TfR1 séquestre la protéine HFE et empêche son interaction avec TfR2 nécessaire à l'induction d'hepcidine. Ainsi, lorsque la saturation de la transferrine augmente, l'holotransferrine (transferrine chargée en fer) va libérer HFE et autoriser son interaction avec TfR2 provoquant l'augmentation de la synthèse d'hepcidine (152). Le modèle cité ci-dessus est représenté schématiquement dans la **figure 23**.

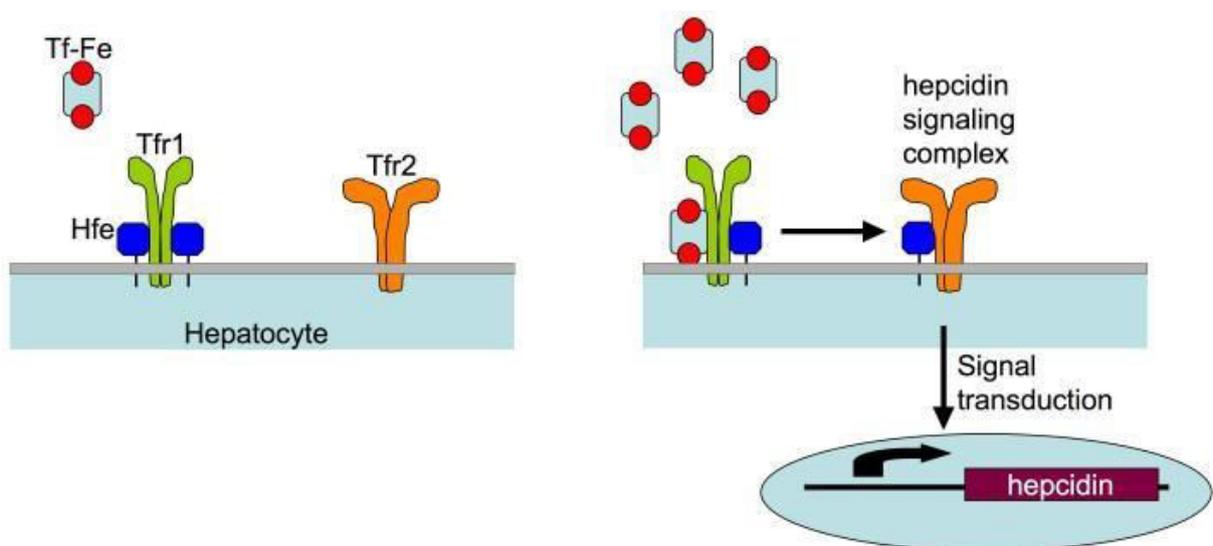


Figure 23 : Représentation schématique du mode de régulation de l'hepcidine par le fer plasmatisque (152)

1.4.3. Autres mécanismes cellulaires principaux de régulation de l'hepcidine

L'inflammation est également un régulateur positif de l'expression hépatique de l'hepcidine. La voie de signalisation impliquée est celle de l'IL-6/STAT3. Sécrétée au cours de la réponse inflammatoire, l'interleukine 6 (**IL-6**) se lie à son récepteur situé sur la membrane hépatocytaire. Il s'ensuit une phosphorylation de STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*). Le facteur de transcription STAT3 phosphorylé migre vers le noyau, se fixe sur le promoteur du gène de l'hepcidine et déclenche sa transcription.

A l'inverse, l'expression de l'hepcidine est réprimée lorsque les demandes en fer sont augmentées lors de situations entraînant une accélération de l'érythropoïèse (ex. hypoxie, anémie, hémolyse). Cette régulation négative ferait intervenir un facteur érythropoïétique, l'érythroferrone (**ERFE**), dont la synthèse, réalisée par les précurseurs érythroblastiques, est induite par l'érythropoïétine (**EPO**) (153). Ainsi libérée dans le plasma, l'érythroferrone agirait directement sur les hépatocytes et induirait une régulation négative de la synthèse d'hepcidine. Le mécanisme reste encore à être précisé.

Enfin, la synthèse d'hepcidine étant principalement hépatocytaire, toute insuffisance hépatocellulaire est susceptible d'entraîner une hepcidino-déficiencia.

2. Situations de surcharge en fer

Les pathologies de surcharge en fer peuvent être définies comme un ensemble d'affections dont la caractéristique commune est l'accumulation progressive, par l'organisme, de quantités importantes de fer à l'origine de dommages tissulaires. Les surcharges en fer sont classiquement subdivisées en deux groupes :

- les surcharges en fer **génétiques**,
- les surcharges en fer **secondaires**.

2.1. Surcharges en fer génétiques

Les hémochromatoses génétiques (**HG**) sont des surcharges en fer viscérales dont le développement est sous-tendu par la survenue de mutations dans un ou plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme du fer précédemment évoqué. Il existe plusieurs types d'HG en fonction du gène impliqué. Leur classification est présentée dans le **tableau 3** ci-après :

Type HG	Gène	Chr	Trait	Début	Phénotype
HFE (Type 1)	<i>HFE</i>	6p21,3	AR	Tardif	Articulaire et hépatique
Hémojuvénile (Type 2A)	<i>HJV</i>	1p21	AR	Précoce	Cardiaque et endocrinien
Hepcidine (Type 2B)	<i>HAMP</i>	19q13,1	AR	Précoce	Cardiaque et endocrinien
Récepteur 2 de la Tf (type 3)	<i>TFR2</i>	7q22	AR	Tardif	Hépatique
Maladie de la ferroportine (type 4B) (Type 4A)	<i>SLC40A1</i> Idem	2q32 Idem	AD Idem	Tardif Idem	Articulaire et hépatique Rare (surcharge en fer macrophagique) STF normale

HG : hémochromatose génétique ; Chr : chromosome ; AR : autosomique récessif ; AD : autosomique dominant ; Tf : transferrine ; STF : saturation de la transferrine.

Tableau 3 : Classification des hémochromatoses génétiques (154)

Il est également possible de classer les HG en deux catégories en fonction du mécanisme sous-tendant le développement de la surcharge génétique en fer :

- **Hepcidino-déficience** :
 - Déficit quantitatif : type I (*HFE*) ; type 2A (*HJV*) et 2B (*HAMP*) ; Type 3 (*TFR2*)
 - Résistance à l'action de l'hepcidine : Type 4B (*SLC40A1*)

- **Maladie de la ferroportine** : perte de fonction de la ferroportine : Type 4A (*SLC40A1*)

2.1.1. Hémochromatose lié au gène HFE (type1)

L'hémochromatose de type 1 en lien avec le gène *HFE* est de loin la forme la plus fréquente des HG et l'homozygotie pour la mutation p.Cys282Tyr (C282Y) explique à elle seule 90% de cette dernière. L'atteinte du gène *HFE* va provoquer un défaut de synthèse hépatocytaire d'hepcidine et entraîner une élévation des concentrations plasmatiques en fer et de la saturation en transferrine. Le fer non lié à la transferrine (**NTBI**) et sa forme réactive (**LPI**) vont ainsi faire leur apparition. Leur tropisme pour les cellules parenchymateuses du foie, du cœur et d'autres glandes endocrines va être à l'origine de l'expression clinique de la maladie. La présence de dépôts de fer au sein de ces différents organes va alors être responsable d'atteintes hépatiques, de diabète insulino-dépendant et d'hypogonadisme. Le stress oxydant facilité par la genèse d'espèces réactives de l'oxygène (**ROS**) que le fer induit est impliqué dans ces lésions. Il est également très souvent fait état d'atteintes osseuses et articulaires à l'origine d'ostéoporose et d'arthrose. Les patients présentent également souvent une hyperpigmentation de la peau ainsi qu'une asthénie chronique. La prévalence de la mutation p.Cys282Tyr dans la population caucasienne est d'environ 10 % à l'état hétérozygote et la présence d'une homozygotie touche environ 3 personnes / 1000. La pénétrance de cette pathologie est très incomplète et bien que les présentations cliniques sévères soient rares, la pénétrance

biologique est quant à elle élevée (155). En cas d'expression clinique de la maladie, celle-ci est plutôt tardive et survient souvent à partir de 40 ans chez l'homme et 50 ans chez la femme.

2.1.2. Hémochromatose juvénile (type 2)

L'hémochromatose de type 2, dite juvénile, peut être liée à des mutations du gène *HJV* (hémoujuvéline ; forme **2A**) ou du gène *HAMP* (hepcidine ; forme **2B**). Cette forme se caractérise par une apparition précoce du tableau d'hepcidino-déficience, chez l'adolescent et l'adulte jeune (moins de 30 ans) et par la prédominance des atteintes cardiaques et endocriniennes (155).

2.1.3. Hémochromatose de type 3

L'hémochromatose de type 3 est en rapport avec des mutations du gène *TFR2* (Récepteur à la transferrine de type 2). Elle survient en règle générale chez l'adulte, mimant une hémochromatose de type 1 car elle est liée à une hepcidino-déficience, mais peut aussi survenir chez le sujet jeune et présenter un tableau proche de l'hémochromatose juvénile (155).

2.1.4. Hémochromatose de type 4

L'hémochromatose de type 4 implique la survenue de mutations au sein du gène *SLC40A1* codant la ferroportine. Elle est la seule forme de surcharge en fer héréditaire à transmission dominante et peut être subdivisée en deux sous-groupes distincts. Cette séparation basée sur la conséquence fonctionnelle de la mutation va ainsi distinguer les mutations « perte de fonction d'export du fer » (type **4A**) des mutations « gain de fonction d'export du fer » (type **4B**) (130). Le tableau clinique de ces présentations ne va pas être semblable du fait des mécanismes

physiopathologiques différents. Alors que l'hémochromatose de type 4B va être très proche de celle de type 1 du fait de l'hepcidino-résistance induite par les mutations en cause, l'hémochromatose de type 4A va quant à elle se présenter avec un tableau clinique bien particulier lié au défaut d'export cellulaire du fer normalement permis par la ferroportine. Ce dernier va entraîner une rétention macrophagique du fer et l'imagerie par résonance magnétique va principalement mettre en évidence une surcharge en fer splénique. A cela va s'ajouter un profil biologique particulier avec hyperferritinémie et normalité (ou baisse) du taux de saturation en transferrine. L'hémochromatose de type 4A est le type de surcharge en fer génétique le plus fréquent après le type 1.

2.1.5. Autres surcharges génétiques en fer

Il est à noter qu'il existe en plus des HG évoquées ci-dessus d'autres causes de surcharge en fer d'origine génétique. Ces présentations, exceptionnelles, sont provoquées notamment par des mutations au sein des gènes suivants : *CP* (céruleoplasmine) ; *TF* (transferrine) ; *SLC11A2* (DMT1) (130).

2.1.6. Synthèse

Les HG comprennent donc un groupe hétérogène de pathologies pouvant parfois différer dans leur présentation clinique en fonction du gène impliqué. L'ensemble des mécanismes physiopathologiques conduisant à la survenue des HG est résumé dans la **figure 24**.

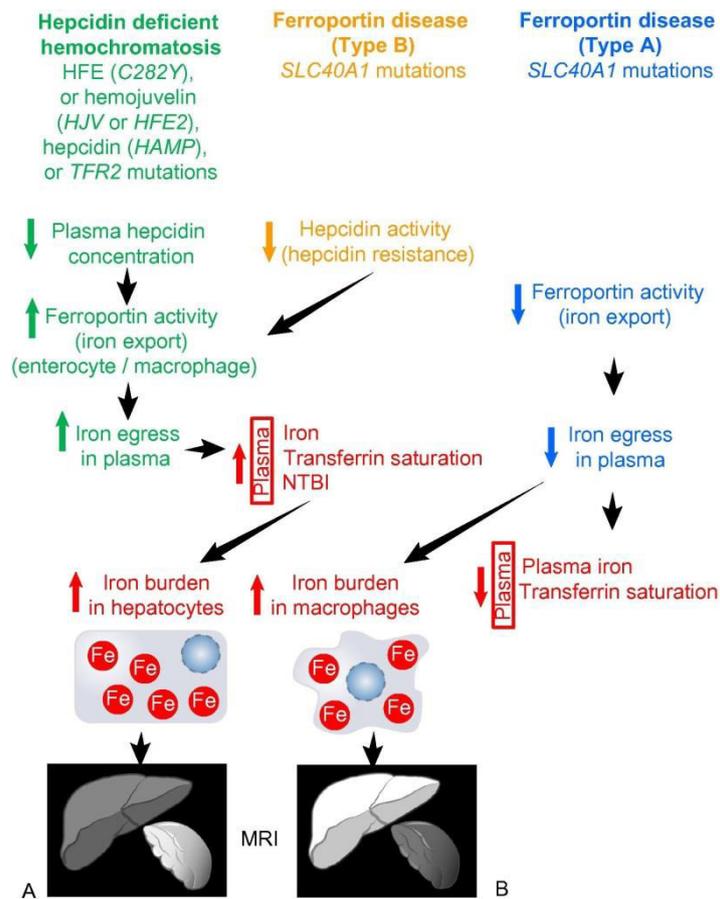


Figure 24 : Représentation schématique des bases physiopathologiques des HG (130)

Légende : MRI = *magnetic resonance imaging*

Blanc : pas de surcharge en fer

Gris clair : surcharge en fer modérée

Gris foncé : surcharge en fer importante

2.2.Surcharges en fer secondaires

Il existe d'autres situations pouvant conduire à une accumulation de fer aussi importante que celles observées dans les HG. Parmi les plus causes les plus fréquentes de surcharge secondaire on peut citer les **hémoglobinopathies**. Bien que ces pathologies soient également héréditaires, l'accumulation en fer n'est pas liée à une anomalie du métabolisme du fer : elle est la conséquence de la pathologie sous-jacente. Ainsi les surcharges en fer sont une complication très fréquente des syndromes thalassémiques et drépanocytaires, nécessitant parfois une prise en charge spécifique.

2.2.1. Origines de la surcharge en fer

L'accumulation de fer observée dans les hémoglobinopathies est la résultante de trois mécanismes plus ou moins impliqués en fonction de la pathologie :

2.2.1.1. Hémolyse

L'hémolyse constitutionnelle provoquée par ces hémoglobinopathies est à l'origine d'un relargage important de fer héminique. Ainsi, en cas d'hémolyse chronique, le « *turn-over* » habituel du recyclage du fer va s'accroître et le CST va être augmenté et entraîner l'apparition de NTBI une fois la saturation de la transferrine supérieure à 45 % (156).

2.2.1.2. Hyperabsorption digestive du fer

L'existence d'une érythropoïèse inefficace va paradoxalement entraîner une hepcidino-déficience du fait de l'anémie, de l'hypoxie et de l'élévation de l'activité érythropoïétique due à la surproduction d'EPO. Cette baisse paradoxale des concentrations en hepcidine va provoquer une hyperabsorption digestive du fer alimentaire en dépit de la surcharge en fer plasmatique et tissulaire (157,158). Ce mécanisme est probablement à l'origine des surcharges en fer constatées chez les patients thalassémiques ne nécessitant pas de transfusion sanguine.

2.2.1.3. Transfusion

La réalisation de transfusions régulières chez les patients souffrant d'hémoglobinopathies est également une source majeure d'apport en fer. Ainsi, 1 mL de culot globulaire apporte environ 1,08 mg de fer et un an de transfusions régulières chez un patient thalassémique représente un apport total d'environ 9 g de ce métal (156).

2.2.2. Répercussions cliniques des surcharges en fer secondaires

Tout comme dans le cas des HG, les surcharges en fer secondaires aux hémoglobinopathies sont responsables de complications liées à l'apparition de fer non lié à la transferrine. Celles-ci sont comparables à celles observées dans les HG et des dépôts de fer sont également observés dans le foie, le cœur, le pancréas ainsi que d'autres glandes endocrines. Ainsi, les surcharges en fer des β -thalassémies majeures sont responsables de nombreuses complications endocriniennes telles que les aménorrhées secondaires, l'hypogonadisme, le développement pubertaire incomplet et le diabète de type I (159). La plupart de ces complications sont prévenues par la prise en charge appropriée des

surcharges en fer au moyen de chélateurs (159) ce qui ne semble pas être le cas des ostéoporoses associées aux thalassémies (160,161). Chez les patients atteints de drépanocytose, les complications liées à l'excès de fer sont plutôt d'ordre hépatique (162) mais tout comme chez les patients thalassémiques, la prévalence d'une densité minérale osseuse basse est également importante chez ces patients (163,164).

IV Fer et ostéoporose

Qu'elles soient d'origine primaire ou secondaire, les surcharges en fer ont toujours été associées à la survenue d'une baisse de DMO. Historiquement, cette perte osseuse était attribuée à l'hypogonadisme engendré par la surcharge en fer. Toutefois, à l'inverse de la plupart des complications générées par les excès de fer, il semble que la meilleure prise en charge de ces pathologies n'ait pas eu d'impact significatif sur la perte osseuse. La persistance d'atteintes osseuses en absence d'hypogonadisme suggère que le fer puisse être un facteur de risque indépendant d'ostéoporose. Les données cliniques, associées à l'ensemble des études *in vivo* et *in vitro*, laissent supposer que le fer puisse avoir un impact direct sur l'homéostasie du tissu osseux. Ces différents éléments vont être présentés dans le chapitre suivant.

1. Ostéoporose et situations de surcharges en fer chronique

1.1. Surcharge en fer d'origine génétique

La baisse de DMO des patients souffrant d'HG a été décrite bien avant la mise en évidence du caractère génétique de la maladie (165–167). Cette perte osseuse était cependant attribuée à la présence de dépôts ferriques pituitaires (168,169) provoquant un hypogonadisme hypogonadotrope très fréquemment observé à cette époque (~ 2/3 des patients) (170). Actuellement, le diagnostic d'HG est réalisé à un stade beaucoup plus précoce de la maladie et la réévaluation contemporaine de l'hypogonadisme ne fait état que d'une prévalence de 6,4% chez les hommes et 5,2% chez les femmes (171). Alors que cette complication endocrinienne tend à disparaître avec l'amélioration de la prise en charge des patients, la prévalence de l'ostéoporose (T score <-2,5), estimée entre **25,3** et **34,2 %** (172–174), reste bien supérieure à celle observée dans la population générale (**10,3%** de la

population américaine de plus de 50 ans (101)). L'examen attentif des études réalisées chez les patients souffrant d'HG nous indique que l'ostéoporose observée dans ce contexte présente des caractéristiques bien particulières. En effet, l'étude réalisée par Guggenbuhl *et al.* (173) sur une cohorte de patients hémochromatosiques non traités (n = 38), tous homozygotes pour la mutation C282Y du gène *HFE*, nous permet de mesurer que l'écart en terme de prévalence avec la population générale est encore bien plus élevé. En effet, la population hémochromatosique étudiée correspond ici à une tranche de la population normalement épargnée par l'ostéoporose. Exclusivement masculine et relativement jeune (âge moyen : 50,8 ans ± 7,9), cette population présente malgré tout **34,2%** de patients ostéoporotique. A titre de comparaison, la prévalence de l'ostéoporose dans la population masculine américaine âgée de 50 à 59 ans n'est que de **3,4%** (101) (*cf. tableau 2*). Il en est de même pour l'ostéopénie (T-score <-1) constatée chez **78,9%** de ces mêmes patients et évaluée à **30,7%** dans la population évoquée ci-dessus. Au-delà de cette considérable différence de prévalence, il est important de noter que **76,9%** des patients ostéoporotiques de cette étude ne présentaient pas d'hypogonadisme. De plus, il n'a été relevé aucune différence significative de testostéronémie entre les groupes ostéoporotique et non ostéoporotique. Néanmoins, les patients hémochromatosiques hypogonadiques présentaient des T-Score significativement plus bas que les patients eugonadiques. Ainsi, bien que l'hypogonadisme soit un facteur aggravant, ces résultats tendent à prouver qu'il ne peut expliquer à lui seul la baisse de DMO fréquemment constatée chez les patients souffrants d'HG. Ainsi, l'importante prévalence de patients ostéoporotiques ne peut être uniquement expliquée par la survenue d'un hypogonadisme. L'étude réalisée par Valenti *et al.* (174) aboutit aux mêmes conclusions sur une cohorte de patients hémochromatosiques plus importante (n = 87) mais moins bien définie sur le plan génétique. Dans cette étude, **25,3%** des patients (hommes et femmes) présentaient une ostéoporose ; à titre de comparaison la prévalence dans la tranche de population américaine équivalente n'est que de **5,1%** (101) (*cf. tableau 2*). Bien que la présence d'un hypogonadisme ou d'une situation de ménopause soit significativement plus fréquente chez les patients ostéoporotiques de cette étude, cette caractéristique n'a pas été identifiée comme étant un

facteur de risque. De plus, 69% des patients présentant une surcharge en fer sans hypogonadisme associé étaient atteints à minima d'ostéopénie. Au total, ces deux études suggèrent une probable contribution directe du fer sur la baisse de DMO. Ceci est notamment étayé par la mise en évidence une corrélation négative entre ferritine et DMO du rachis lombaire pour l'une (174) et entre concentration hépatique en fer et DMO de la tête fémorale pour l'autre (173).

1.2. Surcharge en fer secondaires

1.2.1. Thalassémies

Tout comme pour les patients atteints d'HG, l'atteinte osseuse des patients thalassémiques est une complication connue depuis longtemps (175–177). La baisse de DMO est également un phénomène très fréquent, présent dans toutes les formes de thalassémies, qu'elles nécessitent ou non la réalisation de transfusions régulières (161,178,179). Ainsi, une ostéopénie est retrouvée chez 50 à 74% des enfants et adolescents porteurs de ce syndrome (161). L'implication du fer sur la perte osseuse est moins évidente chez ces patients que dans les HG car l'hypogonadisme reste une complication fréquemment associée à la baisse de DMO constatée (161,178). Néanmoins, les hormonothérapies substitutives mise en place chez les patients hypogonadiques restent apparemment sans effet sur la DMO (161,178). Une seule étude a jusqu'à présent été réalisée sur une série de patients thalassémiques peu hypogonadiques (4,2%). La prévalence de l'ostéopénie reste toujours aussi importante (76% des patients étudiés) et les auteurs suggèrent un lien étiologique avec la surcharge en fer dans la mesure où la totalité des patients présentaient des concentrations hépatiques en fer importantes (180).

1.2.2. Drépanocytose

La baisse de densité minérale osseuse des patients drépanocytaires est également une complication connue et bien documentée (181–186). Tout comme pour l’HG ou les syndromes thalassémiques, la prévalence à minima d’une ostéopénie (T Score <-1) est relativement élevée. Elle est estimée sur de petites séries entre 32 et 72% en fonction des études (184–186). Les causes de cette ostéopénie semblent multifactorielles et cette dernière est parfois imputée à la survenue d’infarctus osseux (186). Néanmoins des liens entre fer et ostéopénie ont été mis en évidence dans cette pathologie. Ainsi Sarrai *et al.* (164) ont observé des ferritinémies plus élevées chez les patients drépanocytaires adultes souffrant d’ostéopénie ou d’ostéoporose. De plus, la quasi-totalité des patients ayant une surcharge en fer avérée étaient atteints à minima d’ostéopénie. Il est à noter qu’aucun patient de cette cohorte ne présentait d’hypogonadisme. Sadat-Ali *et al.* (163) ont également observé au sein de leur cohorte que les patients drépanocytaires ayant des concentrations sériques en fer élevées étaient plus fréquemment atteints d’ostéopénie.

1.3. Surcharge en fer physiologique

Comme nous avons pu le voir précédemment, l’élévation de la ferritinémie est fréquemment associée à une baisse de DMO dans les situations de surcharge en fer chronique (164,174). De façon naturelle, les concentrations sanguines de cette protéine s’élèvent chez la femme de façon importante après la ménopause (187). Cette observation a donc conduit certains auteurs à penser que l’élévation du stock en fer entraînée par la ménopause puisse contribuer à l’ostéoporose induite par cet état physiologique (188). Cette hypothèse a ainsi été investiguée lors de plusieurs études et a abouti aux résultats suivants :

i) les sujets de plus de 40 ans (homme et femme) présentant les concentrations en ferritine les plus élevées (4^{ème} quartile) montrent une accélération significative de leur perte osseuse (au niveau fémoral) en comparaison des sujets du 1^{er} quartile (189) ;

ii) les femmes de plus de 45 ans présentent des ferritinémies inversement corrélées aux valeurs de DMO mesurées au niveau du rachis lombaire et de la tête fémorale (190) ;

iii) chez les femmes post-ménopausées, les ferritinémies sont significativement plus élevées dans le groupe ostéoporotique que dans les groupes ostéopénique et témoin (191).

L'ensemble de ces données suggère qu'un accroissement des quantités en fer de l'organisme puisse être un facteur de risque indépendant de baisse de DMO et cela même dans une population en bonne santé.

2. Modèles d'étude animaux

L'évaluation de l'impact osseux des surcharges en fer sur modèles *in vivo* a été réalisée à plusieurs reprises. Comme nous avons pu le voir, les études réalisées chez l'homme suggèrent un lien direct entre surcharge en fer et perte osseuse. Néanmoins ces pathologies sont souvent associées à de multiples causes d'ostéoporoses secondaires parfois à l'origine d'une interprétation délicate des résultats. L'étude *in vivo* sur modèles animaux permet de mieux cibler l'effet du fer sur le tissu osseux en maîtrisant davantage les causes secondaires d'atteinte osseuse. Les différents travaux réalisés jusqu'à présent sont présentés ci-après.

2.1. Modèles murins

Le retentissement osseux des surcharges en fer a été déterminé à plusieurs reprises sur différents modèles murins. Dans la plupart des cas, les expérimentations ont été réalisées sur des souris mâles afin de s'affranchir d'une éventuelle carence œstrogénique responsable d'ostéoporose primaire. Les surcharges en fer ont été induites de manières diverses et on recense aussi bien des modèles de surcharges endogènes (type HG) (192–194) que des modèles de surcharges exogènes (injection de fer) (195,196). Dans toutes les configurations, la surcharge martiale a été correctement documentée et les résultats similaires : les souris surchargées présentaient toutes une altération du tissu osseux. Les résultats obtenus par *micro-computed tomography* (μ CT) ont ainsi invariablement montré une réduction du volume osseux, du nombre et de l'épaisseur des travées de l'os trabéculaire (192,194–196). Ils ont également mis en évidence un amincissement des surfaces de l'os cortical et de son épaisseur (192,195,196). Une étude a de plus démontré que ces anomalies étaient dose-dépendantes (195). Les études histomorphométriques ont également systématiquement révélé une modification des paramètres osseux. Elles ont permis de constater une élévation du nombre d'ostéoclastes (193–195) parfois associée à une augmentation des surfaces de résorption (195). Bien que classiquement perturbés, les résultats en rapport avec l'activité ostéoblastique sont moins uniformes : Tsay *et al.* ont mis en évidence un défaut de minéralisation (195) tandis que Doyard *et al.* ont objectivé une réduction du nombre d'ostéoblastes et une diminution de la fonction de formation osseuse constatée au double marquage à la calcéine sans altération de la composition osseuse (193). D'une manière plus générale, il a également été observé que le réseau trabéculaire présentait des signes de désorganisation (193,194). Des modèles de souris femelles ovariectomisées ont également été utilisés. De façon intéressante, il a ainsi été montré que la présence d'œstrogènes atténuait la perte osseuse associée au fer (197). Il a également été mis en évidence que la chélation du fer prévenait la perte osseuse provoquée par une carence œstrogénique induite par ovariectomie (198).

2.2. Modèles de rat

La détermination du retentissement osseux des surcharges martiales a également été entreprise à diverses occasions sur différents modèles de rats. Tout comme chez la souris, les rats (de sexe masculin), surchargés en fer de façon exogène *via* l'alimentation, ont subi une altération du tissu osseux. L'étude histomorphométrique trabéculaire a en effet montré une diminution du volume osseux, du nombre de travées et de leur épaisseur ainsi qu'une augmentation du nombre d'ostéoclastes présents à la surface de l'os (199). De façon intéressante, une autre étude réalisée sur des rates ovariectomisées a démontré l'effet bénéfique d'une chélation préventive du fer sur le tissu osseux (200). Elle a démontré par la même occasion que le fer s'accumulait de façon plus importante dans le tissu osseux des rates ovariectomisées suggérant ainsi une exposition systémique en fer plus importante en cas de carence œstrogénique.

2.3. Autres animaux

Le retentissement des surcharges en fer sur le tissu osseux a également été évalué *in vivo* sur d'autres modèles animaux n'appartenant pas à l'ordre des rongeurs. Ainsi le poisson-zèbre a servi de modèle à deux reprises avec un mode de surcharge différent : i) endogène, grâce à un *knock-out* de l'hépcidine (201) ; ii) exogène *via* une exposition des larves à du fer ammonium citrate (**FAC**) (202). Dans les deux cas, la présence de tissu minéralisé a été réduite par l'exposition au fer. Il en a été de même pour l'expression de gènes « ostéoblastiques » tel que *runx2a*, *runx2b* et *alp*. Un modèle porcin, plus proche de l'homme, a également été utilisé (203). L'étude réalisée a mis en évidence que les porcs surchargés en fer présentaient une baisse de la formation osseuse. Il a également été observé un accroissement des zones de transition présentes dans les BRC, similaire à celui observé

chez la femme ménopausée souffrant d'ostéoporose, suggérant ainsi un « découplage » des activités de remodelage (57).

2.4. Conclusions

Les données collectées *via* les modèles animaux utilisés ont permis de confirmer les répercussions négatives du fer sur la qualité et la densité du tissu osseux. Ces résultats ont permis de renforcer l'idée que la présence chronique d'une surcharge martiale représentait bien à elle seule un facteur de risque ostéoporotique. Néanmoins, les mécanismes à l'origine de cette baisse de qualité de l'os demeurent méconnus. Les études *in vitro* décrites ci-après vont cependant nous fournir quelques éléments de réponse.

3. Modèles d'étude cellulaire

La dernière décennie a vu émerger un nombre important d'études *in vitro* en rapport avec le métabolisme osseux et les surcharges en fer. Différents modèles de cellules ostéoblastiques et ostéoclastiques ont ainsi été utilisés pour étudier le mécanisme des pertes osseuses liées au fer. Une synthèse de ces différents travaux est proposée dans les paragraphes ci-après.

3.1. Modèles ostéoclastiques

Plusieurs types de modèles cellulaires ont été utilisés *in vitro* pour évaluer l'action du fer sur les cellules responsables de la résorption osseuse. Ceux-ci ont mis en évidence que la cellule ostéoclastique augmentait ses besoins en fer au cours de sa différenciation. En effet, il a été montré

que l'expression du récepteur à la transferrine de type 1 était naturellement augmentée au cours de l'ostéoclastogénèse (198,204). Ainsi, l'adjonction de fer à des précurseurs ostéoclastiques en culture est responsable d'un accroissement de leur différenciation (196–198). Il a également été mis en évidence que le fer potentialisait la fonctionnalité des ostéoclastes matures en augmentant leur mobilité et leur aptitude à dégrader une MEC (198). A l'inverse, une privation du fer disponible est capable de réduire les capacités de résorption d'une cellule ostéoclastique mature (204) et d'inhiber la différenciation de précurseurs (198). Il a également été prouvé à plusieurs reprises que l'exposition au fer engendrait une élévation de production de ROS (196,198,205). Il a ainsi été proposé que cette production soit responsable d'une surexpression du facteur de transcription **CREB** stimulant l'ostéoclastogénèse (198,206). Ainsi, l'effet bénéfique de la N-Acyl-Cystéine (196) et de l'estradiol (205) sur la production de ROS serait à l'origine de l'effet protecteur de ces molécules vis-à-vis de l'activation ostéoclastique fer-induite.

3.2. Modèles ostéoblastiques

De nombreux modèles ostéoblastiques ont été utilisés pour l'étude des surcharges martiales. D'origine murine ou humaine, primaire ou immortalisé, tous les modèles cellulaires utilisés ont mis en évidence le même phénomène : le fer induit une diminution des capacités de minéralisation (197,207–212). Cette réduction est systématiquement accompagnée d'une diminution des niveaux d'ARNm de marqueurs ostéoblastiques (194,197,207–211) et d'une diminution d'activité de la phosphatase alcaline (197,208–210,212). Pour autant, les mécanismes cellulaires à l'origine de ces observations restent méconnus. Une surproduction de ROS a été retrouvée à plusieurs reprises (197,212,213) mais celle-ci était soit modeste (197,213) soit obtenue au moyen d'une surcharge en fer colossale (212). Il en est de même pour l'apoptose dont la mise en évidence nécessitait une exposition martiale bien supérieure à celle entraînant une altération du phénotype ostéoblastique (207,212–214). D'autres hypothèses ont été explorées afin d'expliquer ces changements

phénotypiques. Ainsi, Zarjou *et al.* ont démontré que l'activité ferroxidase associée à la ferritine reproduisait les effets d'une surcharge en fer suggérant par conséquent son implication dans l'altération phénotypique ostéoblastique fer-induite (209). Il a également été mis en évidence que l'inhibition d'un gène de la voie hedgehog (*HHIPL2*) réduisait l'expression de gènes ostéoblastiques (213). Enfin, plus récemment, il a été suggéré que la voie Wnt soit impliquée dans les baisses de minéralisation associées au fer. En effet, il a été démontré que **Wnt5a** était un acteur critique des effets pro-ostéogéniques engendrés par une déprivation ferrique des milieux de culture (211). Au total, bien que l'impact négatif du fer sur les ostéoblastes ne soit plus contestable, les mécanismes responsables de ce dernier ne sont pas à l'heure actuelle clairement établis.

4. Synthèse

L'ensemble des études cliniques, *in vivo* et *in vitro* permettent aujourd'hui d'affirmer que le fer, lorsqu'il est en excès, a un retentissement négatif sur la qualité du tissu osseux. Il a ainsi été objectivé qu'une élévation des quantités de fer était à même de modifier les caractéristiques intrinsèques de la MEC en impactant tout aussi bien les processus de résorption que de formation osseuse. En effet, tandis que l'activité ostéoclastique apparaît comme augmentée, l'activité ostéoblastique semble, quant à elle, être atténuée par la présence d'un excès de fer. La toxicité du fer est normalement liée à une surproduction intracellulaire d'espèces réactives de l'oxygène provoquée par l'augmentation du pool de fer non lié à la transferrine. Probablement responsable de la sur-activation ostéoclastique, son implication dans la dépression ostéoblastique est moins évidente. Aussi, l'atteinte ostéoblastique constatée à de nombreuses reprises *in vitro* n'est probablement pas en lien avec la production accrue d'espèces réactives de l'oxygène. En effet, l'intégralité des études abordant cet aspect ont mis en évidence des atteintes phénotypiques et fonctionnelles pour des excès de fer n'induisant pas de stress oxydatif supplémentaire. Ces résultats

suggèrent ainsi que d'autres mécanismes et médiateurs cellulaires puissent être impliqués dans la diminution des capacités de formation osseuse constatée en présence d'un excès de fer.

V Sphingosine-1-phosphate et homéostasie osseuse

Il a récemment été mis en évidence dans un modèle cellulaire eucaryote (*S. cerevisiae*) que la toxicité du fer pouvait être indépendante du stress oxydatif et médié par le métabolisme des sphingolipides (215). Cette observation, associée à celles évoquées dans le chapitre précédent, permet de suggérer une implication de cette famille de lipides complexes dans l'altération ostéoblastique liée aux surcharges en fer. Cette hypothèse a été renforcée par des travaux précédemment réalisés dans notre équipe et mettant en évidence, par approche transcriptomique, que l'expression du gène *SPNS2* (dont la protéine permet l'export de la S1P) était positivement régulée par le fer dans la lignée ostéoblastique MG-63. De façon intéressante, la S1P, médiateur lipidique de la famille des sphingolipides, est impliquée dans l'ensemble des processus physiologiques liés au remodelage osseux. Le lien entre S1P, altération ostéoblastique et surcharges en fer a donc constitué un axe de recherche intéressant et non décrit, motivant la réalisation des travaux présentés ci-après (**Chapitre VII « Résultats »**). Les éléments exposés dans ce chapitre ont pour but de fournir l'ensemble des données nécessaires à la compréhension et à la discussion des résultats obtenus au cours des recherches effectuées.

1. Famille des sphingolipides

1.1.Généralités

Les sphingolipides constituent l'une des huit catégories de lipides définies par l'« *International Lipid Classification and Nomenclature Committee* » en 2005 (216). Ils représentent une famille de lipides complexes possédant une structure commune constituée d'une base sphingoïde synthétisée *de novo* à partir d'une sérine et d'un acyl-CoA. Chez les mammifères la base sphingoïde est quasi-exclusivement constituée par la **sphingosine** (dénommé également **(2S,3R,4E)-2-aminooctadec-4ene-1,3diol**) ou encore **D-erythro-sphingosine** ou **sphing-4-ene**). D'autres bases sphingoïdes peuvent exister dans la nature. Celles-ci varient au niveau de la longueur de leur chaîne alkyle, du nombre et de la position de leurs doubles liaisons et de leurs groupes hydroxyles. Les bases sphingoïdes peuvent ensuite subir diverses modifications, notamment par l'adjonction de chaînes latérales très variées. Les sphingolipides constituent ainsi une famille de molécules lipidiques extraordinairement diversifiée comptant 1181 membres (217). Les sphingolipides sont subdivisés en plusieurs classes (énumérées dans le **tableau 4**) sur la base de caractéristiques structurales communes. Un schéma représentant la structure générale des sphingolipides est proposé dans la **figure 25**.

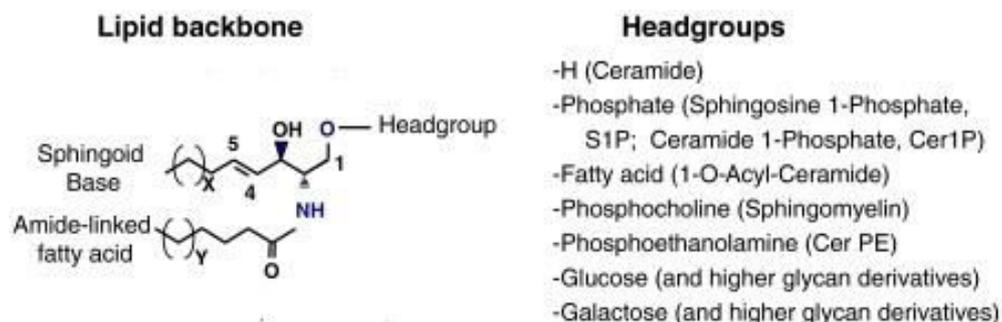


Figure 25 : Structure générale des sphingolipides (d'après (218))

- Sphingoid bases [SP01]
 - Sphing-4-enines (sphingosines) [SP0101]
 - Sphinganines [SP0102]
 - 4-Hydroxysphinganines (phytosphingosines) [SP0103]
 - Sphingoid base homologs and variants [SP0104]
 - Sphingoid base 1-phosphates [SP0105]
 - Lysosphingomyelins and lysoglycosphingolipids [SP0106]
 - N-Methylated sphingoid bases [SP0107]
 - Sphingoid base analogs [SP0108]
- Ceramides [SP02]
 - N-Acylsphingosines (ceramides) [SP0201]
 - N-Acylsphinganines (dihydroceramides) [SP0202]
 - N-Acyl-4-hydroxysphinganines (phytoceramides) [SP0203]
 - Acylceramides [SP0204]
 - Ceramide 1-phosphates [SP0205]
- Phosphosphingolipids [SP03]
 - Ceramide phosphocholines (sphingomyelins) [SP0301]
 - Ceramide phosphoethanolamines [SP0302]
 - Ceramide phosphoinositols [SP0303]
- Phosphosphingolipids [SP04]
- Neutral glycosphingolipids [SP05]
 - Simple Glc series (GlcCer, LacCer, etc.) [SP0501]
 - GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc- (globo series) [SP0502]
 - GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc- (ganglio series) [SP0503]
 - Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc- (lacto series) [SP0504]
 - Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc- (neolacto series) [SP0505]
 - GalNAc β 1-3Gal α 1-3Gal β 1-4Glc- (isoglobo series) [SP0506]
 - GlcNAc β 1-2Man α 1-3Man β 1-4Glc- (mollu series) [SP0507]
 - GalNAc β 1-4GlcNAc β 1-3Man β 1-4Glc- (arthro series) [SP0508]
 - Gal- (gala series) [SP0509]
 - Other [SP0510]
- Acidic glycosphingolipids [SP06]
 - Gangliosides [SP0601]
 - Sulfoglycosphingolipids (sulfatides) [SP0602]
 - Glucuronosphingolipids [SP0603]
 - Phosphoglycosphingolipids [SP0604]
 - Other [SP0600]
- Basic glycosphingolipids [SP07]
- Amphoteric glycosphingolipids [SP08]
- Arsenosphingolipids [SP09]
- Other [SP00]

Tableau 4 : Classification des Sphingolipides [SP] (classes et sous classes) (216)

Les sphingolipides sont des molécules présentes dans toutes les cellules eucaryotes et sont principalement utilisées en tant que composants structurels des membranes cellulaires. Néanmoins, plusieurs molécules issues de cette famille semblent désormais avoir un rôle dépassant le simple cadre énergétique ou structurel classiquement attribué aux lipides. Elles sont biologiquement actives, induisent des modifications fonctionnelles lorsque leur concentration varie et sont désormais considérées comme étant de véritables médiateurs cellulaires. Ces molécules sont regroupées sous

le terme de « **médiateurs lipidiques** » (en anglais : « **bioactive lipids** ») et interviennent dans différents processus cellulaires tels que la différenciation cellulaire, l'inflammation, l'angiogenèse, l'immunité ou encore les mouvements cellulaires (219). La sphingosine-1-phosphate (**S1P**) représente à ce jour le médiateur lipidique le plus étudié de cette famille moléculaire.

1.2. Métabolisme des sphingolipides

Le métabolisme des sphingolipides possède, dans sa voie de synthèse *de novo*, un point d'entrée métabolique unique, catalysé par la sérine palmitoyl transférase (**SPT**) permettant la synthèse du premier sphingolipide de cette voie de synthèse. Il possède également un point de sortie unique constitué par la dégradation non réversible de la S1P en hexadécenal et phospho-éthanolamine au moyen de la S1P lyase (**SPL**). Les multiples étapes métaboliques situées entre ces deux points constituent un réseau complexe connectant le métabolisme de nombreux sphingolipides (44). On peut considérer que les céramides (et dans une moindre mesure les dihydrocéramides) constituent l'axe central de cette voie de métabolisation.

Description :

Les sphingolipides sont synthétisés *de novo* à partir de sérine et de palmitoyl-CoA qui se condensent sous l'action de la SPT en 3-keto-dihydrosphingosine immédiatement réduite en **dihydrosphingosine**. Une acylation est ensuite réalisée au moyen d'une dihydro-céramide synthase (Lass ou CerS) aboutissant à la formation de dihydrocéramides dont la désaturation aboutit à la formation de céramides. Ces céramides peuvent ensuite :

- être phosphorylés (*via* une céramide kinase),
- être glycosylés (*via* une glucosyl ou galactosyl céramide synthase),
- recevoir une phosphocholine *via* une sphingomyéline synthase et ainsi former des sphingomyélines.

L'hydrolyse des sphingolipides évoqués ci-dessus permet la régénération de céramide sous l'action d'hydrolases spécifiques. Les céramides peuvent être clivés sous l'action de nombreuses *céramidases* aboutissant à la formation de sphingosine. La sphingosine formée peut être ensuite à nouveau transformée en céramide grâce à l'action de céramide synthase ou être phosphorylée sous l'action de deux sphingosine kinases (**SPHK1** et **SPHK2**) aboutissant ainsi à la synthèse de S1P. La S1P peut quant à elle être ensuite déphosphorylée et régénérer de la sphingosine grâce à une sphingosine phosphate phosphatase ou être définitivement clivée par une **S1P lyase**. Il est à noter que la diversité des chaînes acyle susceptibles d'être associées à la dihydrosphingosine est à l'origine d'une grande diversité de céramides et dihydrocéramides potentiellement bioactifs. Une représentation schématique simplifiée du métabolisme des sphingolipides est proposée dans la **figure 26**. Il est important de noter qu'il existe au sein de cette voie métabolique de nombreuses interconversions entre différents sphingolipides et qu'il existe des différences notables de quantités entre les différentes sous-classes de sphingolipides (cf. **figure 27**). La prise en compte de ces considérations permet d'envisager qu'un processus cellulaire modifiant une enzyme du métabolisme des sphingolipides puisse modifier en fin de cascade les concentrations d'un médiateur lipidique qui ne soit pas le produit direct de cette enzyme (44). Par exemple, l'activation d'une sphingomyélinase génère une production directe de céramides ; néanmoins, les actions séquentielles de céramidases et sphingosine kinases peuvent aboutir à un signal biologique porté par une molécule de S1P. L'interconnectivité de différents médiateurs lipidiques au sein d'une même voie métabolique rend la compréhension de leurs mécanismes de régulation difficile. Ainsi, l'implication d'une enzyme telle qu'une sphingomyélinase dans un processus cellulaire n'indique pas à coup sûr que l'effet biologique soit produit par un céramide.

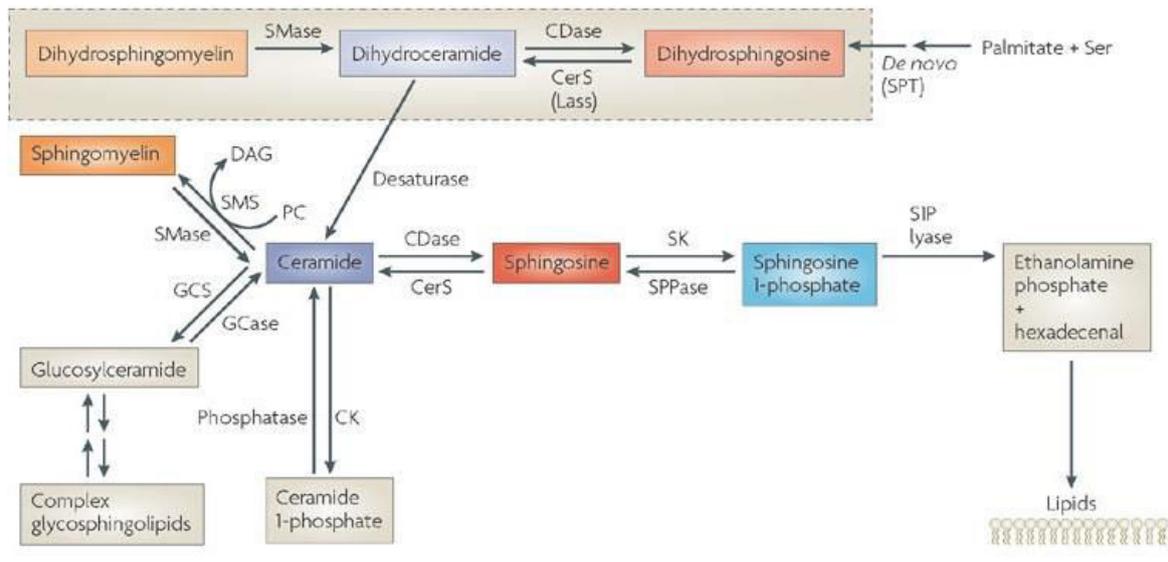


Figure 26 : Représentation schématique simplifiée du métabolisme des sphingolipides et des interconnexions entre médiateurs lipidiques de cette famille (44)

N.B 1 : La voie métabolique présentée ne fait pas état de la diversité des différentes familles de sphingolipides (notamment céramides et dihydrocéramides). Elle est proposée pour des molécules « génériques ».

N.B 2 : Le schéma présenté ne fait pas état de la multiplicité des différentes localisations intracellulaires des voies de métabolisation exposées.

Abréviations : **CDase**, ceramidase ; **CK**, ceramide kinase ; **DAG**, diacylglycerol ; **GCase**, glucosyl ceramidase ; **GCS**, glucosylceramide synthase ; **PC**, phosphatidylcholine ; **SK**, sphingosine kinase ; **SMase**, sphingomyelinase ; **SMS**, sphingomyelin synthase ; **SPPase**, sphingosine phosphate phosphatase ; **SPT**, serine palmitoyl transférase



Figure 27 : Représentation schématique des quantités relatives de sphingolipides (44).

Légende : les chiffres entre parenthèses correspondent à la quantité relative de chaque classe (sphingomyélines et céramides) ou molécule (Sphingosine et S1P) appartenant à la catégorie des sphingolipides.

2. Sphingosine-1-phosphate

2.1. Généralités

La sphingosine-1-phosphate (**S1P**) est un sphingolipide dérivé de la sphingosine, principale structure commune (base sphingoïde) de cette catégorie de lipide chez les mammifères. Longtemps perçu comme un simple intermédiaire permettant la dégradation de la sphingosine, elle est désormais considérée comme un véritable médiateur lipidique biologiquement actif. La découverte de son action anti-apoptotique (220) et de son implication dans la prolifération cellulaire (221) fut à l'origine de cette modification de perception. La mise en évidence de récepteurs membranaires spécifiques a par la suite permis la réalisation de nombreuses études à l'origine de l'engouement suscité par cette molécule désormais impliquée dans la régulation de nombreux processus biologiques majeurs tels que l'angiogenèse, le contrôle migratoire des cellules immunitaires, l'inflammation et le remodelage osseux.

2.2. Métabolisme de la S1P

2.2.1. Formation

La sphingosine, précurseur direct de la S1P, n'est pas une molécule synthétisée *de novo*, et sa formation n'est que la résultante d'une déacylation de céramides inclus dans le métabolisme des sphingolipides. Les céramides proviennent de deux sources :

- la synthèse *de novo* initiée par la SPT,
- le recyclage à partir de sphingomyélines ou de glycosphingolipides.

La S1P est ensuite formée à partir de sphingosine grâce à l'action de deux **sphingosines-kinases (SPHK1 et SPHK2)** catalysant la phosphorylation ATP-dépendante de la sphingosine. Ces deux isoenzymes ne présentent pas la même localisation. Alors que SPHK1 est principalement localisée dans le cytosol, SPHK2 va plutôt se situer à l'intérieur des compartiments intracellulaires de la cellule (222). Ces deux isoenzymes possèdent des affinités de substrat semblables et sont toutes deux capables de phosphoryler la sphingosine et la dihydrosphingosine (223). Néanmoins, SPHK2 possède une plus large spécificité de substrat et peut phosphoryler d'autres bases sphingoïdes comme les phytosphingosines. SPHK1 semble être la principale source de production de S1P au sein de la cellule et de nombreuses molécules sont capables de modifier son expression et son activité (224). SPHK1 est ainsi souvent présentée comme un régulateur critique des concentrations intracellulaires en S1P.

2.2.2. Dégradation

La déphosphorylation de la S1P (aboutissant à la formation de sphingosine) peut être réalisée par l'intermédiaire de deux isoenzymes spécifiques et intracellulaires localisées dans la membrane du réticulum endoplasmique : les **sphingosine phosphate phosphatases 1 et 2 (SPP1 et SPP2)** (225). La S1P extracellulaire peut également être déphosphorylée sous l'action de **lipide phosphate phosphatases (LPPs)** non spécifiques, présentes à la membrane plasmique (226,227). La S1P peut être enfin dégradée de manière définitive au moyen d'une enzyme intracellulaire située au niveau de la face cytosolique de la membrane du réticulum endoplasmique : la **S1P lyase (SPL)** (228). Dans cette réaction, la base sphingoïde est clivée au niveau des carbones 2 et 3, aboutissant à la formation simultanée d'hexadécénal et de phospho-éthanolamine. Les concentrations intracellulaires en S1P sont, comme pour la plupart des médiateurs cellulaires, très basses, finement régulées et étroitement dépendantes de la balance entre leur synthèse et dégradation (225). Cette balance est représentée de façon schématique dans la **figure 28**.

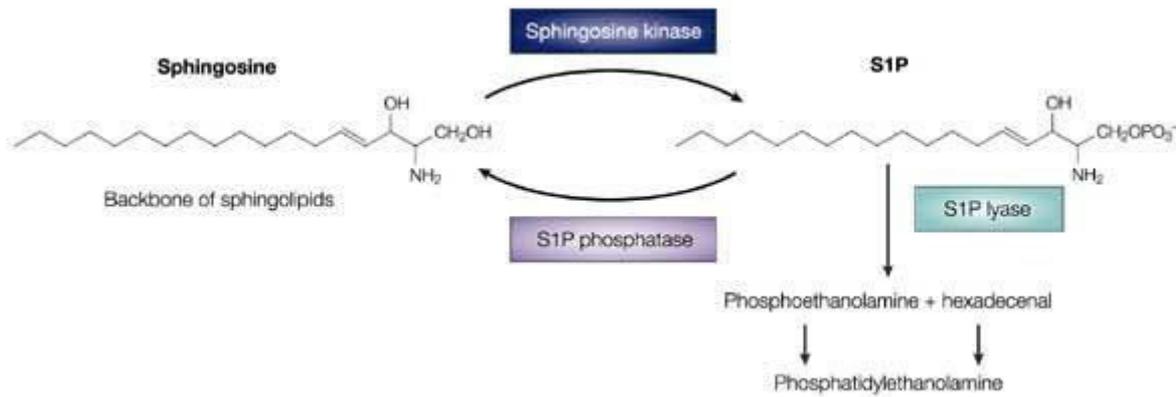


Figure 28 : Formation et dégradation intracellulaire de la S1P (225)

2.3. Mode d'action cellulaire de la S1P

La S1P est capable d'exercer une activité biologique de deux manières. Au niveau intracellulaire en tant que second messenger ou après sécrétion de manière autocrine (ou paracrine) *via* l'activation de récepteurs membranaires spécifiques (**S1PR**). Ces différents modes d'action vont être détaillés dans les paragraphes suivants.

2.3.1. Action intracellulaire

L'action directe de la S1P au niveau intracellulaire est un fait suggéré depuis longtemps. Il a en effet été montré au moyen de modèles exempts de S1PR que la perturbation du métabolisme de la S1P pouvait affecter la prolifération cellulaire, l'apoptose ou encore la mobilisation du Ca^{2+} (225). Néanmoins, les cibles intracellulaires de la S1P demeurent peu caractérisées et leur implication est parfois sujette à caution. Les différentes cibles intracellulaires identifiées de la S1P sont exposées dans la revue réalisée par Spiegel *et al.* qui fait état, entre autres d'interactions avec TRAF2 et les

histones déacétylases HDAC1 et HDAC2 (222). Ces travaux permettent désormais de confirmer que la S1P est bien capable d'agir au niveau intracellulaire en tant que second messenger.

2.3.2. Action extracellulaire

La S1P se comporte comme un agoniste vis-à-vis de 5 récepteurs spécifiques couplés aux protéines G : **S1PR₁₋₅**. Elle est le ligand naturel de ces cinq récepteurs transmembranaires également capables d'interagir avec la dihydrosphingosine-1-phosphate (**dhS1P**). Les S1PR sont couplés à plusieurs types de protéines G responsables de l'activation ou de l'inhibition de différentes voies de signalisation intracellulaire. Un récapitulatif de ces multiples associations est présenté dans le **tableau 5**. Les récepteurs à la S1P sont exprimés de façon ubiquitaire avec une intensité d'expression dépendante du type cellulaire. Le pattern d'expression spécifique à chaque type cellulaire combiné à la diversité des protéines G couplées à ces récepteurs est à l'origine de la grande hétérogénéité de réponses physiologiques induites par la S1P (229). C'est par l'intermédiaire de ces récepteurs membranaires et de son action extracellulaire que la S1P exerce la plupart des actions biologiques qui lui sont actuellement attribuées.

Receptor	G Protein Coupling	Signaling Pathways	Tissue Distribution
S1P ₁	G _{i/o}	↓ AC, ↑ ERK, ↑ PLC, ↑ PI3K/Akt, ↑ eNOS, ↑ Rac, ↑ Rho	Wide
S1P ₂	G _{i/o} , G _q , G _{12/13}	↑ AC, ↑ PLC, ↑ JNK, ↑ p38, ↓ Rho, ↓ Rac	Wide, vascular smooth muscle cells
S1P ₃	G _{i/o} , G _q , G _{12/13}	↓ AC, ↑ ERK, ↑ PLC, ↑ Rac, ↑ Rho	Heart, lung, spleen, kidney, intestine, diaphragm, cartilage
S1P ₄	G _{i/o} , G _s , G _{12/13}	↑ ERK, ↑ PLC	Immune cells, leukocytes
S1P ₅	G _{i/o} , G _{12/13}	↓ AC, ↓ ERK, ↑ JNK, ↑ p54JNK	Central nervous system, NK cells

Tableau 5 : Récapitulatif des 5 récepteurs de la S1P, leurs protéines G associées, les voies de signalisation transduites par leur activation et leur distribution, d'après (230)

Abréviations : **AC**, adenylyl cyclase ; **ERK**, extracellular signal regulated kinase ; **PLC**, phospholipase C ; **PI3K**, phosphatidylinositol 3-kinase ; **eNOS**, endothelial nitric oxide synthase ; **JNK**, c-Jun NH₂-terminal kinase

2.4. Efflux cellulaire de la S1P

De par la présence d'une tête polaire au sein de sa structure, la S1P est incapable de passer librement au travers des membranes cellulaires (231). En conséquence, la S1P synthétisée à l'intérieur de la cellule requiert l'intervention de transporteurs pour être exportée. Deux modes d'efflux ont jusqu'à présent été décrits : un premier faisant intervenir des membres de la famille des transporteurs ATP-binding cassette (**ABC**) et un second impliquant la protéine transmembranaire **SPNS2** (Spinster homolog 2).

2.4.1. Transporteurs de la famille des ATP binding cassette (ABC)

La famille de transporteurs ABC fut la première à être impliquée dans l'efflux cellulaire de S1P. Parmi les membres de cette famille, un certain nombre de transporteurs ABC possèdent en effet la capacité d'exporter des molécules lipidiques au travers des membranes cellulaires. Ce mode d'efflux fut d'abord envisagé dans cadre du relargage plaquettaire et érythrocytaire de la S1P. Il a en effet été montré que l'utilisation du glyburide, un inhibiteur de **ABCA1**, diminuait le relargage de S1P (232,233). Il a ensuite été démontré que d'autres membres de cette famille (**ABCC1** et **ABCG2**) étaient susceptibles d'exporter la S1P dans différents types cellulaires (234–237). Néanmoins, bien que leur contribution à l'export de la S1P ait été démontrée, leur surexpression dans un modèle de cellules CHO exprimant SPHK1 n'a pas été en mesure de modifier les concentrations extracellulaires en S1P (238). De plus, il a été mis en évidence que les concentrations plasmatiques en S1P de souris déficientes pour *Abca1* et *Abcc1* n'étaient pas modifiées (239). Au total, bien que ces transporteurs soient en mesure de permettre l'export cellulaire de la S1P, leur implication physiologique reste sujette à caution.

2.4.2. SPNS2 (*Spinster homolog 2*)

L'implication de la protéine SPNS2 dans l'export cellulaire de la S1P fut pour la première fois démontrée dans le cadre d'expérimentations réalisées sur le poisson-zèbre (240). Cette fonctionnalité a depuis été étudiée *in vitro* sur différents modèles cellulaires et confirmée au moyen de plusieurs modes opératoires. Le récapitulatif de ces expérimentations est présenté dans le **tableau 6**. Ces études permettent de préciser les propriétés d'efflux de la protéine SPNS2 vis-à-vis de la S1P et de quelques membres de la famille des sphingosines. Il peut ainsi être affirmé que :

1. SPNS2 permet l'efflux cellulaire de S1P ;
2. L'efflux de S1P est passif et dépend du gradient de concentration intra/extracellulaire ;
3. SPNS2 permet l'efflux d'autres sphingosines proches de la S1P ;
4. L'efflux d'autres sphingosines semble plutôt concerner les molécules phosphorylées ;
5. La surexpression de SPNS2 n'a pas d'incidence sur les concentrations intracellulaires en S1P ;
6. L'utilisation de SiRNAs spécifiques de SPNS2 n'induit pas systématiquement d'augmentation intracellulaire des concentrations en S1P ;
7. Chez la souris, *Spns2* n'est pas impliqué dans l'export érythrocytaire et plaquettaire de la S1P.

Les études *in vivo* réalisées au moyen de modèles murins *Spns2*^{-/-} suggèrent elles aussi une fonction d'export de la S1P pour la protéine *Spns2*. En effet, à l'exception d'une étude (241), l'ensemble de ces modèles ont présenté une diminution de leur concentration plasmatique en S1P (242–246) probablement en lien avec l'altération endothéliale son efflux (243). De façon intéressante, plusieurs modèles ont mis en évidence une augmentation des concentrations tissulaires en S1P (poumon, foie....) suggérant ainsi une accumulation cellulaire de cette molécule (245,246). Les principales anomalies physiologiques identifiées impliquaient le système immunitaire. En effet, la totalité des modèles murins *Spns2*^{-/-} étaient lymphopéniques et montraient des anomalies du trafic lymphocytaire (241–246). Au total, l'ensemble de ces études ont permis la confirmation des capacités d'export de la protéine SPNS2 vis-à-vis de la S1P et ont démontré l'implication physiologique de cette fonction.

Références	Modèle cellulaire	Méthodologie expérimentale		Principaux Résultats	Conclusions	
Hisano <i>et al.</i> 2011	CHO (Chinese Hamster Ovary)	Cellules CHO exprimant SPHK1	+/- expression <i>human SPNS2</i>	sans supplémentation	Augmentation des [extracellulaire] en S1P et dhS1P en présence de hSPNS2	Export de S1P et des analogues de la Sph ayant subit une phosphorylation à l'intérieur de la cellule via hSPNS2
			+/- expression <i>human SPNS2</i>	avec supplémentation en dhSph, C ₁₇ -Sph, phyto-Sph, FTY720	Augmentation des [extracellulaire] en dhS1P, C17-Sph1P, phyto-Sph1P, FTY720-P et pas de modification des [extracellulaire] de dhSph, C17-Sph, phyto-Sph en présence de hSPNS2 (n.b : FTY720 non testé)	
			+/- expression <i>human SPNS2</i>	supplémentation croissante en Sph	Augmentation croissante des [intracellulaire] et [extracellulaire] en S1P en présence de hSPNS2	Export de S1P <i>via</i> hSPNS2 est passif et dépend du gradient de concentration intra/extracellulaire
			+/- expression ABC transporteurs (<i>mouse Abca1</i> , <i>human ABCB1</i> , <i>mouse Abcc1</i> , <i>human ABCG2</i>)	avec supplémentation Sph ou FTY720	Pas de modification des [extracellulaire] de S1P ou FTY720-P en présence d'ABC transporteurs	Les ABC transporteurs testés n'exportent pas la S1P et le FTY720-P phosphorylés à l'intérieur de la cellule

Tableau 6 : Récapitulatif des résultats obtenus *in vitro* en rapport avec l'étude de l'efflux cellulaire des sphingosines via SPNS2 (partie I)

Abréviations : Sph, sphingosine ; S1P, sphingosine-1-phosphate ; dhSph, dihydrosphingosine ; dhS1P, dihydrosphingosine-1-phosphate ; C17-Sph, C17-sphingosine ; C17-Sph1P, C17-sphingosine-1-phosphate ; phyto-Sph, phytosphingosine ; phyto-Sph1P, phytosphingosine-1-phosphate.

Légende : [intracellulaire] = concentration intracellulaire ; [extracellulaire] = concentration extracellulaire ; données issues de Hisano *et al.* (238)

Références	Modèle cellulaire	Méthodologie expérimentale	Principaux Résultats	Conclusions
Hisano <i>et al.</i> 2012	MAECs (Mouse aortic Endothelial Cells)	cellules isolées de souris <i>Spns2</i> -/-	Disparition des [extracellulaire] en S1P avec les cellules issues de souris <i>Spns2</i> -/-	Spns2 seul permet l'export de la S1P dans les cellules endothéliales murines
	Erythrocytes/Plaquettes		Pas de modification du relargage en S1P p/r au témoin	Spns2 n'est pas impliqué dans l'export plaquettaire et érythrocytaire de la S1P chez la souris
	HUVECs (Human Umbilical vein ECs)	SiRNAs dirigés contre <i>SPNS2</i>	Diminution des [extracellulaire] en S1P et pas de modification des [intracellulaire] en S1P p/r au témoin	SPNS2 exporte la S1P dans les cellules endothéliales humaines
	HPAECs (Human pulmonary artery Ecs)			
Fukuhara <i>et al.</i> 2012	HUVECs (Human Umbilical vein ECs)	SiRNAs dirigés contre <i>SPNS2</i>	Diminution des [extracellulaire] en S1P p/r au témoin	SPNS2 exporte la S1P dans les cellules endothéliales humaines
	Erythrocytes	cellules isolées de souris <i>Spns2</i> -/-	Pas de modification du relargage en S1P p/r au témoin	Spns2 n'est pas impliqué dans l'export érythrocytaire de la S1P chez la souris

Tableau 6 : Récapitulatif des résultats obtenus *in vitro* en rapport avec l'étude de l'efflux cellulaire des sphingosines via SPNS2 (partie II)

Abréviations : Sph, sphingosine ; S1P, sphingosine-1-phosphate ; dhSph, dihydrosphingosine ; dhS1P, dihydrosphingosine-1-phosphate ; C17-Sph, C17-sphingosine ; C17-Sph1P, C17-sphingosine-1-phosphate ; phyto-Sph, phytosphingosine ; phyto-Sph1P, phytosphingosine-1-phosphate.

Légende : [intracellulaire] = concentration intracellulaire ; [extracellulaire] = concentration extracellulaire ; données issues de Hisano *et al.* (243) et FuKuhara *et al.* (242)

Références	Modèle cellulaire	Méthodologie expérimentale	Principaux Résultats	Conclusions
Nagahashi <i>et al.</i> 2013	HEK 293 cells (Human Embryonic Kidney)	Surexpression de SPNS2	Augmentation des [extracellulaire] en Sph, S1P et dhS1P p/r au témoin	SPNS2 exporte la S1P (+/- d'autres sphingosines) dans les cellules HEK 293
			Pas de modification des [intracellulaire] en Sph, dhSph, S1P et dhS1P p/r au témoin	
		SiRNAs dirigés contre SPNS2	Diminution des [extracellulaire] en S1P et dhS1P p/r au témoin	
	TIME cells (Telomerase-immortalized human microvascular endothelial)	Surexpression de SPNS2	Augmentation des [extracellulaire] en S1P p/r au témoin	SPNS2 exporte la S1P (+/- d'autres sphingosines) dans les cellules TIME
SiRNAs dirigés contre SPNS2		Diminution des [extracellulaire] en S1P et dhS1P p/r au témoin		

Tableau 6 : Récapitulatif des résultats obtenus *in vitro* en rapport avec l'étude de l'efflux cellulaire des sphingosines via SPNS2 (partie III)

Abréviations : Sph, sphingosine ; S1P, sphingosine-1-phosphate ; dhSph, dihydrosphingosine ; dhS1P, dihydrosphingosine-1-phosphate ; C17-Sph, C17-sphingosine ; C17-Sph1P, C17-sphingosine-1-phosphate ; phyto-Sph, phytosphingosine ; phyto-Sph1P, phytosphingosine-1-phosphate.

Légende : [intracellulaire] = concentration intracellulaire ; [extracellulaire] = concentration extracellulaire ; données issues de Nagahashi *et al.* (245)

Références	Modèle cellulaire	Méthodologie expérimentale	Principaux Résultats	Conclusions
Bradley <i>et al.</i> 2014	NSCLC cells (non-small cell lung cancer) A549	Surexpression de SPNS2	Augmentation des [extracellulaire] en dhSph, Sph et S1P p/r au témoin	SPNS2 exporte la S1P (+/- d'autres sphingosines) dans les cellules A549.
			Pas de modification [intracellulaire] en dhS1P, Sph et S1P p/r au témoin mais augmentation des niveau d'ARNm de SPHK1 & SPHK2 et diminution de SGPP1	L'absence de modification des [intracellulaires] en S1P est dû l'adaptation du métabolisme intracellulaire de la S1P
		SiRNAs dirigés contre SPNS2	Augmentation des [intracellulaire] en S1P des p/r au témoin	SPNS2 exporte la S1P dans les cellules A549.
Laurenzana <i>et al.</i> 2015	H-MVEC (human microvascular endothelial cells)	SiRNAs dirigés contre SPNS2	Diminution des [extracellulaire] en S1P p/r au témoin	SPNS2 exporte la S1P dans les cellules H-MVEC
			Augmentation des [intracellulaire] en S1P p/r au témoin	

Tableau 6 : Récapitulatif des résultats obtenus *in vitro* en rapport avec l'étude de l'efflux cellulaire des sphingosines via SPNS2 (partie IV)

Abréviations : **Sph**, sphingosine ; **S1P**, sphingosine-1-phosphate ; **dhSph**, dihydrosphingosine ; **dhS1P**, dihydrosphingosine-1-phosphate ; **C17-Sph**, C17-sphingosine ; **C17-Sph1P**, C17-sphingosine-1-phosphate ; **phyto-Sph**, phytosphingosine ; **phyto-Sph1P**, phytosphingosine-1-phosphate.

Légende : [intracellulaire] = concentration intracellulaire ; [extracellulaire] = concentration extracellulaire ; données issues de Bradley *et al.* (247) et Laurenzana *et al.* (248)

2.5. Concentrations plasmatiques et tissulaires de S1P

La S1P plasmatique circule principalement liée aux HDL (*via* l'apolipoprotéine M (249)) ou associée à l'albumine (250). Cette matrice est caractérisée par sa concentration relativement importante en S1P en regard des faibles concentrations tissulaires généralement observées. En effet, alors que les concentrations plasmatiques sont de l'ordre du $\mu\text{mol/L}$, il apparaît que les concentrations tissulaires relèvent du pmol/mg de tissu (230). Il a ainsi été proposé l'existence d'un gradient de concentration entre sang périphérique et liquides interstitiels à l'origine de migrations cellulaires S1P-dépendantes (71,251).

2.6. Récapitulatif

L'ensemble des mécanismes liés à la synthèse de S1P, sa dégradation, son export, sa liaison aux récepteurs membranaires ainsi qu'à ses cibles intracellulaires sont représentés dans la **figure 29**.

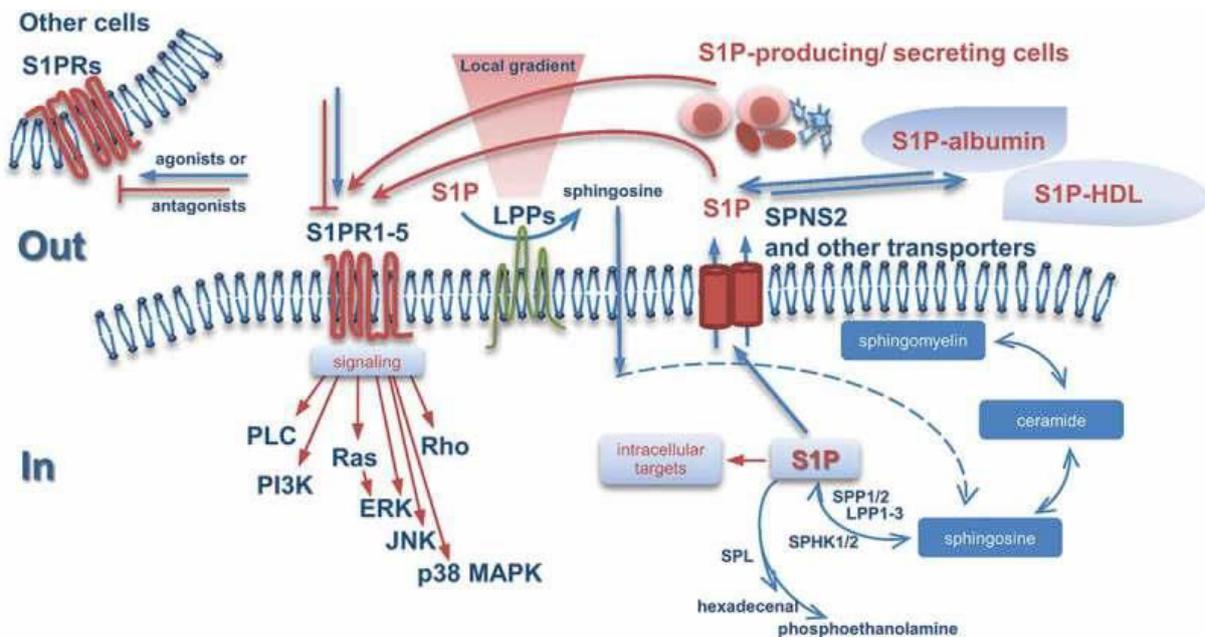


Figure 29 : Schéma récapitulatif des mécanismes cellulaires de la S1P (252)

3. Actions de la sphingosine-1-phosphate sur les cellules osseuses

Le répertoire des processus biologiques influencés par la S1P ne cesse de croître depuis la caractérisation de ses propriétés de médiateur lipidique. En effet, la S1P est désormais impliquée dans la régulation de fonctions biologiques telles que la prolifération, la différenciation et la migration cellulaire, notamment dans le cadre de l'immunité, de l'inflammation, de l'angiogenèse et de la progression tumorale (253). Il est ainsi peu surprenant que la S1P soit dorénavant citée comme cible thérapeutique potentielle de pathologies telles que l'athérosclérose, le diabète, les cancers ou encore les maladies auto-immunes. La S1P est également un régulateur important de l'homéostasie osseuse en intervenant à la fois sur les ostéoclastes, les ostéoblastes et les ostéocytes. Ces différentes actions vont être détaillées dans les paragraphes ci-après.

3.1. Actions sur la lignée ostéoclastique

3.1.1. Migration des précurseurs ostéoclastiques

Il a été mis en évidence que la S1P se comportait comme une chemokine vis-à-vis des précurseurs ostéoclastiques *via* les récepteurs S1PR1 et S1PR2 permettant ainsi à la S1P d'exercer respectivement un pouvoir chémo-attracteur (69) ou chémo-répulsif (70). Ces propriétés mises en évidence *in vitro* ont une réelle incidence physiologique car la réalisation de modèles murins *knock-out* pour les gènes *SPR1* et *SPR2* ont permis la mise en évidence d'anomalies osseuses. Ces modèles suggèrent ainsi que l'important gradient de concentration en S1P existant entre la circulation périphérique (forte [S1P]) et les tissus (faible [S1P]) guide le trafic des précurseurs ostéoclastiques présents dans les sinusoides de la moelle osseuse. En effet le modèle spécifiquement déficient en S1PR1 dans la lignée monocytaire/macrophagique présentait une ostéoporose associée à une

augmentation du nombre d'ostéoclastes présents à la surface de l'os (68). A l'inverse, le modèle déficient en S1PR2 révélait une légère ostéopétrose associée à une diminution de la résorption ostéoclastique (70). Ces résultats ont été également corroborés par l'utilisation d'agents pharmacologiques spécifiques de ces récepteurs (**JTE013** et **SEW271**) (69,70). Il a également été montré que l'administration de **FTY720** (agoniste de S1PR1) prévenait la perte osseuse induite chez la souris par ovariectomie en augmentant la recirculation des précurseurs ostéoclastiques (69).

3.1.2. Différenciation ostéoclastique

La S1P est également impliquée dans le processus de différenciation permettant l'obtention d'ostéoclastes matures fonctionnels. Il a ainsi été montré que le transporteur SPNS2 était exprimé *in vivo* par les ostéoclastes multinucléés présents à la surface de l'os (254) et que l'expression de son gène était augmentée au cours de l'ostéoclastogénèse (254,255) tout en étant corrélée à une diminution des concentrations intracellulaires en S1P (254). De façon très intéressante, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de SPHK1 (enzyme productrice de S1P) atténue l'ostéoclastogénèse *in vitro* (255). Ces inhibiteurs induisent : **i)** une réduction significative du nombre d'ostéoclastes multinucléés ; **ii)** une baisse des niveaux d'ARNm de la cathepsine K et de gènes « ostéoclastiques » ; **iii)** une diminution des cônes de résorption produits à la surface d'une matrice osseuse synthétique (255). L'ensemble de ces résultats suggèrent une implication de la S1P dans la différenciation ostéoclastique terminale et une potentielle application thérapeutique des inhibiteurs de SPHK1 en tant qu'inhibiteur de l'ostéoclastogénèse.

3.2. Actions sur la lignée ostéoblastique

La S1P représente un acteur majeur de la régulation ostéoblastique de par sa capacité à intervenir sur l'ensemble des processus aboutissant à la réalisation de ses fonctions minéralisantes au sein du BRC. Ces différents aspects vont être abordés dans les paragraphes suivants.

3.2.1. Migration des précurseurs ostéoblastiques

Il a été mis en évidence que la S1P était capable d'influencer la migration des précurseurs ostéoblastiques. Plusieurs études *in vitro* ont démontré cet effet mais leurs résultats ne sont pas toujours équivalents. Ainsi, il a été observé que le blocage des récepteurs S1PR1 et S1PR2 annulait la mobilité de précurseurs ostéoblastiques (75,87). Néanmoins, d'autres études ont mis en évidence que l'inactivation de S1PR2 augmentait la migration de CSM (76) et diminuait une chémo-répulsion S1P-dépendante préalablement constatée (73). Bien que la S1P semble se comporter comme une chemokine vis-à-vis de précurseurs ostéoblastiques, il n'est pas possible de déterminer dans quelle mesure cet effet a une réelle incidence physiologique.

3.2.2. Prolifération ostéoblastique

Il a été mis en évidence à plusieurs reprises que la S1P induisait *in vitro* une augmentation de la prolifération cellulaire de différents modèles ostéoblastiques humains et animaux (256–258).

3.2.3. Différenciation ostéoblastique

La S1P est impliquée dans le processus de différenciation permettant l'obtention d'ostéoblastes minéralisants. La différenciation *in vitro* de précurseurs ostéoblastiques a mis en évidence que l'expression et l'activité de SPHK1 était augmentées de façon spontanée au cours de ce processus (259,260). L'accroissement de cette activité enzymatique était systématiquement accompagnée d'une élévation des concentrations extracellulaires en S1P (259,260). De façon très intéressante, il a été mis en évidence une surexpression concomitante du gène *Spns2* selon un ratio pouvant atteindre 50 fois la valeur basale (259). L'ensemble de ces résultats indique que la production et l'export de la S1P sont donc fortement augmentés au cours de la différenciation ostéoblastique. Au-delà de cette régulation spontanée, il a été démontré que la S1P inhibait la différenciation adipogénique de CSM murin (261). Il a également été mis en évidence que la S1P amplifiait la minéralisation et l'expression de marqueurs ostéoblastiques dans de nombreux modèles *in vitro* (254,261–264). La diminution des capacités de minéralisation induite par l'utilisation d'inhibiteurs de SPHK1 (259,260) suggère avec l'ensemble des résultats précédemment cités que la S1P contribue activement à l'acquisition des fonctions de minéralisation de l'ostéoblaste en agissant de manière autocrine et/ou paracrine lors de la différenciation ostéoblastique. Il a été démontré que les effets pro-ostéoblastiques de la S1P sont dépendants du récepteur S1PR3 (259,260) ; néanmoins, d'autres résultats suggèrent que les récepteurs S1PR1 et S1PR2 puissent aussi être impliqués (76,263,264). Enfin, deux études proposent que cet effet soit permis grâce à une activation de la voie Wnt par la S1P (263,265).

3.3. Actions sur les ostéocytes

Comme nous avons pu le voir précédemment les ostéocytes sont les principales cellules du tissu osseux (5) et sont souvent proposées comme principal intégrateur des signaux mécanostransduits probablement à l'origine de l'initiation du remodelage osseux (63,64). Il a récemment été montré que la S1P reproduisait *in vitro* sur une lignée ostéocytaire les effets d'une stimulation mécanique (266) et que les concentrations intracellulaires en S1P étaient augmentées lors de telles stimulations (267). Il a ainsi été proposé que la S1P fasse partie des médiateurs cellulaires permettant la propagation des signaux mécanostransduits à travers le réseau lacuno-canaliculaire formés par les ostéocytes. La S1P participerait ainsi aux modifications du tissu osseux induites par les charges et contraintes mécaniques subies par l'os.

3.4. Synthèse

Au total, il a été mis en évidence que la S1P était impliquée dans la régulation de la plupart des processus biologiques nécessaires à la réalisation d'un remodelage osseux équilibré :

- Régulation du trafic des précurseurs ostéoclastiques (69,70),
- Différenciation ostéoclastique (254,255),
- Migration de CSM et précurseurs ostéoblastiques (73,75,76,87),
- Prolifération des précurseurs ostéoblastiques (256–258),
- Différenciation des précurseurs en ostéoblastes minéralisants (76,254,259–265),
- Propagation ostéocytaire des signaux mécanostransduits (266,267).

L'ensemble de ces résultats font de la S1P un acteur central du remodelage osseux et on peut ainsi raisonnablement extrapoler que toute perturbation de son homéostasie au sein du BRC est susceptible de générer un déséquilibre de ce processus essentiel au maintien des compétences biomécaniques de l'os.

VI Cadre et objectifs du travail

Les surcharges en fer, qu'elles soient d'origine génétique ou secondaire, favorisent la baisse de densité minérale osseuse et par conséquent l'apparition d'une ostéoporose. L'ensemble des études cliniques, *in vivo* et *in vitro*, permettent dorénavant de confirmer qu'une accumulation de fer au sein de l'organisme a un retentissement négatif sur la qualité du tissu osseux. Il apparaît que le déséquilibre du remodelage osseux induit par le fer impacte tout autant l'activité ostéoclastique (augmentation) qu'ostéoblastique (diminution). Alors que la sur-activation ostéoclastique semble être en lien avec la génération de ROS provoquée par l'excès de fer, les mécanismes cellulaires à l'origine de la dépression ostéoblastique restent quant à eux incomplètement caractérisés. Ce travail a donc été entrepris avec l'objectif d'identifier et préciser les mécanismes cellulaires impliqués dans les altérations phénotypiques et fonctionnelles induites par le fer sur la population ostéoblastique. Nous avons pour cela tiré bénéfice d'une étude transcriptomique préalablement effectuée par notre équipe. Celle-ci a révélé que le gène *SPNS2* (Spinster Homolog 2), dont la protéine permet l'export cellulaire de la S1P, était potentiellement régulé par le fer dans la lignée ostéoblastique humaine MG-63. Nos objectifs ont donc été de :

- i) caractériser les relations entre l'expression du gène *SPNS2* et un excès de fer,
- ii) étudier le lien entre le gène *SPNS2* et l'impact phénotypique du fer sur les ostéoblastes,
- iii) préciser l'impact fonctionnel de cette régulation sur l'export de la S1P et l'expression de l'ensemble des intervenants de l'axe S1P/S1PR (récepteurs, enzymes).

VII Résultats

Iron excess upregulates *SPNS2* mRNA levels but reduces Sphingosine-1-Phosphate export in human osteoblastic MG-63 cells

Lucas Peltier^{1,2,3}, Claude Bendavid^{1,2,3}, Thibault Cavey^{1,2,3}, Marie-Laure Island², Mathilde Doyard², Patricia Leroyer², Coralie Allain², Marie De Tayrac^{3,4,5}, Martine Ropert^{1,2}, Olivier Loréal^{2,3}*, Pascal Guggenbuhl^{2,3,6}* §

¹ CHU Rennes, Service de Biochimie – Toxicologie, F- 35033 Rennes, France

² INSERM, INRA, Univ Rennes1, Univ Bretagne Loire, Nutrition, Metabolism, and Cancer, Rennes, France

³ Université Rennes 1, Faculté de Médecine, F-35043 Rennes, France

⁴ CNRS, UMR 6290, Institut de Génétique et Développement de Rennes (IGdR), Rennes F-35043, France

⁵ CHU Rennes, Service de Génétique Moléculaire et Génomique, Rennes F-35033, France

⁶ CHU Rennes, service de Rhumatologie, F- 35203 Rennes, France

* These two authors contribute equally to the manuscript

§ Corresponding authors

Abstract

Iron excess favors the development of osteoporosis, but the mechanisms involved are still unclear. We studied iron-related osteoporosis using the osteoblastic MG-63 cell line and showed that iron exposure strongly increased the mRNA level of the *SPNS2* gene, which encodes a sphingosine 1-phosphate (S1P) exporter. We investigated its potential impact on S1P efflux and showed an unexpected concomitant decrease in the cellular capacity to export S1P. Iron excess did not modulate *SPHK1*, *SPHK2*, *SGPL1*, or *SGPP1* gene expression, but decreased *S1PR1* mRNA levels, suggesting a functional repercussion of low extracellular S1P concentration on the S1P/S1PR signaling axis. Overall, these results suggest that iron affects the bone associated S1P process and favors the occurrence of osteoporosis during chronic iron overload.

Highlights

- Iron exposure increased *SPNS2* mRNA levels in the MG-63 osteoblastic cell line
- A Fluxomic assay to study cellular S1P synthesis and export was performed
- Extracellular S1P levels of MG-63 cells were decreased by iron exposure
- The S1P/S1PR1 signaling axis of MG-63 cells is affected by iron excess

Key words: osteoblast, osteoporosis, iron, hemochromatosis, sphingosine-1-phosphate, *SPNS2*

L'ensemble des études réalisées *in vivo* et *in vitro* permettent aujourd'hui d'affirmer que l'excès de fer impacte l'ensemble du processus de remodelage osseux en ayant notamment un retentissement négatif sur le phénotype et les capacités de minéralisation des ostéoblastes. Néanmoins, les mécanismes en jeu restent peu caractérisés et bien que l'hypothèse d'une surproduction de ROS ait été avancée pour expliquer l'effet délétère d'un excédent de fer sur la formation de l'os, il est probable que d'autres mécanismes cellulaires interviennent.

Les travaux et résultats présentés ci-après font suite à un travail précédemment initié au sein de notre équipe de recherche. Ceux-ci avaient permis d'établir un protocole opératoire démontrant la capacité de la lignée ostéoblastique humaine MG-63 à moduler son statut intracellulaire en fer en cas d'exposition excessive de ce dernier. Il avait ainsi été montré qu'une surcharge en fer induisait une baisse d'expression du gène *TFRC* (récepteur de la transferrine de type 1) et une augmentation de la synthèse protéique de ferritine (protéine de stockage du fer). Il avait été également observé une baisse d'expression concomitante de plusieurs marqueurs ostéoblastiques majeurs dont le gène *COL1A1* (chaîne alpha 1 du collagène de type 1) confirmant ainsi l'impact délétère du fer sur ce modèle. L'identification au cours de ces travaux, par approche transcriptomique, d'une probable surexpression fer-dépendante du gène *SPNS2* (Spinster Homolog 2) nous a conduit à explorer l'hypothèse d'une implication de la voie de signalisation S1P/S1PR dans le mécanisme de dépression ostéoblastique lié au fer. Un résumé des résultats obtenus est exposé ci-après.

Caractérisation des relations entre l'expression du gène *SPNS2* et un excès de fer

Dans la lignée ostéoblastique MG63

Nous avons confirmé la surexpression fer-induite du gène *SPNS2* par PCR quantitative en Temps Réel (**RT-qPCR**). Nous avons montré que cette surexpression était dose-dépendante, significative dès l'ajout de très faibles quantités de fer ammonium citrate (FAC) et pouvait atteindre 18 fois l'expression basale de la condition témoin pour la concentration maximale de fer testé. L'étude du profil cinétique de régulation des niveaux d'ARNm de *SPNS2* a révélé que le fer augmentait ceux-ci de façon progressive, sans qu'un plateau puisse être atteint sur la période testée. Il a également été mis en évidence qu'une exposition prolongée et un apport régulier en fer était nécessaire à l'induction d'une surexpression maximale du gène *SPNS2*.

Autres types cellulaires et tissus

Nous avons ensuite désiré écarter l'hypothèse d'une régulation ubiquitaire du gène *SPNS2* par le fer. Deux types cellulaires hautement impliqués dans le contrôle du fer par l'organisme (entérocytes et hépatocytes) ont ainsi été choisis comme modèles d'étude. Aucune modification de l'expression du gène *SPNS2* n'a été mise en évidence dans les modèles Caco2 et HepG2 après exposition au fer selon un protocole identique à celui mis en place dans la lignée MG-63. L'expression du gène *Spns2* a également été déterminée dans le tissu hépatique de deux modèles murins de surcharge en fer. De la même manière, aucune modification des niveaux d'ARNm du gène *Spns2* n'a été observée. Ces résultats montrent que l'augmentation fer-dépendante du gène *SPNS2* est potentiellement restreinte à quelques types cellulaires dont les ostéoblastes.

Lien entre la régulation du gène *SPNS2* et l'impact phénotypique du fer sur les ostéoblastes

Une baisse d'expression du gène *COL1A1* a été mise en évidence en parallèle de la surexpression fer-induite du gène *SPNS2*. Celle-ci a confirmé l'impact délétère du fer sur les cellules MG-63 dans des conditions d'exposition au fer induisant une forte élévation des niveaux d'ARNm de *SPNS2*. Cette observation nous a conduit à émettre l'hypothèse d'un lien de cause à effet entre ces deux phénomènes. Une inhibition ciblée du gène *SPNS2* par stratégie SiRNA a donc été menée afin de tester cette dernière. Nous avons montré qu'une inhibition du gène *SPNS2* provoquait, tout comme l'excès de fer, une baisse d'expression de *COL1A1* lorsque le fer n'était pas en condition d'excès. En revanche, l'action de SiRNA dirigés contre *SPNS2* ne modifiait pas l'expression de *COL1A1* en présence d'une surcharge en fer. L'action du fer sur ce constituant de la matrice osseuse n'est donc pas directement dépendante de la surexpression de *SPNS2*. Néanmoins, la baisse d'expression du gène *COL1A1* induite par l'inhibition du gène *SPNS2* en l'absence de surcharge martiale suggère un lien entre ces deux gènes en dehors de toute action du fer.

Impact fonctionnel du fer sur l'export de la S1P et l'expression des intervenants de l'axe S1P/S1PR

Plusieurs équipes de recherche ont montré que la surexpression de la protéine SPNS2 provoquait une augmentation de l'efflux cellulaire de la S1P sans pour autant avoir un impact sur ses concentrations intracellulaire (245,247) et ceci probablement grâce à une adaptation de l'activité enzymatique associée à ce lipide (247). Ainsi, l'augmentation fer-dépendante des niveaux d'ARNm du gène *SPNS2* observée dans la lignée MG-63 nous a conduit à émettre l'hypothèse d'un retentissement fonctionnel de cette régulation sur l'export et l'activité enzymatique liée au S1P. En conséquence nous avons déterminé par RT-qPCR les niveaux d'ARNm des enzymes clés intervenant dans la régulation de la S1P lors d'une exposition à un excès de fer. Aucune modification d'expression des gènes *SPHK1*, *SPHK2*, *SGPL1* et *SGPP1* n'a été constatée en dépit de la surexpression du gène *SPNS2*. L'export de la S1P à quant à lui été déterminé grâce à la mise au point une méthode d'étude basée sur une stratégie « fluxomique ». Après exposition des cellules à de la sphingosine marquée (deutérium), la S1P deutérée synthétisée *de novo* et exportée dans le milieu extracellulaire a été quantifié par spectrométrie de masse (LC MS) dans les surnageants de culture cellulaire. Nos résultats objectivent une diminution persistante des capacités de synthèse et/ou d'export de la S1P par les cellules ostéoblastiques MG-63 en présence de fer et ceci malgré la surexpression du gène *SPNS2*.

La S1P contribue à l'acquisition des fonctions de minéralisation de l'ostéoblaste en agissant de manière autocrine et/ou paracrine lors de sa différenciation. Il a également été mis en évidence *in vitro* que la S1P induisait l'expression des récepteurs S1PR1 et S1PR2 pendant la différenciation ostéoblastique (264) . En conséquence, nous avons voulu évaluer le retentissement de la baisse d'efflux cellulaire de S1P sur l'expression de ces trois principaux récepteurs (S1PR1, S1PR2 et S1PR3). Nous avons pour cela déterminé leurs niveaux d'ARNm en présence d'un excès de fer. Nos résultats ont mis en évidence une baisse d'expression importante du gène *S1PR1* et dans une moindre mesure du gène *S1PR3*.

Synthèse des résultats obtenus

Au total, nos travaux ont permis de démontrer que le fer était capable d'induire l'expression du gène *SPNS2* dans la lignée ostéoblastique humaine MG-63. La recherche d'un mécanisme similaire dans d'autres types cellulaires n'a pas montré de résultats équivalents. L'altération ostéoblastique provoquée par l'excès de fer et objectivée par la baisse d'expression du gène *COL1A1* n'a pas été modifiée par l'inhibition ciblée du gène *SPNS2*. L'action du fer sur ce constituant de la matrice osseuse n'est donc pas directement dépendante de la surexpression de *SPNS2*. L'étude fluxomique réalisée en vue d'évaluer les capacités de synthèse et d'export de la S1P a montré qu'en situation de surcharge en fer, les cellules MG-63 réduisaient la synthèse et/ou l'efflux de S1P élaborée à partir d'un précurseur marqué (sphingosine). La baisse d'expression des gènes *S1PR1* et *S1PR3* évoque dans ce contexte une baisse de l'activité autocrine/paracrine de la S1P. La surexpression concomitante du gène *SPNS2* (dont la protéine permet l'export de la S1P) suggère quant à elle que l'induction transcriptionnelle de ce gène est fonctionnellement inefficace ou réactionnelle à la baisse de S1P extracellulaire. L'association de l'ensemble de ces éléments suggère que le fer modifie l'homéostasie de la voie de signalisation S1P/S1PR, élément central de régulation des processus ostéoblastiques. Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives quant à la compréhension des mécanismes mis en jeu lors des pertes osseuses associées aux surcharges en fer.

Iron excess upregulates *SPNS2* mRNA levels but reduces Sphingosine-1-Phosphate export in human osteoblastic MG-63 cells

Lucas Peltier^{1,2,3}, Claude Bendavid^{1,2,3}, Thibault Cavey^{1,2,3}, Marie-Laure Island², Mathilde Doyard², Patricia Leroyer², Coralie Allain², Marie De Tayrac^{3,4,5}, Martine Ropert^{1,2}, Olivier Loréal^{2,3}*, Pascal Guggenbuhl^{2,3,6}* §

¹ CHU Rennes, Service de Biochimie – Toxicologie, F- 35033 Rennes, France

² INSERM, INRA, Univ Rennes1, Univ Bretagne Loire, Nutrition, Metabolism, and Cancer, Rennes, France

³ Université Rennes 1, Faculté de Médecine, F-35043 Rennes, France

⁴ CNRS, UMR 6290, Institut de Génétique et Développement de Rennes (IGdR), Rennes F-35043, France

⁵ CHU Rennes, Service de Génétique Moléculaire et Génomique, Rennes F-35033, France

⁶ CHU Rennes, service de Rhumatologie, F- 35203 Rennes, France

* These two authors contribute equally to the manuscript

§ Corresponding authors

Abbreviations (as footnote for first page of article):

C16d3Carn: deuterated C16d3 palmitoyl–carnitine

DFO: desferrioxamine

FAC: ferric ammonium citrate

FCS: fetal calf serum

GH: genetic hemochromatosis

IREs: iron responsive elements

MEM: minimum essential medium

S1P: sphingosine-1-phosphate

S1Pd7: deuterated sphingosine-1-phosphate d7

S1PR: sphingosine-1-phosphate receptor

Sphd7: deuterated sphingosine d7

Conflict of interest: The authors state that they have no conflicts of interest regarding this work.

Numbers of words/characters in the abstract and manuscript: 119 words (abstract), 3564 words (manuscript)

Number of figures and tables: 8 Figures (black/white)

Abstract

Iron excess favors the development of osteoporosis, but the mechanisms involved are still unclear. We studied iron-related osteoporosis using the osteoblastic MG-63 cell line and showed that iron exposure strongly increased the mRNA level of the *SPNS2* gene, which encodes a sphingosine 1-phosphate (S1P) exporter. We investigated its potential impact on S1P efflux and showed an unexpected concomitant decrease in the cellular capacity to export S1P. Iron excess did not modulate *SPHK1*, *SPHK2*, *SGPL1*, or *SGPP1* gene expression, but decreased *S1PR1* mRNA levels, suggesting a functional repercussion of low extracellular S1P concentration on the S1P/S1PR signaling axis. Overall, these results suggest that iron affects the bone associated S1P process and favors the occurrence of osteoporosis during chronic iron overload.

Highlights

- Iron exposure increased *SPNS2* mRNA levels in the MG-63 osteoblastic cell line
- A Fluxomic assay to study cellular S1P synthesis and export was performed
- Extracellular S1P levels of MG-63 cells were decreased by iron exposure
- The S1P/S1PR1 signaling axis of MG-63 cells is affected by iron excess

Key words: osteoblast, osteoporosis, iron, hemochromatosis, sphingosine-1-phosphate, *SPNS2*

1. Introduction

Osteoporosis is a systemic skeletal disease characterized by decreased bone mineral density and/or bone microarchitecture impairment (1) as a consequence of an imbalance between the coupled activities of bone formation and resorption in the remodeling process. Both activities, supported by osteoblasts and osteoclasts, respectively, are tightly regulated and must be coordinated in both space and time to maintain bone integrity. The breakdown in bone homeostasis involved in osteoporosis can occur on either side of this system and is the hallmark of physiological and pathological conditions such as aging, hypogonadism, thyrotoxicosis, hyperparathyroidism, and glucocorticoid treatment (2).

Chronic iron overload in humans, especially during genetic hemochromatosis (GH) is associated with bone loss (3–5). Osteoporosis in GH has been historically linked to hypogonadism caused by pituitary iron deposition (6,7). However, it has been recently shown that iron overload can exert its deleterious effects on bone homeostasis independently of the gonadal status in GH (8,9). Such findings have also been observed in patients exhibiting secondary iron overload, such as those with thalassemia (10–13) or sickle cell anemia (14,15). Increased body iron storage has also been associated with detrimental effects on bone during aging, especially in post-menopausal women (16).

In vivo experimental data have highlighted the adverse effects of iron excess on bone. A genetic mouse model of hemochromatosis showed bone microarchitecture impairment, decreased bone formation, and increased osteoclast number in association with abnormal iron deposits at the trabecular surface (17,18). Similar results were obtained with an exogenous iron overload mouse model, which exhibited changes in bone composition and decreased trabecular and cortical thickness, with increased bone resorption (19). Other *in vivo* models also support the hypothesis of iron-related bone impairment in rat (20,21), minipig (22), and zebrafish (23).

Despite much *in vivo* data supporting a direct effect of iron on bone remodeling, the molecular mechanisms leading to disrupted bone homeostasis are yet to be fully elucidated. *In vitro*, iron exposure of both osteoblast (24–27) and osteoclast (28,29) cell models induce phenotypic and functional impairment, but the mechanisms of the effect of iron excess on bone cell physiology is not well characterized.

Our objective was to study the impact of excess iron on osteoblast biology and characterize the molecular mechanisms involved. We took advantage of a transcriptomic study previously performed by our group on osteoblast-like MG-63 cells to identify iron-modulated genes, which revealed that *HHIPL2* mRNA levels were downregulated by iron (24). Other iron-modulated genes of interest were identified in this study and were reported in the corresponding microarray data reference (accessible from the Gene

Expression Omnibus (GEO) repository under series accession number GSE (30774)) (24). Among these candidate genes, the mRNA levels of *SPNS2*, which encodes a transporter of the sphingosine 1-phosphate (S1P) signaling lipid (30), increased in the presence of excess iron and was thus a potential gene of interest. S1P is involved in many cell processes such as migration, proliferation, growth, and apoptosis (31). Furthermore S1P is involved in the control of bone homeostasis by promoting osteoblast differentiation (32,33), controlling osteoclast precursor trafficking (34,35), and contributing to coupling activities between osteoblasts and osteoclasts (36).

The aim of this study, performed on the osteoblast-like MG-63 cell line, was to characterize the impact of iron on *SPNS2* expression and analyze its potential impact on S1P efflux and the S1P/S1PR signaling pathway.

2. Materials and methods

2.1. Cell Culture

2.1.1. *Culture of MG-63 Cells*

Osteoblast-like MG-63 cells were grown in MEM (Minimum Essential Medium) (Sigma[®]) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (Lonza[®]) 2 mM L-Glutamine, 1% non-essential amino acids, 100 UI/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin (Thermo Scientific[®]). Cells were seeded at $3 \cdot 10^4/\text{cm}^2$ in a six-well plate and maintained at 37°C under 5% CO₂. When cells reached confluence, ferric ammonium citrate (FAC) and/or desferioxamine (DFO) (Sigma[®]) were added, or not, each day for three days.

2.1.2. *Culture of Human hepatoma HepG2*

Hepatoma HepG2 cells were grown in MEM alpha (Thermo-Scientific[®]) supplemented with 10% FCS, 2 mM L-Glutamine, 1% non-essential amino acids and sodium pyruvate, 100 UI/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin (Thermo Scientific[®]). Cells were seeded at $2 \cdot 10^5/\text{cm}^2$ in six-well plates and maintained at 37°C under 5% CO₂. After 24 h, cells were treated, or not, by daily FAC and/or DFO addition for 24 or 72 h.

2.1.3. *Culture of Human Caco-2 cell lines*

Enterocyte-like Caco-2 cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco[®]) supplemented with 10% FCS, 2 mM L-Glutamine, 1% non-essential amino acids and sodium pyruvate, 100 UI/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin (Thermo Scientific[®]). Cells were seeded at $1 \cdot 10^5/\text{cm}^2$ in a six-well plate and maintained at 37°C under 5% CO₂ for three weeks to obtain differentiated Caco-2 cells, as described previously (37). After 24 h, cells were treated, or not, by daily FAC and/or DFO addition for 24 or 72 h.

2.2. Animals

2.2.1. *Hfe* knock-out mouse model of genetic hemochromatosis

Male C57BL/6 *Hfe*^{-/-} mice (1 year of age, n = 6) were used in this study. Male C57BL/6 *Hfe*^{+/-} mice (1 year of age, n = 6) were used as controls. Mice were maintained in the animal facilities (ARCHE) of the UMS Biosit in Rennes under standard conditions of temperature, atmosphere, and light. The animals had free access to tap water and food (standard CRM (E) diet from Special Diets Services[®]).

2.2.2. *Carbonyl iron-supplemented C57BL/6 wild-type mice*

Four-week-old Male C57BL/6 wild type mice were obtained from the Centre d'Élevage Robert Janvier (Le Genest St Isle, France). Twelve mice (six per group) were maintained in animal facilities of INSERM unit U991 under standard conditions of temperature, atmosphere, and light. All animals had free access to tap water and food (standard RM (E) diet from Special Diets Services[®]). The six mice receiving an iron overloaded diet were fed 3% carbonyl iron (Sigma[®]) supplemented food for four months.

All blood samples were obtained by intracardiac puncture into sodium heparin tubes. Mice were sacrificed and the livers dissected, weighed, quickly frozen in liquid nitrogen, and stored at – 80°C. The studies were approved by the Rennes ethical committee for animal experimentation (approval number 2007-OL-02 & 2007-OL-03).

2.3. Iron determination

2.3.1. *Plasma iron quantification*

Plasma iron was measured at the Rennes Hospital Biochemistry Laboratory on a Cobas c502 analyzer (Roche Diagnostic[®]) using a colorimetric assay based on the FerroZine method without deproteinization (reference 03183696).

2.3.2. Liver iron quantification

Liver samples were desiccated for 15 h at 120°C. Then, dried samples were weighed and mineralized in nitric acid solution (Fisher Chemical-Optima Grade[®]) in special polypropylene tubes for 2 h at 110°C in a heating block. Specimens were preserved between 2-8°C until iron quantification. Iron (⁵⁶Fe) was measured by ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) on an X-Series II (Thermo Scientific[®]) equipped with collision cell technology, as previously described (38) (Platform AEM2, University of Rennes 1/University Rennes Hospital Biochemistry Laboratory). Results are expressed as micromoles of iron per gram of dry liver weight.

2.4. Quantitative RT-PCR

Total RNA from cell lines was extracted using the SV Total RNA Isolation System (Promega[®]). Total RNA from mouse liver was isolated using the NucleoSpin[®] 8 RNA system (Macherey-Nagel[®]) on a Starlet automated extraction system (Hamilton[®]). Quality controlled RNA (1 µg) was used for reverse transcription, following the manufacturer's protocol (High Capacity cDNA Reverse transcription kits, Applied Biosystems[®]). We performed quantitative PCR in duplicate using qPCRMasterMixPlus for SYBR[®] Green, according to the manufacturer's instructions (Eurogentec[®]). Quantitative RT-PCR was performed on an ABI PRISM StepOne sequence detection system (Applied Bioscience[®]). Each mRNA sample threshold cycle (Ct) value was normalized to *HPRT1* mRNA Ct values. Primer sequences used for the mRNA amplifications are described in supplementary data. The results are expressed as percentages relative to the control culture (100%).

2.5. Inhibition of *SPNS2* gene expression

Two *SPNS2*-specific siRNAs (si1 = 5'-CGCUUCAACAGGAAGGUGA-3'; si2 = 5'-CCUCUUCACCAAGAACACG-3') and one control siRNA (cat. No.4390844) were used. MG-63 cells were transfected 24 h after plating in OPTI-MEM[®] medium (Thermo-Scientific[®]), without antibiotics, using Transfectin (Biorad[®]), according to the manufacturer's instructions. Cell cultures were analyzed after confluence and three-days FAC treatment as described above.

2.6. Determination of Sphingosine-1-Phosphate efflux

Extracellular S1P secretion was determined using the deuterated S1P precursor, sphingosine d7 (Sphd7) (Avanti Polar Lipids). MG-63 cells were incubated with special FCS-free media containing 5 μ M of Sphd7. After 20 min of exposure at 37°C under 5% CO₂, Sphd7 enriched media was replaced by fresh FCS-free media. Export of produced deuterated sphingosine-1-phosphate d7 (S1Pd7) was determined in FCS free media collected after 30 min, 1 h, and 2 h. Each extracellular S1Pd7 concentration was determined in triplicate in three separate experiments.

2.7. Quantification of deuterated Sphingosine-1-Phosphate

The quantification protocol was adapted from the publication of Bielawski *et al.* (39). Briefly, cell culture supernatants were fortified with an equal amount of Acylcarnitine Internal Standard (Chromsystems) and extracted with an iso-propanol/ethyl-acetate mixture (15:85; v:v). Organic extracts were evaporated under reduced pressure in a Speed-Vac and reconstituted in 100 μ L mobile phase. Analyses were performed using a Liquid Chromatography-High Resolution-Mass Spectrometer (LC-HR-MS) QExactive™ (Thermo Scientific). An HESI-II ion source was used for electrospray ionization. Chromatographic separation of the analytes was performed with an Accela 600 pump (Thermo Scientific) equipped with a Thermo Scientific C8 Accucore column (150 x 3 mm, 2.6 μ m). The mobile phase consisted of a gradient of methanol, water with 0.3% (v/v) formic acid, and water with 100 mM ammonium formate. Calibration curves were obtained by spiking cell culture media with S1Pd7 standards at 0.01 to 10 nM. Data were acquired in positive Full MS scan mode, extracting the exact mass peak areas of protonated S1Pd7 (+387.3000m/z) and internal deuterated standard C16d3 Palmitoyl-Carnitine (C16d3Carn) (+403.36097m/z), using a 5-ppm mass window. Quantification was performed by acquiring one ion transition for each compound in fragmentation mode (S1Pd7: +387.3000 >+ 271.3119m/z and C16d3Carn: +403.36097 > +85.0291m/z). Retention times were 4 min for C16d3Carn and 4.1 min for S1Pd7. Quantification was performed using TraceFinder Software (Thermo Fischer Scientific). Calibration curves were constructed by plotting the peak area ratios of fragmented S1Pd7 and fragmented C16d3Carn using a quadratic regression model.

2.8. Prediction of Iron Responsive Elements sequences

The search for Iron Responsive Element (IRE) sequences was performed using the SIREs web server tool (40).

2.9. Statistical analysis

Results are expressed as the mean \pm SD. Data were analyzed using Graph Pad Prism software (Version 7, Graph Pad®). Statistical differences between means were evaluated using a nonparametric one-way analysis of variance Kruskal-Wallis test, followed, when appropriate, by a Mann-Whitney test for paired comparisons; $p < 0.05$ was considered to be significant.

3. Results

3.1. Iron exposure of MG-63 cells modulates the intracellular iron status

We evaluated the effect of FAC exposure on mRNA levels of *TFRC*, which contains IREs in the 3'UTR sequence, to confirm efficient modulation of intracellular iron status under our experimental *in vitro* conditions. As shown previously (24), *TFRC* mRNA levels significantly decreased upon iron (FAC) exposure, in a dose-dependent manner, starting from 10 μ M, showing that the level of cytoplasmic iron increased in MG-63 cells (**Fig. 1**). Conversely, iron chelator exposure (DFO) induced a strong increase of *TFRC* mRNA levels which was neutralized by addition of an equimolar dose of FAC. Overall, these data demonstrate that we were able to modulate the intracellular iron pool under our conditions.

3.2. Iron increases *SPNS2* expression in MG-63 cells

A microarray study, previously performed to identify genes associated with iron excess in MG-63 cell lines (24), showed a significant increase of *SPNS2* mRNA levels in the presence of FAC. We confirmed these data by quantitative RT-PCR in independent experiments and showed that MG-63 exposure to increasing FAC concentrations induced a significant and dose-dependent increase in *SPNS2* mRNA levels from 2.5 to 40 μ M (from 135% to 1,823% of the control condition) (**Fig. 2A**). Conversely, the iron chelator DFO did not modify *SPNS2* mRNA expression, but neutralized FAC induction of *SPNS2* mRNA levels, confirming the specificity of iron related mechanisms in MG-63 cells. We further characterized iron-related regulation of *SPNS2* by studying the kinetics of *SPNS2* expression under conditions of iron excess and showed that iron-mediated upregulation of *SPNS2* was also time-dependent (**Fig 2B**) and required daily renewal of FAC supplemented medium to be efficient (**Fig. 2C**).

3.3. Iron does not regulate *SPNS2* mRNA levels in other cell types

We verified the specificity of the increase in *SPNS2* mRNA levels in the osteoblast-like cell line by analyzing the effect of FAC exposure on two other cell lines. We investigated two *in vitro* models of hepatocytes and enterocytes, which are strongly involved in the control of body iron content and distribution (41). Neither Human Hepatoma HepG2 cells nor enterocyte-like Caco-2 cells regulated *SPNS2* expression in response to 24 or 72 h FAC exposure (**Figs. 3A & B**). The association of a concomitant decrease in *TFRC* mRNA levels confirmed that intracellular iron content increased and *de facto* the absence of *SPNS2* iron-related regulation in HepG2 and Caco2 cells.

Furthermore, we investigated hepatic *Spns2* mRNA levels in two iron overload mouse models. In *Hfe*^{-/-} mouse model, that mimics endogenous iron overload of GH, we found, as expected, that plasma and liver iron concentrations were significantly higher in *Hfe*^{-/-} mice

than control animals (*Sup. data*). In addition *Tfrc* mRNA levels were significantly lower in the livers of *Hfe*^{-/-} mice. However, there was no modulation of *Spns2* mRNA level in the hepatic tissue, despite hepatic iron overload (**Fig. 4A**). We also investigated liver *Spns2* mRNA expression in an exogenous iron overload mouse model induced by carbonyl-iron supplementation in the diet (42). Hepatic *Tfrc* mRNA levels were lower in carbonyl iron-supplemented mice than controls, whereas plasma and liver iron concentration were significantly higher (*Sup. data*). There was no modulation of *Spns2* mRNA levels in iron overloaded hepatic tissue (**Fig. 4B**), similar to the genetic iron overload *Hfe*^{-/-} mouse model.

3.4. Impact of iron and *SPNS2* silencing on *COL1A1* mRNA levels

Decreased collagen type I chain (*COL1A1*) mRNA levels is a common feature of iron-exposed osteoblastic cells (24,26,27). Similarly we found that FAC exposure decreased *COL1A1* mRNA levels in our MG-63 model. Indeed, there was a significant decrease of *COL1A1* expression starting from 20 μ M FAC, which was suppressed by DFO addition (**Fig. 5**). It is noteworthy that we did not find putative IREs in the 3'UTR of the *COL1A1* mRNA.

Because *SPNS2* mRNA levels were concomitantly upregulated by similar FAC exposition we further investigated whether modulation of *SPNS2* expression effected *COL1A1* mRNA expression. We first ensured that control siRNA did not modify the previous results (**Fig. 6A**) and demonstrated that efficient inhibition of *SPNS2* mRNA expression by specific siRNAs induced a decrease of *COL1A1* mRNA levels in the absence of iron excess (**Fig. 6B**). Conversely, there was no difference of *COL1A1* mRNA levels between si*SPNS2*-treated and control cells under conditions of 80 μ M FAC (**Fig. 6C**).

3.5. Expression of S1P regulating enzymes is not modulated by iron in MG-63 cells

The amount of intracellular S1P is tightly regulated by the balance between S1P metabolizing enzyme activities (43). Bradley *et al.* (44) reported a modification in the expression of key S1P enzymes in response to *SPNS2* overexpression. Thus, we investigated whether iron exposure can modify the mRNA levels of these enzymes in MG-63 cells. Sphingosine kinase isoenzymes *SPHK1* and *SPHK2*, sphingosine lyase *SGPL1*, and sphingosine phosphatase *SGPP1* mRNA levels were not significantly altered by iron excess (*Sup. data*). These results suggest that the enzymatic cellular S1P rheostat was not modified by iron excess and associated upregulation of *SPNS2* mRNAs.

3.6. Impact of iron exposure on S1P export in MG-63 cells

The association of unaltered expression of S1P regulating enzymes and *SPNS2* upregulation led us to investigate S1P export in the presence of iron excess. We performed a fluxomic assay that allowed us to determinate deuterated S1P synthesis and export after exposure to deuterated Sphingosine (Sphd7). We evaluated the capacity of MG-63 cells to synthesize and export S1P by measuring the concentration of S1Pd7 in cell supernatants at 30 min, 1 and 2 h after 72 h of exposure to 40 μ M FAC and observed a significant and persistent decrease in the S1Pd7 concentration in cell supernatants at each time point (**Fig. 7**). These results show that the ability of MG-63 cells to synthesize and export S1P after iron exposure was reduced, despite an increase of *SPNS2* mRNA levels.

3.7. Iron exposure decreased *S1PR1* and *S1PR3* mRNA levels in MG-63 cells

S1PR1/R2 mRNA levels have been reported to be upregulated by S1P exposition during osteoblast differentiation (32,33). Thus, we investigated whether iron exposure effected the mRNA levels of these S1P G-protein-coupled receptors present in most cells (45). We evaluated *S1PR1* - *S1PR2* - *S1PR3* mRNA levels after 72 h of exposure to 40 μ M FAC and found that *S1PR1* gene expression strongly decreased (53% of control condition). *S1PR2* mRNA levels were not modified and *S1PR3* mRNA levels were slightly reduced by iron exposure (**Fig 8**).

Discussion

Osteoporosis may complicate iron overload, as reported in clinical and animal studies. However, the cellular mechanisms involved remain unclear. Bioactive lipids, including S1P, were recently highlighted to play a major role in bone physiology (46,47). During the past decade, S1P appeared to be a key point in bone remodeling by supporting osteoblast differentiation (32,33,48–50), trafficking of osteoclast precursors (34,35), osteocyte mechanotransduction (51), and, more generally, coupling of bone remodeling processes (36,52,53). Intracellularly generated S1P is unlikely to spontaneously flip-flop within cell membranes due to its polar head group and needs transporters to be exported (54). Some S1P exporters have been identified, including a 504-amino acid protein encoded by the *SPNS2* gene (55), which we showed to be potentially iron regulated in MG-63 cells in a previous transcriptomic study. Taken together, these data drove us to investigate the relationship between iron excess, *SPNS2* gene expression, S1P efflux, and the S1P/S1PR signaling pathway in the MG-63 osteoblast-like cell line.

Our data show that *SPNS2* mRNA levels were strongly induced by iron exposure in MG-63 cells. Moreover, the upregulation of *SPNS2* was dose- and time-dependent starting at a very low dose of added iron (2.5 μ M FAC). As previously described we concomitantly showed that these low doses did not decrease *TFRC* mRNA levels below 10 μ M added FAC (24). These results indicate that the iron related *SPNS2* transcriptional upregulation system is effective for low iron concentrations that did not affect the activity of iron responsive proteins (IRPs). Iron exposure did not affect *SPNS2* mRNA levels in HepG2 or Caco2 cell models, in contrast to MG-63 cells, despite the *SPNS2* gene being expressed in many tissues, including liver and small intestine (56), which are a cornerstone of iron regulation in the body. Our *in vivo* data in mice iron overload models also did not show an effect on hepatic *Spns2* mRNA levels. Overall, these data suggest that the effect of iron excess on *SPNS2* mRNA levels: i) takes place before activation of IREs/IRP-coordinated control of the cytoplasmic labile iron pool, ii) is cell-type specific, and iii) could be based on an undetermined highly-sensitive iron-dependent mechanism.

Concomitantly to *SPNS2* mRNA increase, we found that *COL1A1* mRNA levels were significantly reduced in response to iron exposure in MG-63 cells as described in several osteoblast models (24,26,27). This result seems to conflict with the function of the *SPNS2* protein, which enhances S1P export when overexpressed by transfection (44,56,57). Our data suggest that iron-induced upregulation of *SPNS2* is functionally inefficient to favor S1P export in our model because S1P normally promotes osteoblast differentiation (32,33,48–50). Moreover Higashi & *al.* (33) recently demonstrated that S1P enhanced *S1PR1* expression in the osteoblast MC3T3-E1 model. Thus, the iron-associated

downregulation of *S1PR1* observed in our model may also suggest that *SPNS2* upregulation is unable to increase or maintain the extracellular S1P concentration. This hypothesis was confirmed by our fluxomic data showing a persistent decrease of S1P in the extracellular medium, despite the increase in *SPNS2* mRNA levels following pre-treatment and exposure of MG-63 cells to iron excess.

These data are consistent with our *SPNS2* siRNA findings showing the inability of *SPNS2* silencing to restore normal *COL1A1* expression under substantial iron exposure. However, our results also show that *SPNS2* and *COL1A1* mRNA levels may be linked under physiological iron concentrations, because inhibition of *SPNS2* transcription led to reduced *COL1A1* expression in absence of iron excess. Overall, these results suggest that S1P synthesis and export by *SPNS2* is efficient under normal conditions, but is ineffective in the presence of iron excess. Upregulation of *SPNS2* expression under conditions of iron excess may be a consequence of extracellular S1P depletion to restore the extracellular concentration of this bioactive lipid. This possibility requires further investigation. Altered *SPNS2* protein synthesis under conditions of iron excess should also be considered.

There was no change in the transcription of key S1P metabolic enzymes (*SPHK1*, *SPHK2*, *SGPP1* and *SGPL1*) under conditions of iron excess. However, post-transcriptional and translational regulation could participate in the decrease of extracellular S1P concentrations, even if the transcription of S1P metabolic enzymes was not significantly modified by iron exposure. Moreover, the biochemical interconnections between the various sphingolipid pathways enable cells to coordinate bioactive lipid cellular content by regulating sphingolipid interconversion (54). It is thus possible that another sphingolipid biochemical pathway could be affected by iron, with an indirect repercussion on S1P synthesis. Links between iron and sphingolipid metabolism have been reported in *Saccharomyces cerevisiae* (58–60) and it has been shown that iron exposure decreases long-chain base sphingolipid yeast content (60). Therefore, it is conceivable that iron may have more global repercussions on sphingolipid metabolism in MG-63 osteoblastic cells, which affect S1P levels.

Conclusions

Our findings show that iron excess increased *SPNS2* mRNA levels in the MG-63 osteoblastic cell line. Unexpectedly, our fluxomic data showed that extracellular S1P levels concomitantly decreased and suggest that the upregulation of *SPNS2* mRNA could be either functionally inefficient or an adaptive mechanism. Furthermore, based on the observed iron associated *S1PR1* and *COL1A1* decrease, the defect in S1P export system seems to have functional consequence on MG-63 cells. These results suggest that iron may affect osteoblast S1P/SPR1 signaling and potentially alter a wide range of bone processes, thus participating in bone impairment in situations of chronic iron overload. These data open a new door for the understanding of mechanisms involved in iron-induced osteoporosis.

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. François Gaboriau and Dr. Lenaick Detivaud for helpful advice and assistance, Claudine Rauch and Brigitte Frenot for technical assistance with cell culture and mass spectrometry, Pr. Véronique David and Dr. Nathalie Le Floc'h for helpful discussions, and Dr. Caroline Moreau for global assistance and support in this project.

Funding

This work was supported by the French Society of Rheumatology (SFR) [grant numbers 2320, 2013].

Fig. 1 Impact of iron exposure on the intracellular iron status in MG-63 cells.

TFRC mRNA levels, measured by RT-qPCR, in cells treated with FAC and/or DFO for 72 h. The results are expressed as a percentage of the control culture (100%). Data are presented as the mean \pm SD of three independent experiments performed in duplicate. Asterisks indicate $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, or $***p < 0.001$ relative to control.

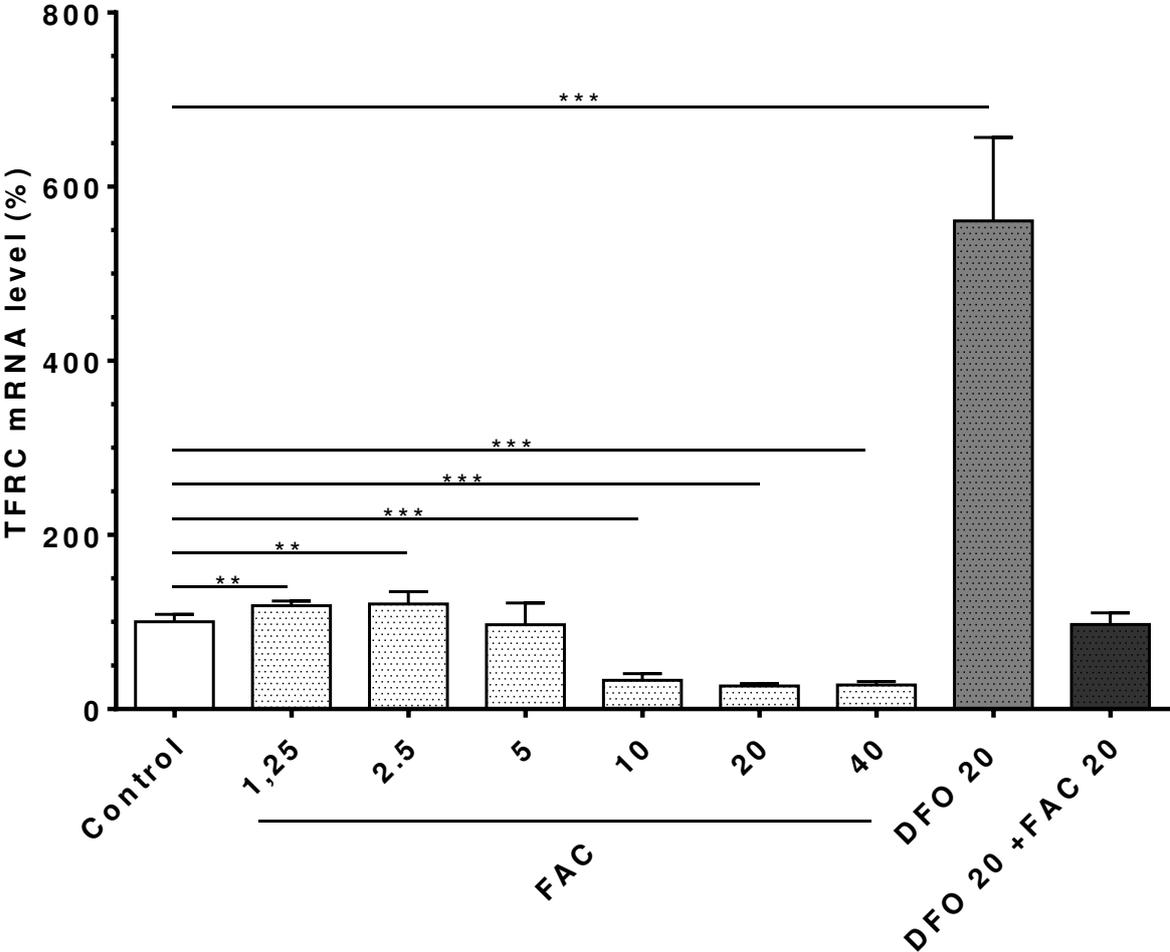


Fig. 2 Impact of iron exposure on *SPNS2* mRNA levels in MG-63 cells.

SPNS2 mRNA levels, measured by RT-qPCR, in cells treated with FAC and/or DFO for 72 h (A), daily levels for 96 h in the presence of 40 μM FAC (B), and with/without daily renewal of the medium and FAC addition for 72 h (C). *SPNS2* mRNA levels are expressed as the percentage of the control culture (100%). Data for figure 2A are presented as the mean ± SD of three independent experiments performed in duplicate. Asterisks indicate **p* < 0.05, ***p* < 0.01, or ****p* < 0.001 relative to control. Values for figures 2B and 2C represent the means ± SD of results from three wells. Data are representative of the results from two separate experiments.

A

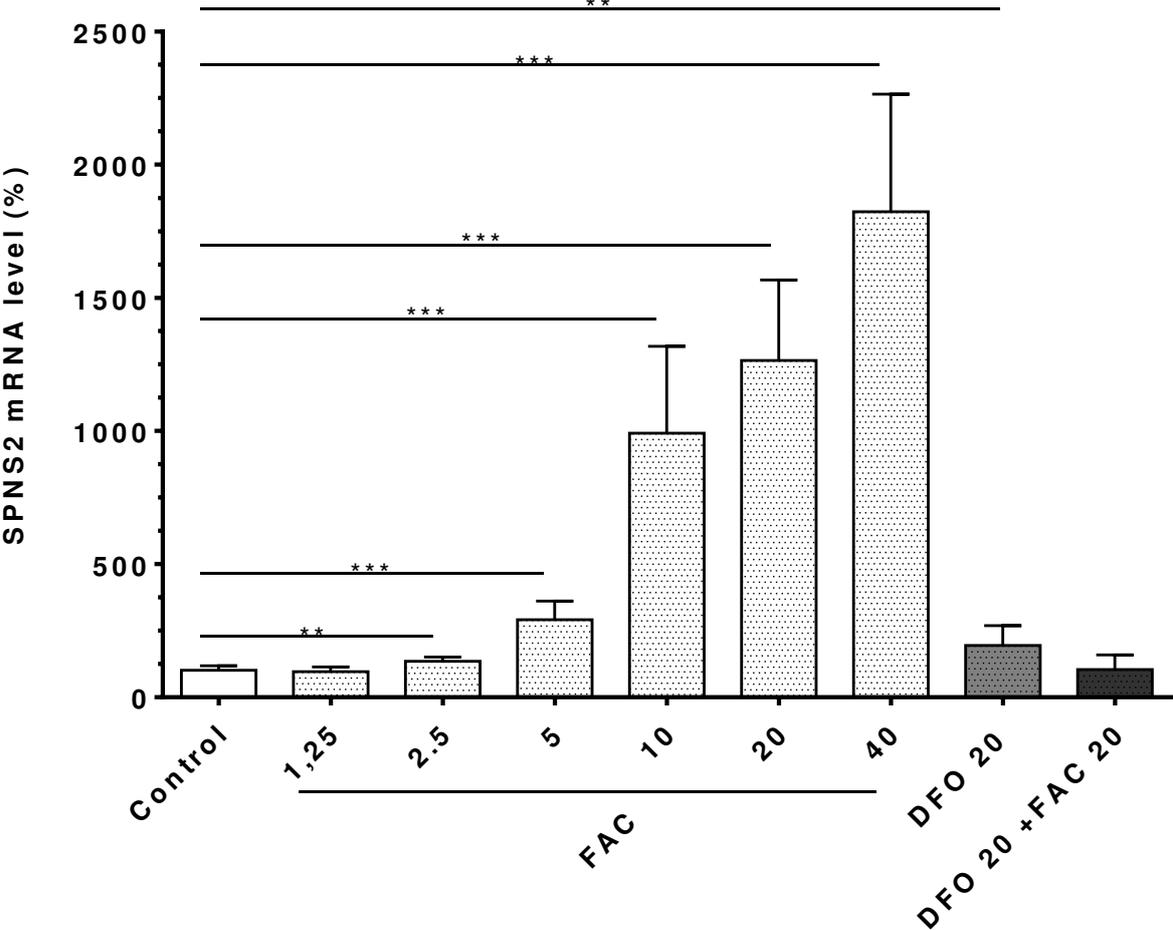
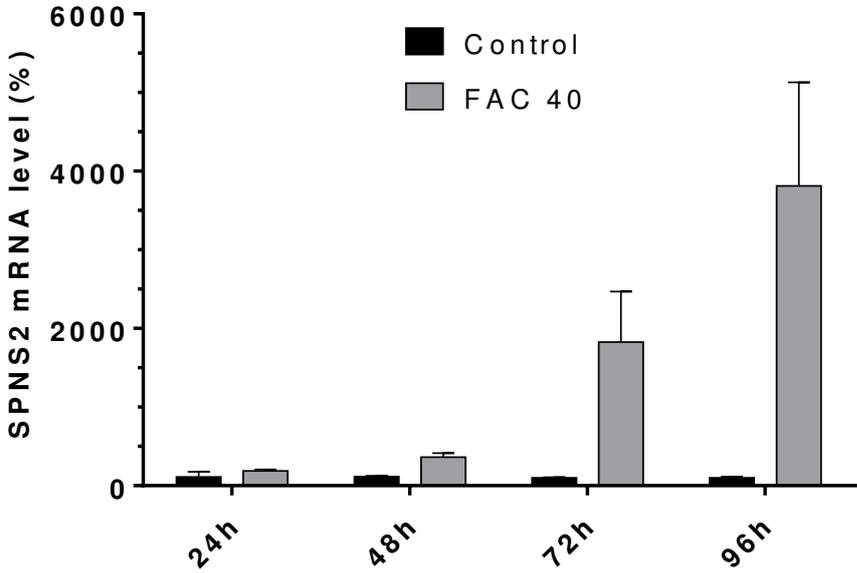


Fig. 2 Impact of iron exposure on *SPNS2* mRNA levels in MG-63 cells (**B & C**)

B



C

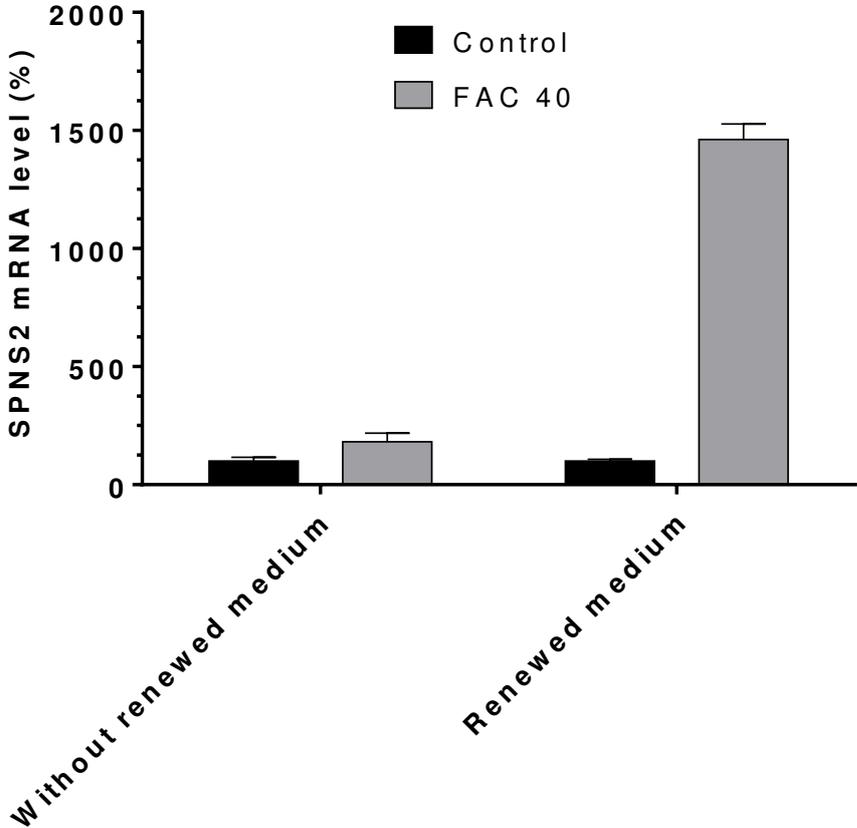
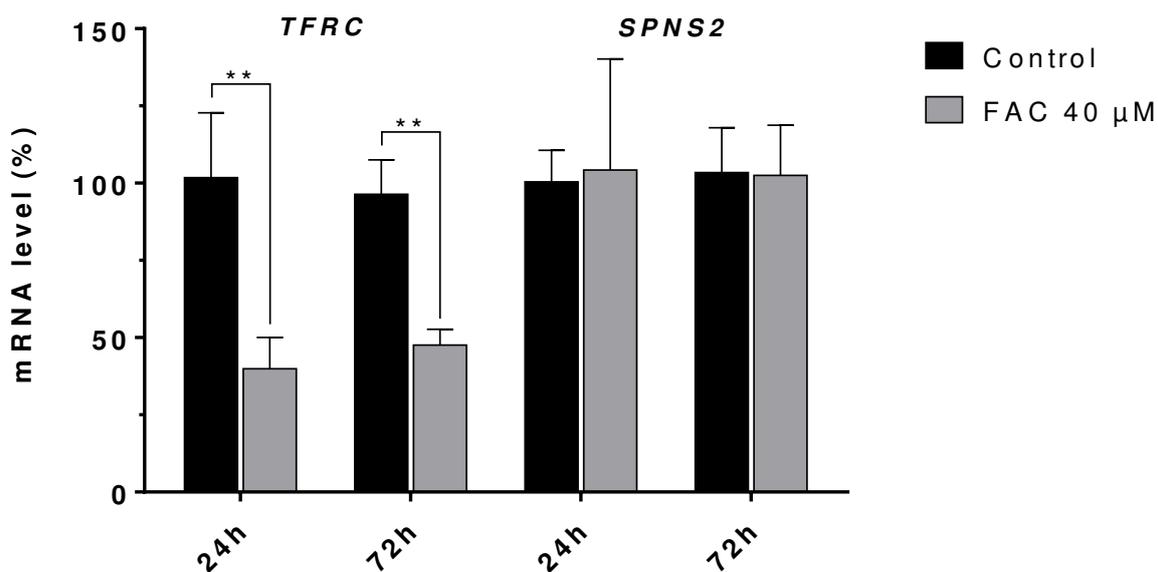


Fig. 3 Impact of iron exposure on *TFRC* and *SPNS2* mRNA levels in HepG2 and Caco-2 cells.

TFRC and *SPNS2* mRNA levels, measured by RT-qPCR, of HepG2 (**A**) or Caco-2 (**B**) cells treated with 40 μ M FAC for 24 or 72 h. The results are expressed as the percentage of the control culture (100%). Data are presented as the mean \pm SD of two independent experiments performed in triplicate. Asterisks indicate * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, or *** $p < 0.001$ relative to control.

A HepG2 cells



B Caco-2 cells

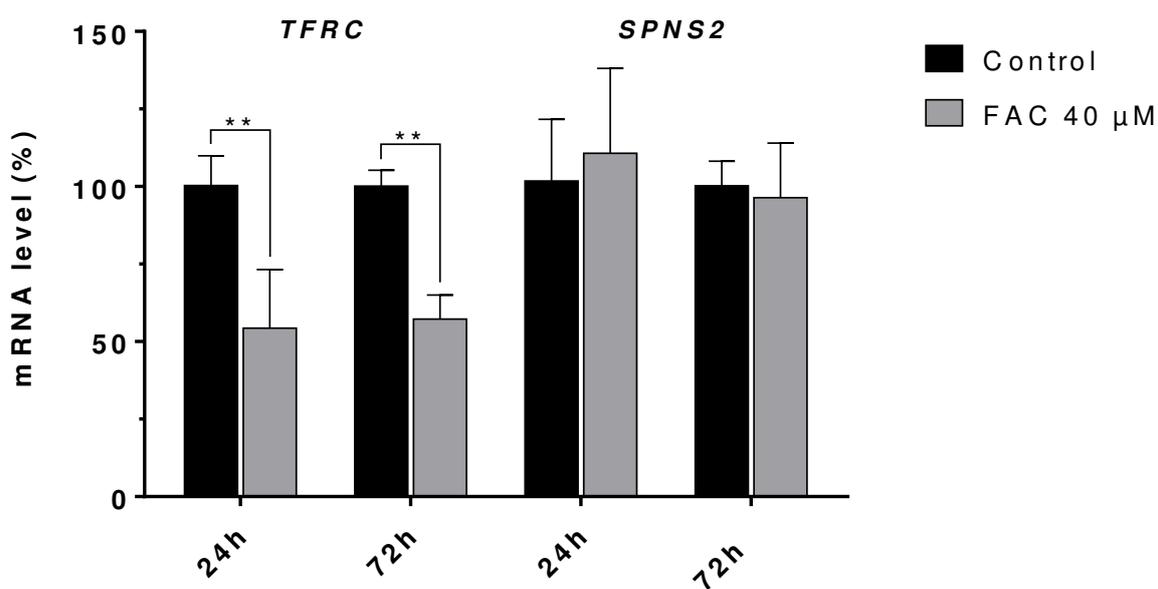
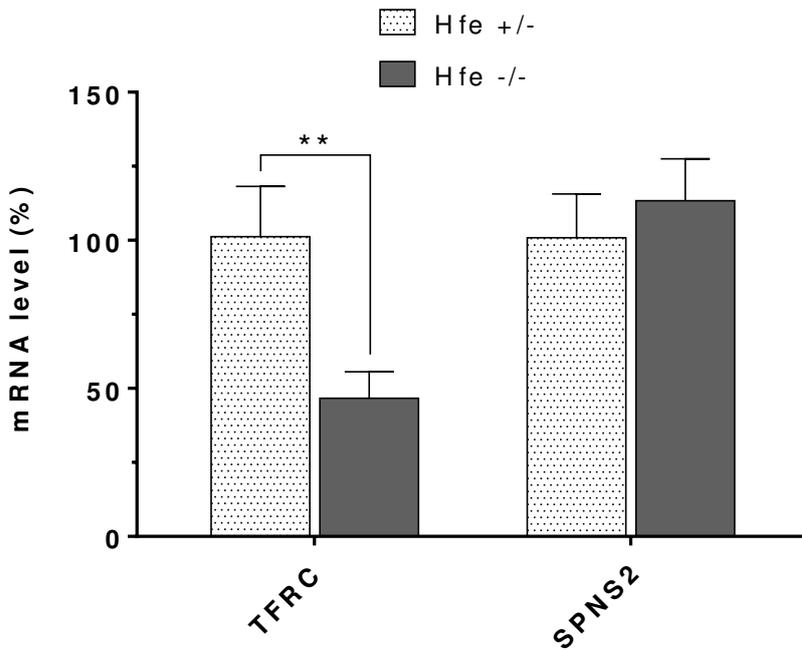


Fig. 4 Impact of iron exposure on liver *Spns2* mRNA levels in iron overload mouse models.

Tfrc and *Spns2* mRNA levels, measured by RT-qPCR, in livers of *Hfe*^{-/-} and *Hfe*^{+/-} mice (**A**) or of mice overloaded with 3% carbonyl iron (**B**). The results are expressed as the percentage of the control mice (100%). Asterisks indicate **p* < 0.05, ***p* < 0.01, or ****p* < 0.001 relative to control.

A *Hfe* knock-out mouse model of genetic hemochromatosis



B Iron carbonyl-supplemented C57BL/6 wild-type mice

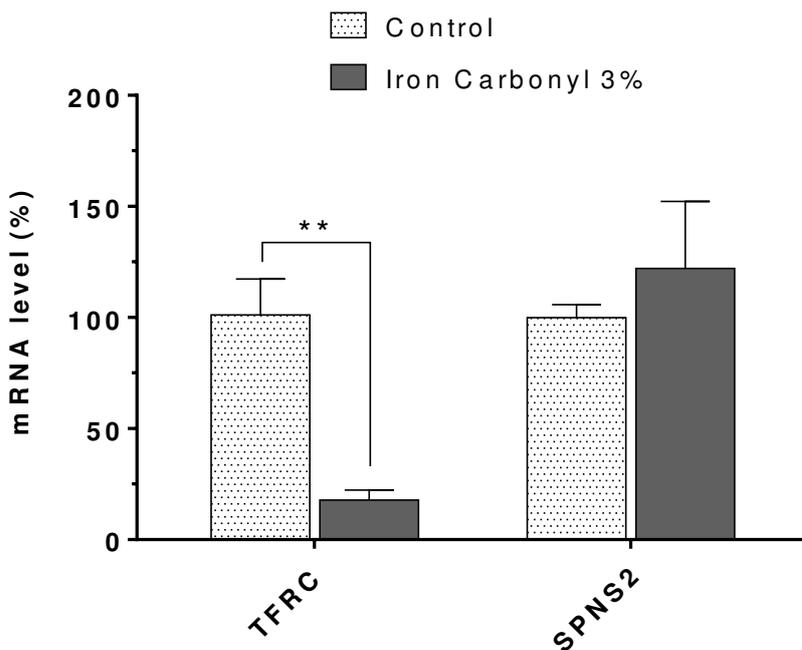


Fig. 5 Impact of iron exposure on *COL1A1* mRNA levels in MG-63 cells.

COL1A1 mRNA levels, measured by RT-qPCR, of cells treated with FAC and/or DFO for 72 h. The results are expressed as the percentage of the control culture (100%). Data are presented as the mean \pm SD of three independent experiments performed in duplicate. Asterisks indicate * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, or *** $p < 0.001$ relative to control.

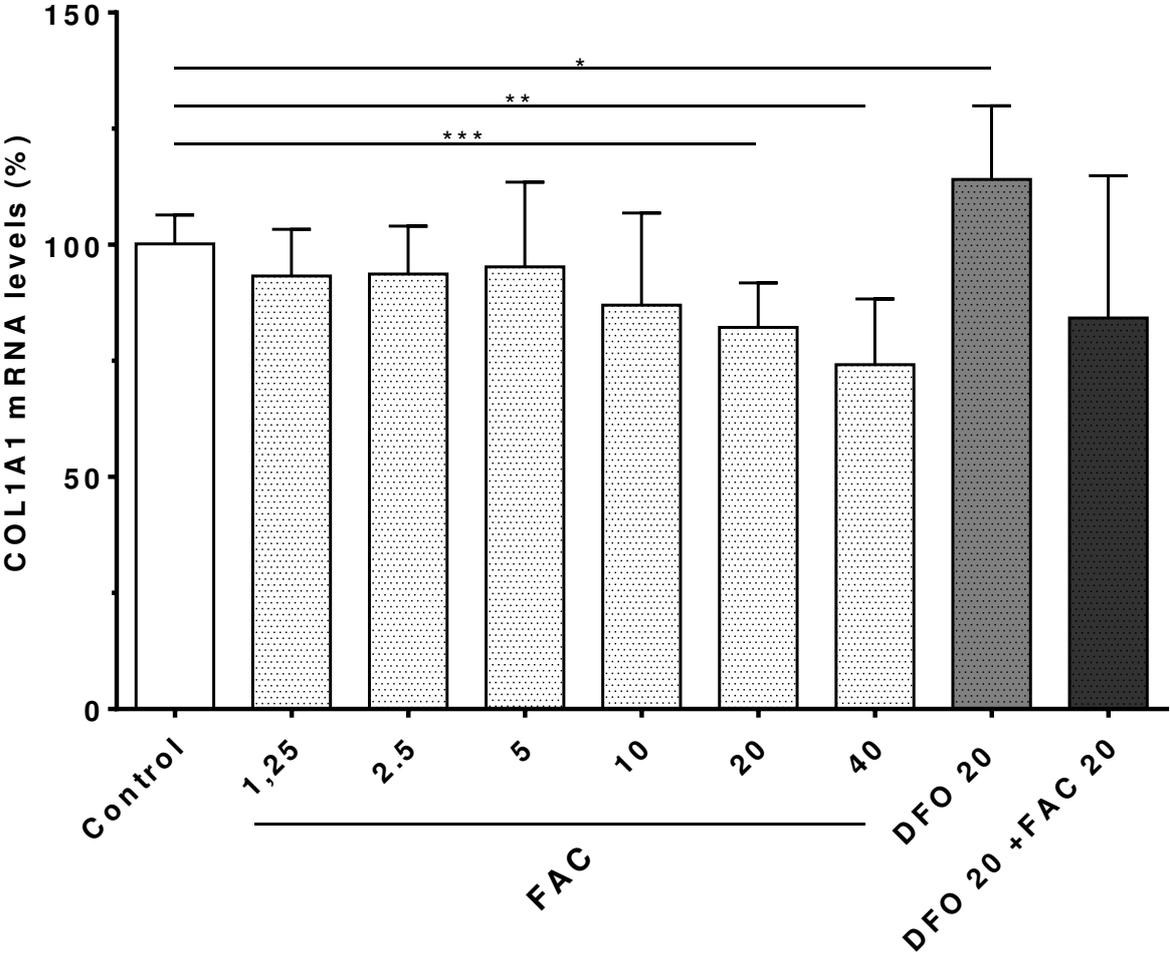
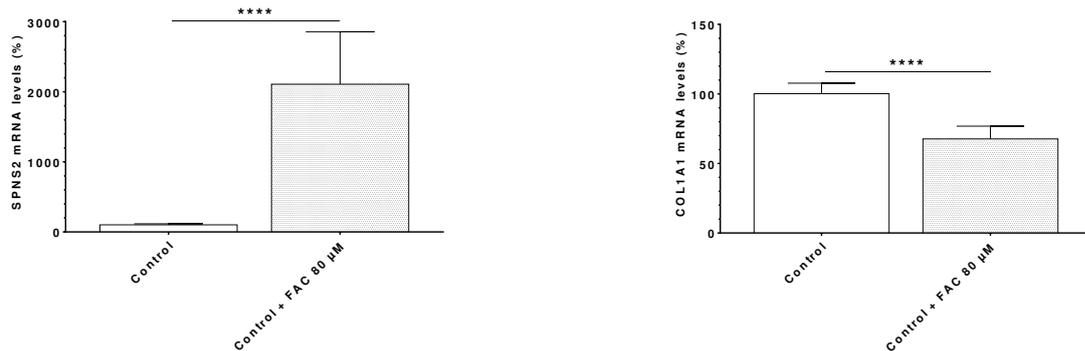


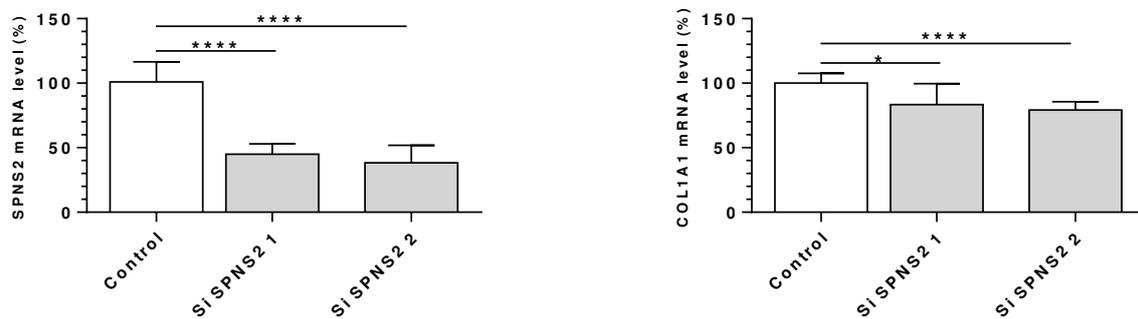
Fig. 6 Relationship between iron and *SPNS2* and *COL1A1* mRNA levels in MG-63 cells.

SPNS2 or *COL1A1* mRNA levels, measured by RT-qPCR, of cells with/without 72 h exposure to 80 μ M FAC, 24 h after transfection with two *SPNS2* specific siRNAs (si1 and si2) or a control siRNA (Control). The results are expressed as the percentage of the control culture (100%). Data are presented as the mean \pm SD of three independent experiments performed in triplicate. Asterisks indicate * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, or **** $p < 0.0001$ relative to control.

A. mRNA levels with control siRNA, with/without 72 h exposure to 80 μ M FAC



B. mRNA levels following treatment with a specific *SPNS2* siRNA



C. mRNA levels following treatment with a specific *SPNS2* siRNA in the presence of 80 μ M FAC

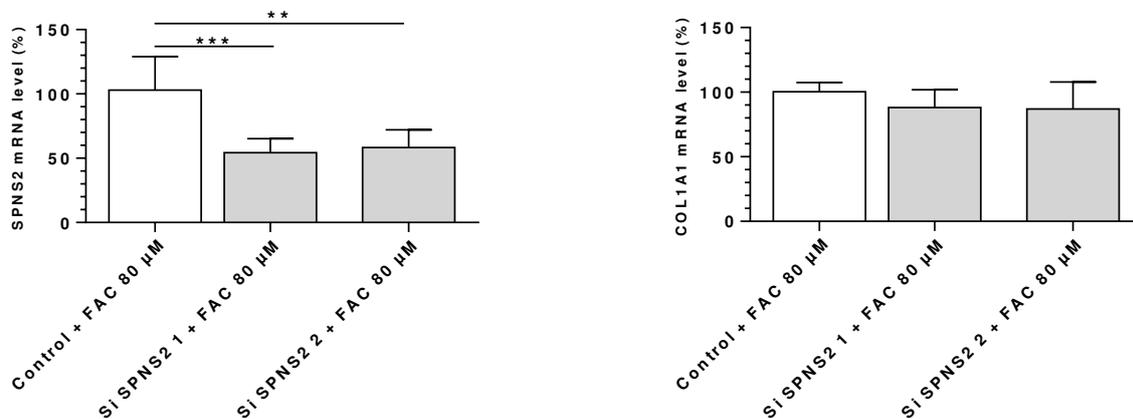


Fig. 7 Impact of iron exposure on S1P export in MG-63 cells.

S1Pd7 quantification in MG-63 cells supernatants treated or not with 40 μ M FAC for 72 h. Media were sampled at 30 min, 1 h, and 2 h after sphingosine d7 exposure. S1Pd7 results were normalized to cell lysate protein content. Data are presented as the mean \pm SD of three independent experiments performed in triplicate. Asterisks indicate * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, or **** p < 0.0001 relative to control.

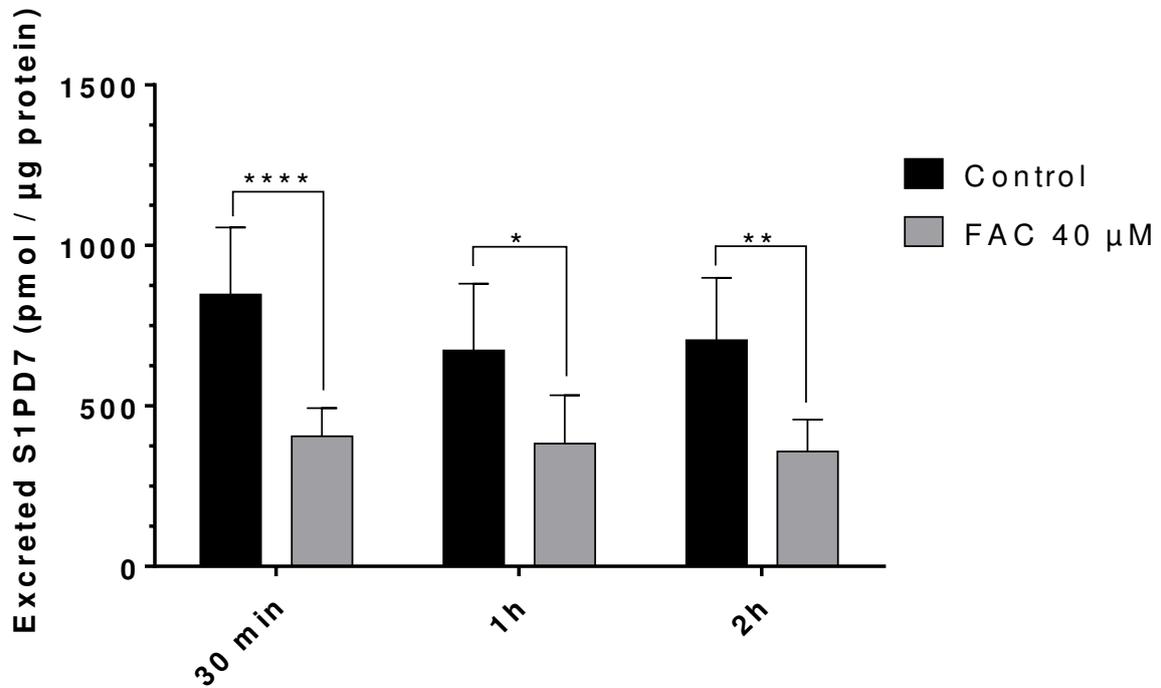
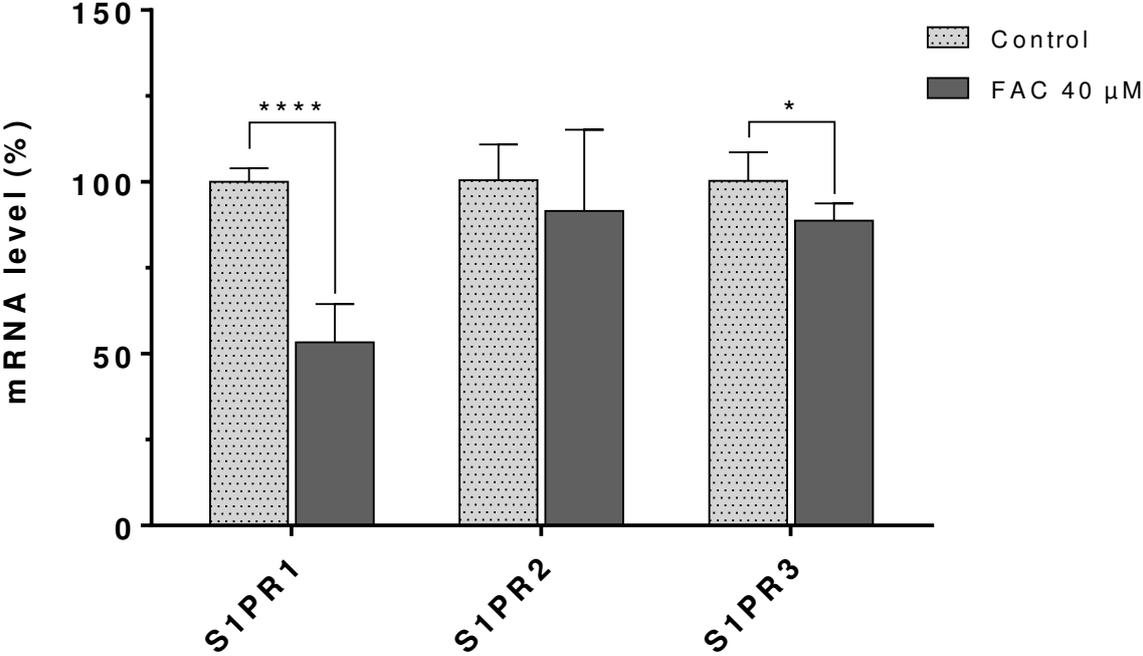


Fig. 8 Impact of iron exposure on S1P receptors in MG-63 cells.

S1PR1, *S1PR2*, and *S1PR3* mRNA levels, measured by RT-qPCR, of cells treated with 40 μ M FAC for 72 h. The results are expressed as the percentage of the control culture (100%). Data are presented as the mean \pm SD of three independent experiments performed in triplicate. Asterisks indicate * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, or **** $p < 0.0001$ relative to control.



Bibliography

1. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. NIH Consens Statement. 2000 Mar 27;17(1):1–45.
2. Zaidi M. Skeletal remodeling in health and disease. *Nat Med*. 2007;13(7):791–801.
3. Delbarre F. [Osteoporosis in hemochromatosis]. *Sem Hôp Organe Fondé Par Assoc Enseign Méd Hôp Paris*. 1960 Dec 20;36:3279–94.
4. Diamond T, Stiel D, Posen S. Osteoporosis in Hemochromatosis: Iron Excess, Gonadal Deficiency, or Other Factors? *Ann Intern Med*. 1989 Mar 15;110(6):430–6.
5. Conte D, Caraceni MP, Duriez J, Mandelli C, Corghi E, Cesana M, et al. Bone involvement in primary hemochromatosis and alcoholic cirrhosis. *Am J Gastroenterol*. 1989 Oct;84(10):1231–4.
6. Stocks AE, Powell LW. Pituitary function in idiopathic haemochromatosis and cirrhosis of the liver. *Lancet Lond Engl*. 1972 Aug 12;2(7772):298–300.
7. Bergeron C, Kovacs K. Pituitary siderosis. A histologic, immunocytologic, and ultrastructural study. *Am J Pathol*. 1978 Nov;93(2):295–309.
8. Guggenbuhl P, Deugnier Y, Boisdet JF, Rolland Y, Perdriger A, Pawlotsky Y, et al. Bone mineral density in men with genetic hemochromatosis and HFE gene mutation. *Osteoporos Int*. 2005 Dec 1;16(12):1809–14.
9. Sinigaglia L, Fargion S, Fracanzani AL, Binelli L, Battafarano N, Varenna M, et al. Bone and joint involvement in genetic hemochromatosis: role of cirrhosis and iron overload. *J Rheumatol*. 1997 Sep;24(9):1809–13.
10. Jensen CE, Tuck SM, Agnew JE, Koneru S, Morris RW, Yardumian A, et al. High prevalence of low bone mass in thalassaemia major. *Br J Haematol*. 1998 Dec;103(4):911–5.
11. Vogiatzi MG, Autio KA, Mait JE, Schneider R, Lesser M, Giardina PJ. Low bone mineral density in adolescents with beta-thalassemia. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1054:462–6.
12. Salama OS, Al-Tonbary YA, Shahin RA, Eldeen OAS. Unbalanced bone turnover in children with beta-thalassemia. *Hematol Amst Neth*. 2006 Jun;11(3):197–202.
13. Baldini M, Marcon A, Cassin R, Ulivieri FM, Spinelli D, Cappellini MD, et al. Beta-thalassaemia intermedia: evaluation of endocrine and bone complications. *BioMed Res Int*. 2014;2014:174581.
14. Sarrai M, Duroseau H, D'Augustine J, Moktan S, Bellevue R. Bone mass density in adults with sickle cell disease. *Br J Haematol*. 2007 Feb;136(4):666–72.
15. Sadat-Ali M, Sultan O, Al-Turki H, Alelq A. Does high serum iron level induce low bone mass in sickle cell anemia ? *Biometals Int J Role Met Ions Biol Biochem Med*. 2011 Feb;24(1):19–22.
16. Kim B-J, Ahn SH, Bae SJ, Kim EH, Lee S-H, Kim H-K, et al. Iron overload accelerates bone loss in healthy postmenopausal women and middle-aged men: a 3-year retrospective longitudinal study. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2012 Nov;27(11):2279–90.

17. Guggenbuhl P, Fergelot P, Doyard M, Libouban H, Roth M-P, Gallois Y, et al. Bone status in a mouse model of genetic hemochromatosis. *Osteoporos Int*. 2011 Aug 1;22(8):2313–9.
18. Doyard M, Chappard D, Leroyer P, Roth M-P, Loréal O, Guggenbuhl P. Decreased Bone Formation Explains Osteoporosis in a Genetic Mouse Model of Hemochromatosis. Pantopoulos K, editor. *PLOS ONE*. 2016 Feb 1;11(2):e0148292.
19. Tsay J, Yang Z, Ross FP, Cunningham-Rundles S, Lin H, Coleman R, et al. Bone loss caused by iron overload in a murine model: importance of oxidative stress. *Blood*. 2010 Oct 7;116(14):2582–9.
20. Liu G, Men P, Kenner GH, Miller SC. Age-associated iron accumulation in bone: implications for postmenopausal osteoporosis and a new target for prevention and treatment by chelation. *Biometals Int J Role Met Ions Biol Biochem Med*. 2006 Jun;19(3):245–51.
21. Matsushima S, Hoshimoto M, Torii M, Ozaki K, Narama I. Iron lactate-induced osteopenia in male Sprague-Dawley rats. *Toxicol Pathol*. 2001 Dec;29(6):623–9.
22. de Vernejoul MC, Pointillart A, Golenzer CC, Morieux C, Bielakoff J, Modrowski D, et al. Effects of iron overload on bone remodeling in pigs. *Am J Pathol*. 1984 Sep;116(3):377–84.
23. Chen B, Yan Y-L, Liu C, Bo L, Li G-F, Wang H, et al. Therapeutic effect of deferoxamine on iron overload-induced inhibition of osteogenesis in a zebrafish model. *Calcif Tissue Int*. 2014 Mar;94(3):353–60.
24. Doyard M, Fatih N, Monnier A, Island ML, Aubry M, Leroyer P, et al. Iron excess limits HHIPL-2 gene expression and decreases osteoblastic activity in human MG-63 cells. *Osteoporos Int*. 2012 Oct 1;23(10):2435–45.
25. Yang Q, Jian J, Abramson SB, Huang X. Inhibitory effects of iron on bone morphogenetic protein 2-induced osteoblastogenesis. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2011 Jun;26(6):1188–96.
26. Messer JG, Kilbarger AK, Erikson KM, Kipp DE. Iron overload alters iron-regulatory genes and proteins, down-regulates osteoblastic phenotype, and is associated with apoptosis in fetal rat calvaria cultures. *Bone*. 2009 Nov;45(5):972–9.
27. Yamasaki K, Hagiwara H. Excess iron inhibits osteoblast metabolism. *Toxicol Lett*. 2009 Dec 15;191(2–3):211–5.
28. Jia P, Xu YJ, Zhang ZL, Li K, Li B, Zhang W, et al. Ferric ion could facilitate osteoclast differentiation and bone resorption through the production of reactive oxygen species. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc*. 2012 Nov;30(11):1843–52.
29. Ishii K, Fumoto T, Iwai K, Takeshita S, Ito M, Shimohata N, et al. Coordination of PGC-1beta and iron uptake in mitochondrial biogenesis and osteoclast activation. *Nat Med*. 2009 Mar;15(3):259–66.
30. Kawahara A, Nishi T, Hisano Y, Fukui H, Yamaguchi A, Mochizuki N. The Sphingolipid Transporter Spns2 Functions in Migration of Zebrafish Myocardial Precursors. *Science*. 2009 Jan 23;323(5913):524–7.
31. Strub GM, Maceyka M, Hait NC, Milstien S, Spiegel S. Extracellular and Intracellular Actions of Sphingosine-1-Phosphate. *Adv Exp Med Biol*. 2010;688:141–55.

32. Matsuzaki E, Hiratsuka S, Hamachi T, Takahashi-Yanaga F, Hashimoto Y, Higashi K, et al. Sphingosine-1-phosphate promotes the nuclear translocation of β -catenin and thereby induces osteoprotegerin gene expression in osteoblast-like cell lines. *Bone*. 2013 Aug;55(2):315–24.
33. Higashi K, Matsuzaki E, Hashimoto Y, Takahashi-Yanaga F, Takano A, Anan H, et al. Sphingosine-1-phosphate/S1PR2-mediated signaling triggers Smad1/5/8 phosphorylation and thereby induces Runx2 expression in osteoblasts. *Bone*. 2016 Dec;93:1–11.
34. Ishii M, Egen JG, Klauschen F, Meier-Schellersheim M, Saeki Y, Vacher J, et al. Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis. *Nature*. 2009 Aug 2;458(7237):524–8.
35. Ishii M, Kikuta J, Shimazu Y, Meier-Schellersheim M, Germain RN. Chemorepulsion by blood S1P regulates osteoclast precursor mobilization and bone remodeling in vivo. *J Exp Med*. 2010 Dec 20;207(13):2793–8.
36. Ryu J, Kim HJ, Chang E-J, Huang H, Banno Y, Kim H-H. Sphingosine 1-phosphate as a regulator of osteoclast differentiation and osteoclast-osteoblast coupling. *EMBO J*. 2006 Dec 13;25(24):5840–51.
37. Lescoat G, Gouffier L, Cannie I, Lowe O, Morel I, Lepage S, et al. Involvement of polyamines in iron(III) transport in human intestinal Caco-2 cell lines. *Mol Cell Biochem*. 2013 Jun;378(1–2):205–15.
38. Cavey T, Ropert M, de Tayrac M, Bardou-Jacquet E, Island M-L, Leroyer P, et al. Mouse genetic background impacts both on iron and non-iron metals parameters and on their relationships. *Biometals Int J Role Met Ions Biol Biochem Med*. 2015 Aug;28(4):733–43.
39. Bielawski J, Szulc ZM, Hannun YA, Bielawska A. Simultaneous quantitative analysis of bioactive sphingolipids by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Methods San Diego Calif*. 2006 Jun;39(2):82–91.
40. Campillos M, Cases I, Hentze MW, Sanchez M. SIREs: searching for iron-responsive elements. *Nucleic Acids Res*. 2010 Jul;38(Web Server issue):W360–367.
41. Fleming RE, Ponka P. Iron overload in human disease. *N Engl J Med*. 2012 Jan 26;366(4):348–59.
42. Pigeon C, Turlin B, Iancu TC, Leroyer P, Le Lan J, Deugnier Y, et al. Carbonyl-iron supplementation induces hepatocyte nuclear changes in BALB/CJ male mice. *J Hepatol*. 1999 May;30(5):926–34.
43. Spiegel S, Milstien S. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003 Jan 5;4(5):397–407.
44. Bradley E, Dasgupta S, Jiang X, Zhao X, Zhu G, He Q, et al. Critical Role of Spns2, a Sphingosine-1-Phosphate Transporter, in Lung Cancer Cell Survival and Migration. *PLoS ONE [Internet]*. 2014 [cited 2016 Dec 6];9(10). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pmc/articles/PMC4203763/>
45. Anliker B, Chun J. Lysophospholipid G Protein-coupled Receptors. *J Biol Chem*. 2004 May 14;279(20):20555–8.

46. Khavandgar Z, Murshed M. Sphingolipid metabolism and its role in the skeletal tissues. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2015 Mar;72(5):959–69.
47. During A, Penel G, Hardouin P. Understanding the local actions of lipids in bone physiology. *Prog Lipid Res*. 2015 Jul;59:126–46.
48. Sato C, Iwasaki T, Kitano S, Tsunemi S, Sano H. Sphingosine 1-phosphate receptor activation enhances BMP-2-induced osteoblast differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Jun 22;423(1):200–5.
49. Brizuela L, Martin C, Jeannot P, Ader I, Gstalder C, Andrieu G, et al. Osteoblast-derived sphingosine 1-phosphate to induce proliferation and confer resistance to therapeutics to bone metastasis-derived prostate cancer cells. *Mol Oncol*. 2014 Oct;8(7):1181–95.
50. Hashimoto Y, Kobayashi M, Matsuzaki E, Higashi K, Takahashi-Yanaga F, Takano A, et al. Sphingosine-1-phosphate-enhanced Wnt5a promotes osteogenic differentiation in C3H10T1/2 cells. *Cell Biol Int*. 2016 Oct;40(10):1129–36.
51. Zhang J-N, Zhao Y, Liu C, Han ES, Yu X, Lidington D, et al. The role of the sphingosine-1-phosphate signaling pathway in osteocyte mechanotransduction. *Bone*. 2015 Oct;79:71–8.
52. Pederson L, Ruan M, Westendorf JJ, Khosla S, Oursler MJ. Regulation of bone formation by osteoclasts involves Wnt/BMP signaling and the chemokine sphingosine-1-phosphate. *Proc Natl Acad Sci*. 2008 Dec 30;105(52):20764–9.
53. Quint P, Ruan M, Pederson L, Kassem M, Westendorf JJ, Khosla S, et al. Sphingosine 1-phosphate (S1P) receptors 1 and 2 coordinately induce mesenchymal cell migration through S1P activation of complementary kinase pathways. *J Biol Chem*. 2013 Feb 22;288(8):5398–406.
54. Hannun YA, Obeid LM. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Jan 2;9(2):139–50.
55. Takabe K, Spiegel S. Export of sphingosine-1-phosphate and cancer progression. *J Lipid Res*. 2014 Sep;55(9):1839–46.
56. Hisano Y, Kobayashi N, Kawahara A, Yamaguchi A, Nishi T. The Sphingosine 1-Phosphate Transporter, SPNS2, Functions as a Transporter of the Phosphorylated Form of the Immunomodulating Agent FTY720. *J Biol Chem*. 2011 Jan 21;286(3):1758–66.
57. Nagahashi M, Kim EY, Yamada A, Ramachandran S, Allegood JC, Hait NC, et al. Spns2, a transporter of phosphorylated sphingoid bases, regulates their blood and lymph levels, and the lymphatic network. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2013 Mar;27(3):1001–11.
58. Shakoury-Elizeh M, Protchenko O, Berger A, Cox J, Gable K, Dunn TM, et al. Metabolic response to iron deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 2010 May 7;285(19):14823–33.
59. Lee Y-J, Huang X, Kropat J, Henras A, Merchant SS, Dickson RC, et al. Sphingolipid signaling mediates iron toxicity. *Cell Metab*. 2012 Jul 3;16(1):90–6.
60. Lester RL, Withers BR, Schultz MA, Dickson RC. Iron, glucose and intrinsic factors alter sphingolipid composition as yeast cells enter stationary phase. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Apr;1831(4):726–36.

Supplementary Data

Supplementary data 1

Sequences of primers used for quantitative PCR

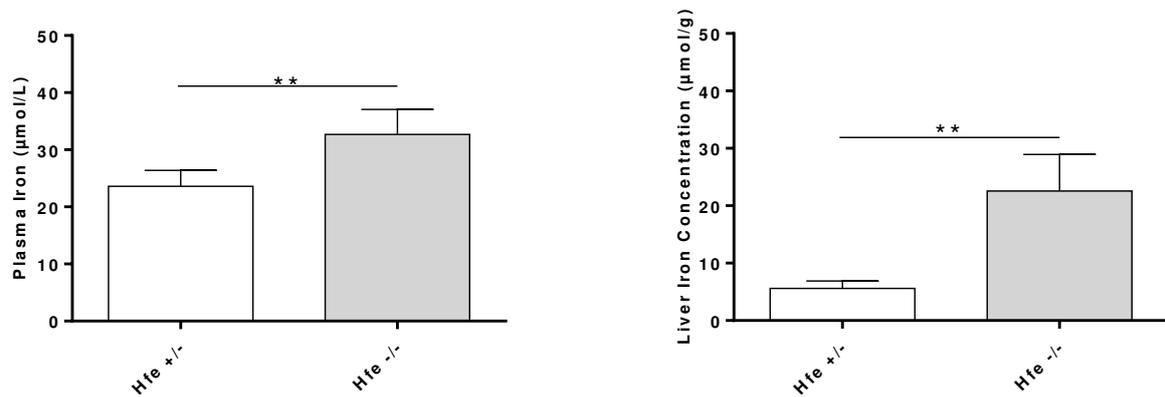
Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>Human</i>		
<i>HPRT1</i>	5'-GCTTTCCTTGGTCAGGCAGTA-3'	5'-AAGCTTGCGACCTTGACCAT-3'
<i>TFRC</i>	5'-GCTTTCCTTTCCTTGCATATTCT-3'	5'-GGTGGTACCCAAATAAGGATAATCTGT-3'
<i>COL1A1</i>	5'-GGCCTCGGAGGAAACTTTG-3'	5'-TTTCTCATCATAGCCATAAGACAGCT-3'
<i>SPNS2</i>	5'-ACTTTGGGGTCAAGGACCGA-3'	5'-AATCACCTTCCTGTTGAAGCG-3'
<i>SPHK1</i>	5'-GGCTGCTGTCACCCATGAA-3'	5'-TCACTCTCTAGGTCCACATCAG-3'
<i>SPHK2</i>	5'-AGCGTGGTAGCCACTTCAG-3'	5'-GAGCAGTGTACCGATGCCA-3'
<i>SGPL1</i>	5'-CCTAGCACAGACCTTCTGATGT-3'	5'-ACTCCATGCAATTAGCTGCCA-3'
<i>SGPP1</i>	5'-ATCATCATCGGGCTTCATTTAGC-3'	5'-GTGCTCCAGGTGTCAAGAGT-3'
<i>S1PR1</i>	5'-GCAGCTCGGTCTCTGACTAC-3'	5'-GAACACCACCGAGGTCAGTT-3'
<i>S1PR2</i>	5'-GCGCCATTGTGGTGGAAAA-3'	5'-CATTGCCGAGTGGAACCTTGCT-3'
<i>S1PR3</i>	5'-GGTGATTGTGGTGAGCGTGTT-3'	5'-AGGCCACATCAATGAGGAAGA-3'
<i>Mouse</i>		
<i>Hprt1</i>	5'-GTGTTCTAGTCCTGTGGCCATCT-3'	5'-GGCTCATAGTGCAAATCAAAAGTCT-3'
<i>Spns2</i>	5'-GCTGCTGCCATCCTGAGTT-3'	5'-TCCAGAAGAACACCTGCCAC-3'
<i>Tfrc</i>	5'-CATGAGTGGCTACCTGGGCT-3'	5'-CACTCCTCTTTTTGTTCTACACGCT-3'

Supplementary data 2

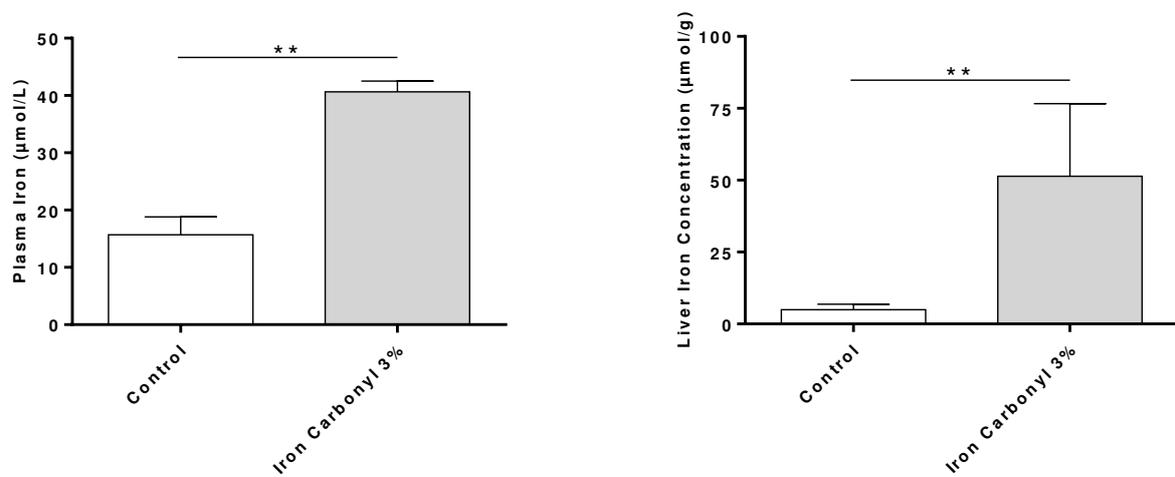
Impact of iron exposure on plasma and liver concentrations in iron overload mouse models.

Plasma and liver iron concentrations were determined in *Hfe*^{-/-} and *Hfe*^{+/-} mice (**A**) or of mice overloaded with 3% carbonyl iron (**B**). Asterisks indicate **p* < 0.05, ***p* < 0.01, or ****p* < 0.001 relative to control.

A *Hfe* knock-out mouse model of genetic hemochromatosis



B Iron carbonyl-supplemented C57BL/6 wild-type mice

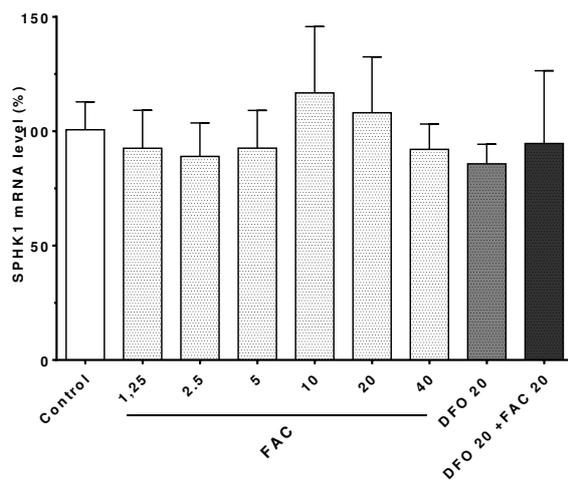


Supplementary data 3

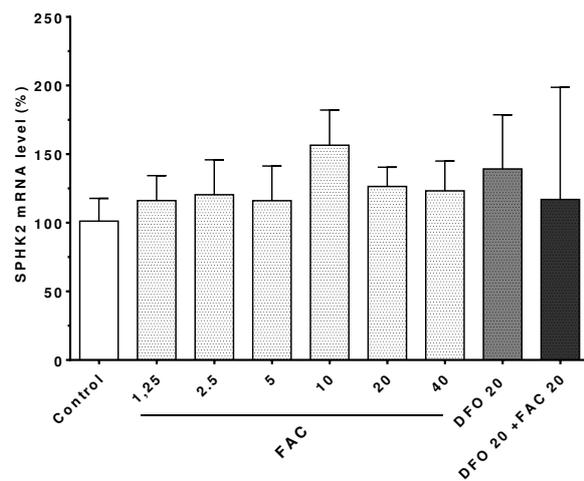
Impact of iron exposure on the S1P pathway in MG-63 cells.

SPHK1 (A), *SPHK2* (B), *SGPP1* (C), and *SGPL1* (D) mRNA levels, measured by RT-qPCR, of cells treated with FAC and/or DFO for 72 h. The results are expressed as the percentage of the control culture (100%). Data are presented as the mean \pm SD of three independent experiments performed in duplicate. Asterisks indicate $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, or $***p < 0.001$ relative to control.

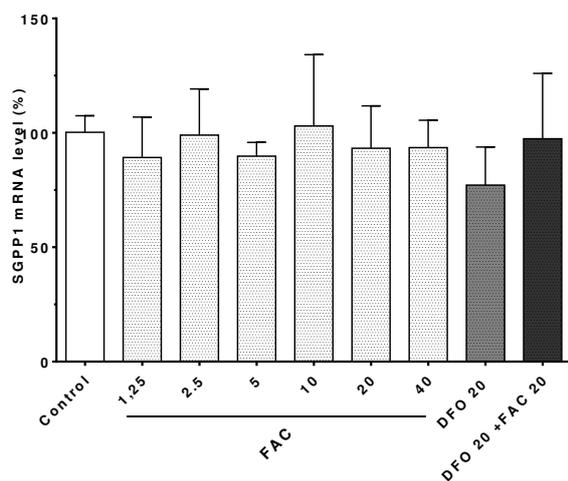
A.



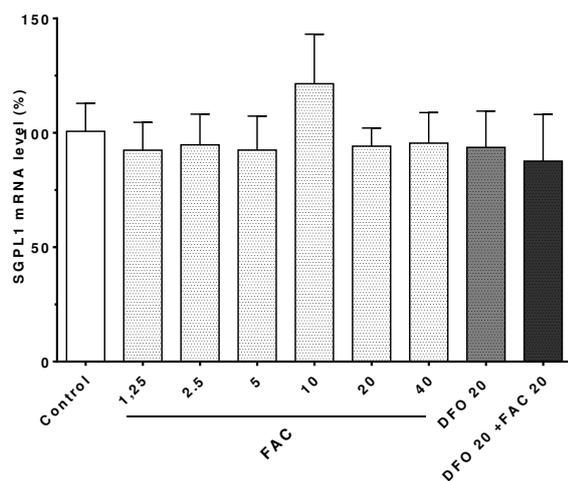
B.



C.



D.



VIII Discussion

L'ostéoporose est une maladie systémique du squelette entraînant une perte des compétences biomécaniques de l'os, responsable *in fine* d'un risque accru de fractures lors de chutes à faible cinétique. Cette pathologie est la conséquence du dérèglement d'un processus biologique essentiel au maintien de l'intégrité de l'os : le remodelage osseux. Ce processus complexe, faisant intervenir l'ensemble des cellules osseuses de façon coordonnée, permet en effet le remplacement des zones de tissu endommagées. Pour ce faire, chaque zone de tissu détériorée doit préalablement être détruite avant que ne se mette en place le processus de reconstruction. Ainsi, le remodelage osseux est la résultante de deux activités opposées : la résorption et la formation osseuse effectuées respectivement par les ostéoclastes et les ostéoblastes. Par conséquent, tout déséquilibre de ce processus étroitement contrôlé par de multiples facteurs est susceptible de retentir sur les qualités intrinsèques de l'os. De nombreuses situations physiologiques et pathologiques sont ainsi à même de perturber cet équilibre et il apparaît dorénavant que l'excès de fer au sein de l'organisme en fasse partie. Les désormais nombreuses études en rapport avec cette problématique ont en effet permis de démontrer qu'un excédent de fer impactait à la fois les activités ostéoclastiques et ostéoblastiques au sein du BRC (268). Il a ainsi été mis en évidence qu'une surcharge en fer induisait une suractivité ostéoclastique alors que le fonctionnement ostéoblastique se retrouve quant à lui réprimé. Ces phénomènes décrits *in vivo* et *in vitro* seraient à l'origine des baisses de DMO observées dans l'ensemble des pathologies de surcharges en fer (HG (173), hémoglobinopathies (174)) ainsi que dans certaines situations physiologiques (ménopause) (191). La toxicité du fer, lorsqu'il se retrouve en excédent est généralement attribuée à la génération d'espèces réactives de l'oxygène et les études menées sur les ostéoclastes semblent confirmer que ce mécanisme est bien à l'origine de leur activité de dégradation exacerbée (196,198,205). Pour autant, l'implication de ce mécanisme semble moins évidente pour l'activité ostéoblastique et d'autres facteurs sont par conséquent susceptibles d'être impliqués. C'est en quête d'identification de tels mécanismes qu'a été entrepris la réalisation

d'une étude transcriptomique sans à priori sur une lignée ostéoblastique MG-63 exposée à une surcharge en fer. C'est ainsi que le gène *SPNS2* a pu être identifié comme putativement régulé par le fer. L'importante place que tient la S1P (médiateur lipidique dont la protéine *SPNS2* permet l'export) dans le processus de différenciation ostéoblastique nous a conduits à émettre l'hypothèse suivante : l'excès de fer modifie l'homéostasie de l'axe S1P/S1PR et entraîne *via* cette perturbation une réduction de l'activité ostéoblastique.

Nos résultats ont montré que le fer augmentait de façon conséquente l'expression du gène *SPNS2* dans la lignée ostéoblastique MG-63. Cette induction, mise en évidence de façon dose-dépendante, était significative pour de très faibles ajouts de fer (2,5 μ M de FAC). La répression transcriptionnelle du gène *TFRC* évaluée de façon concomitante ne commençait, quant à elle, qu'à partir de 10 μ M de FAC ajouté. Ces résultats indiquent que la régulation transcriptionnelle du gène *SPNS2* induite par le fer dans notre modèle ostéoblastique est effective pour de très faibles concentrations en fer, inaptes à mettre en jeu les protéines IRP. La régulation par le fer de l'expression du gène *SPNS2* n'a pas été retrouvée dans les modèles entérocytaire Caco2 et hépatocytaire HepG2 en dépit d'une exposition martiale adaptée. L'évaluation *in vivo* de cette régulation dans le tissu hépatocytaire de deux modèles murins surchargés en fer n'a pas non plus révélé de régulation semblable à celle observée dans la lignée MG-63. Au total, l'ensemble de ces résultats suggèrent que l'effet du fer sur la régulation transcriptionnelle du gène *SPNS2* **i)** est relativement spécifique du type cellulaire, **ii)** débute avant l'activation coordonnée du système IRE/IRP, **iii)** est potentiellement basée sur un mécanisme cellulaire inconnu et hautement sensible à l'action du fer.

Nos données ont également montré que le fer réduisait l'expression du gène *COL1A1* pour des niveaux d'exposition au fer induisant une forte surexpression du gène *SPNS2*. La baisse d'expression de *COL1A1* confirme ainsi l'impact délétère de la surcharge en fer appliquée à notre modèle mais semble à priori en contradiction avec la fonction de la protéine *SPNS2* qui permet l'export cellulaire de la S1P. En effet, il a été démontré que la S1P amplifiait la différenciation

ostéoblastique (76,254,259–265) et induisait l'expression du gène *COL1A1* (254). Nos résultats suggèrent donc que l'induction transcriptionnelle fer-dépendante de *SPNS2* n'a pas de conséquence fonctionnelle sur l'export de la S1P. De plus, il a également été mis en évidence que la S1P induisait *in vitro* l'expression du gène *S1PR1* (264). En conséquence, la baisse d'expression du gène *S1PR1* observée en présence de fer suggère elle-aussi une diminution de l'action autocrine/paracrine de la S1P en dépit de l'importante surexpression du gène *SPNS2*. Cette hypothèse a été confirmée au moyen de l'étude fluxomique mis en place en vue d'évaluer les capacités de synthèse et d'export de la S1P. Celle-ci a en effet objectivé une baisse persistante des concentrations extracellulaires de S1P et ceci malgré la surexpression du gène *SPNS2* préalablement induite par une exposition au fer.

Ces résultats sont cohérents avec les données obtenues *via* l'inhibition ciblée du gène *SPNS2* réalisée par stratégie SiRNA. En effet, l'inhibition du gène *SPNS2*, induite en présence de fer, n'a pas été en mesure de modifier l'expression du gène *COL1A1*. Pour autant, en condition normale d'exposition au fer, l'inhibition du gène *SPNS2* réduit l'expression de *COL1A1*. De façon plus globale, ces résultats suggèrent que l'export de S1P *via* la protéine *SPNS2* devient inefficace en présence de fer. Ainsi, la diminution de l'export cellulaire de la S1P, malgré la surexpression du gène *SPNS2*, peut être interprétée de deux façons : **i)** sa traduction serait non efficiente ou aboutirait à la synthèse d'une protéine non fonctionnelle ; **ii)** elle serait réactionnelle à une baisse de synthèse de S1P et induite en vue de maintenir constante les concentrations extracellulaires de ce médiateur. La mesure des concentrations intracellulaires en S1P lors d'une exposition de notre modèle ostéoblastique à un excès de fer permettrait de tendre vers l'une ou l'autre des deux hypothèses proposées. Elle nécessite néanmoins une mise au point importante que nous n'avons pas été en mesure de réaliser pour le moment. L'absence de modification transcriptionnelle des enzymes-clés de la S1P (*SPHK1*, *SPHK2*, *SGPP1* et *SGPL1*) serait à priori en défaveur d'une modification des concentrations intracellulaires en S1P. Néanmoins, la complexité des voies biochimiques de synthèse des sphingolipides permet d'envisager qu'une autre enzyme située en amont du métabolisme de la S1P puisse être impactée par le fer et ainsi modifier de manière indirecte la synthèse de S1P. Une étude

fluxomique réalisée au moyen d'un précurseur marqué situé plus en amont de la cascade biochimique de la S1P permettrait d'explorer cette piste. La mise en évidence chez la levure de liens entre la toxicité du fer et le métabolisme des sphingolipides (215) est un argument important dans cette réflexion, d'autant plus qu'il a été démontré que le fer réduisait sous certaines conditions les concentrations intracellulaires de sphingosines et phytosphingosines à longues chaînes (269). De plus, la recherche *in silico* de séquences IRE réalisées par le laboratoire sur une liste de gènes liés au métabolisme des sphingolipides a révélé que les gènes *CERS3* et *CERS6* présentaient une forte probabilité de contenir une telle séquence dans leur partie 3'-UTR (données non publiées). Ainsi, l'expression transcriptionnelle ces deux céramides synthases serait susceptible d'être atténuée par un excès de fer. Ces résultats obtenus *in silico* sont à confirmer *in vitro* ; une telle régulation serait un argument en faveur d'un impact beaucoup plus global du fer sur la cascade biochimique des sphingolipides.

IX Conclusion

Nos résultats ont montré que le fer augmentait de façon importante et dose-dépendante les niveaux d'ARNm du gène *SPNS2* dans la lignée ostéoblastique humaine MG-63. De façon inattendue, les résultats obtenus par étude fluxomique ont démontré que les concentrations extracellulaires de S1P diminuaient de façon concomitante. L'association de ces deux observations suggère ainsi que la régulation fer-dépendante de l'expression du gène *SPNS2* est soit **i)** fonctionnellement inefficace ou **ii)** la résultante d'un mécanisme adaptatif. Néanmoins, malgré cette apparente contradiction, la baisse d'efflux de la S1P semble avoir une répercussion fonctionnelle sur la cellule ostéoblastique comme le suggère les baisses d'expression des gènes *COL1A1* et *S1PR1* mises en évidence. Au total, l'ensemble des résultats obtenus semble indiquer que le fer perturbe l'axe de signalisation S1P/S1PR dans la cellule ostéoblastique. La baisse d'efflux et donc des concentrations extracellulaires en S1P est susceptible de modifier, au-delà des activités ostéoblastiques, un large éventail de processus biologiques pilotés par ce médiateur au sein du BRC. Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives quant à la compréhension des mécanismes mis en jeu lors des pertes osseuses associées aux surcharges en fer.

Bibliographie

1. Rho JY, Kuhn-Spearing L, Zioupos P. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Med Eng Phys.* mars 1998;20(2):92-102.
2. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev.* avr 2000;21(2):115-37.
3. Principes d'anatomie et de physiologie [Internet]. 2017 [cité 31 oct 2017]. Disponible sur: <http://www.deboecksuperieur.com/ouvrage/9782804153793-principes-danatomie-et-de-physiologie>
4. Nyman JS, Reyes M, Wang X. Effect of ultrastructural changes on the toughness of bone. *Micron Oxf Engl* 1993. 2005;36(7-8):566-82.
5. Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. - NLM Catalog - NCBI [Internet]. [cité 7 août 2017]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/101600367>
6. Cappariello A, Maurizi A, Veeriah V, Teti A. Reprint of: The Great Beauty of the osteoclast. *Arch Biochem Biophys.* 1 nov 2014;561:13-21.
7. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* 15 mai 2003;423(6937):337-42.
8. Martin TJ, Sims NA. RANKL/OPG; Critical role in bone physiology. *Rev Endocr Metab Disord.* 1 juin 2015;16(2):131-9.
9. Peruzzi B, Teti A. The Physiology and Pathophysiology of the Osteoclast. *Clin Rev Bone Miner Metab.* 1 juin 2012;10(2):71-97.
10. Henriksen K, Bollerslev J, Everts V, Karsdal MA. Osteoclast activity and subtypes as a function of physiology and pathology--implications for future treatments of osteoporosis. *Endocr Rev.* févr 2011;32(1):31-63.
11. Aubin JE. Advances in the osteoblast lineage. *Biochem Cell Biol Biochim Biol Cell.* 1998;76(6):899-910.
12. Martin TJ. Bone biology and anabolic therapies for bone: current status and future prospects. *J Bone Metab.* févr 2014;21(1):8-20.
13. Caplan AI, Bruder SP. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med.* juin 2001;7(6):259-64.
14. Harada H, Tagashira S, Fujiwara M, Ogawa S, Katsumata T, Yamaguchi A, et al. Cbfa1 isoforms exert functional differences in osteoblast differentiation. *J Biol Chem.* 12 mars 1999;274(11):6972-8.
15. Kern B, Shen J, Starbuck M, Karsenty G. Cbfa1 contributes to the osteoblast-specific expression of type I collagen genes. *J Biol Chem.* 9 mars 2001;276(10):7101-7.

16. Murshed M, Harmey D, Millán JL, McKee MD, Karsenty G. Unique coexpression in osteoblasts of broadly expressed genes accounts for the spatial restriction of ECM mineralization to bone. *Genes Dev.* 1 mai 2005;19(9):1093-104.
17. Dallas SL, Bonewald LF. Dynamics of the Transition from Osteoblast to Osteocyte. *Ann N Y Acad Sci.* mars 2010;1192:437.
18. Celil AB, Hollinger JO, Campbell PG. Osx transcriptional regulation is mediated by additional pathways to BMP2/Smad signaling. *J Cell Biochem.* 1 juin 2005;95(3):518-28.
19. Bennett CN, Longo KA, Wright WS, Suva LJ, Lane TF, Hankenson KD, et al. Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1 mars 2005;102(9):3324-9.
20. Yang X, Matsuda K, Bialek P, Jacquot S, Masuoka HC, Schinke T, et al. ATF4 is a substrate of RSK2 and an essential regulator of osteoblast biology; implication for Coffin-Lowry Syndrome. *Cell.* 30 avr 2004;117(3):387-98.
21. Wagner EF. Functions of AP1 (Fos/Jun) in bone development. *Ann Rheum Dis.* nov 2002;61 Suppl 2:ii40-42.
22. Marie PJ. Transcription factors controlling osteoblastogenesis. *Arch Biochem Biophys.* 15 mai 2008;473(2):98-105.
23. Jeon MJ, Kim JA, Kwon SH, Kim SW, Park KS, Park S-W, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma inhibits the Runx2-mediated transcription of osteocalcin in osteoblasts. *J Biol Chem.* 27 juin 2003;278(26):23270-7.
24. Lecka-Czernik B, Gubrij I, Moerman EJ, Kajkenova O, Lipschitz DA, Manolagas SC, et al. Inhibition of *Osf2/Cbfa1* expression and terminal osteoblast differentiation by PPARgamma2. *J Cell Biochem.* 1 sept 1999;74(3):357-71.
25. Harrison JR, Huang Y-F, Wilson KA, Kelly PL, Adams DJ, Gronowicz GA, et al. *Col1a1* promoter-targeted expression of p20 CCAAT enhancer-binding protein beta (C/EBPbeta), a truncated C/EBPbeta isoform, causes osteopenia in transgenic mice. *J Biol Chem.* 4 mars 2005;280(9):8117-24.
26. Nishio Y, Dong Y, Paris M, O'Keefe RJ, Schwarz EM, Drissi H. Runx2-mediated regulation of the zinc finger *Osterix/Sp7* gene. *Gene.* 10 mai 2006;372:62-70.
27. Khavandgar Z, Murshed M. Sphingolipid metabolism and its role in the skeletal tissues. *Cell Mol Life Sci CMLS.* mars 2015;72(5):959-69.
28. Kartsogiannis V, Ng KW. Cell lines and primary cell cultures in the study of bone cell biology. *Mol Cell Endocrinol.* 30 déc 2004;228(1-2):79-102.
29. Young MF, Kerr JM, Ibaraki K, Heegaard AM, Robey PG. Structure, expression, and regulation of the major noncollagenous matrix proteins of bone. *Clin Orthop.* août 1992;(281):275-94.
30. Blair HC, Larrouture QC, Li Y, Lin H, Beer-Stoltz D, Liu L, et al. Osteoblast Differentiation and Bone Matrix Formation In Vivo and In Vitro. *Tissue Eng Part B Rev.* juin 2017;23(3):268-80.

31. Bonewald LF. The Amazing Osteocyte. *J Bone Miner Res.* févr 2011;26(2):229.
32. Civitelli R. Cell-cell communication in the osteoblast/osteocyte lineage. *Arch Biochem Biophys.* 15 mai 2008;473(2):188-92.
33. Buenzli PR, Sims NA. Quantifying the osteocyte network in the human skeleton. *Bone.* 1 juin 2015;75(Supplement C):144-50.
34. Dallas SL, Prideaux M, Bonewald LF. The Osteocyte: An Endocrine Cell ... and More. *Endocr Rev.* oct 2013;34(5):658.
35. Chen H, Senda T, Kubo K. The osteocyte plays multiple roles in bone remodeling and mineral homeostasis. *Med Mol Morphol.* 1 juin 2015;48(2):61-8.
36. Schaffler DMB, Cheung DW-Y, Majeska DR, Kennedy DO. Osteocytes: Master Orchestrators of Bone. *Calcif Tissue Int.* janv 2014;94(1):5.
37. Xiong J, Piemontese M, Onal M, Campbell J, Goellner JJ, Dusevich V, et al. Osteocytes, not Osteoblasts or Lining Cells, are the Main Source of the RANKL Required for Osteoclast Formation in Remodeling Bone. *PLoS One.* 2015;10(9):e0138189.
38. Xiong J, Onal M, Jilka RL, Weinstein RS, Manolagas SC, O'Brien CA. Matrix-embedded cells control osteoclast formation. *Nat Med.* oct 2011;17(10):1235.
39. Shimada T, Kakitani M, Yamazaki Y, Hasegawa H, Takeuchi Y, Fujita T, et al. Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. *J Clin Invest.* févr 2004;113(4):561-8.
40. Delaisse J-M. The reversal phase of the bone-remodeling cycle: cellular prerequisites for coupling resorption and formation. *BoneKEy Rep.* 2014;3:561.
41. Kim SW, Pajevic PD, Selig M, Barry KJ, Yang J-Y, Shin CS, et al. Intermittent parathyroid hormone administration converts quiescent lining cells to active osteoblasts. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* oct 2012;27(10):2075-84.
42. During A, Penel G, Hardouin P. Understanding the local actions of lipids in bone physiology. *Prog Lipid Res.* juill 2015;59:126-46.
43. Dirksen TR, Marinetti GV. Lipids of bovine enamel and dentin and human bone. *Calcif Tissue Res.* 1970;6(1):1-10.
44. Hannun YA, Obeid LM. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2 janv 2008;9(2):139-50.
45. Seeman E. Bone modeling and remodeling. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2009;19(3):219-33.
46. Teti A. Bone development: overview of bone cells and signaling. *Curr Osteoporos Rep.* déc 2011;9(4):264-73.
47. Kristensen HB, Andersen TL, Marcussen N, Rolighed L, Delaisse J-M. Osteoblast recruitment routes in human cancellous bone remodeling. *Am J Pathol.* mars 2014;184(3):778-89.

48. Eriksen EF. Cellular mechanisms of bone remodeling. *Rev Endocr Metab Disord.* déc 2010;11(4):219-27.
49. Parfitt AM. Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J Cell Biochem.* juill 1994;55(3):273-86.
50. van Oers RFM, Ruimerman R, Tanck E, Hilbers PAJ, Huiskes R. A unified theory for osteonal and hemi-osteonal remodeling. *Bone.* févr 2008;42(2):250-9.
51. Jaworski ZF, Duck B, Sekaly G. Kinetics of osteoclasts and their nuclei in evolving secondary Haversian systems. *J Anat.* oct 1981;133(Pt 3):397-405.
52. Jaworski ZF, Hooper C. Study of cell kinetics within evolving secondary Haversian systems. *J Anat.* août 1980;131(Pt 1):91-102.
53. Agerbaek MO, Eriksen EF, Kragstrup J, Mosekilde L, Melsen F. A reconstruction of the remodelling cycle in normal human cortical iliac bone. *Bone Miner.* févr 1991;12(2):101-12.
54. Eriksen EF. Normal and pathological remodeling of human trabecular bone: three dimensional reconstruction of the remodeling sequence in normals and in metabolic bone disease. *Endocr Rev.* nov 1986;7(4):379-408.
55. Del Fattore A, Teti A, Rucci N. Osteoclast receptors and signaling. *Arch Biochem Biophys.* 15 mai 2008;473(2):147-60.
56. Everts V, Delaissé JM, Korper W, Jansen DC, Tigchelaar-Gutter W, Saftig P, et al. The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* janv 2002;17(1):77-90.
57. Andersen TL, Abdelgawad ME, Kristensen HB, Hauge EM, Rolighed L, Bollerslev J, et al. Understanding coupling between bone resorption and formation: are reversal cells the missing link? *Am J Pathol.* juill 2013;183(1):235-46.
58. Kragstrup J, Melsen F. Three-dimensional morphology of trabecular bone osteons reconstructed from serial sections. *Metab Bone Dis Relat Res.* 1984 1983;5(3):127-30.
59. Eriksen EF, Melsen F, Mosekilde L. Reconstruction of the resorptive site in iliac trabecular bone: a kinetic model for bone resorption in 20 normal individuals. *Metab Bone Dis Relat Res.* 1984;5(5):235-42.
60. Eriksen EF, Gundersen HJ, Melsen F, Mosekilde L. Reconstruction of the formative site in iliac trabecular bone in 20 normal individuals employing a kinetic model for matrix and mineral apposition. *Metab Bone Dis Relat Res.* 1984;5(5):243-52.
61. Hauge EM, Qvesel D, Eriksen EF, Mosekilde L, Melsen F. Cancellous bone remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic markers. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* sept 2001;16(9):1575-82.
62. Kristensen HB, Andersen TL, Marcussen N, Rolighed L, Delaisse J-M. Increased presence of capillaries next to remodeling sites in adult human cancellous bone. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* mars 2013;28(3):574-85.

63. Verborgt O, Gibson GJ, Schaffler MB. Loss of osteocyte integrity in association with microdamage and bone remodeling after fatigue in vivo. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* janv 2000;15(1):60-7.
64. Emerton KB, Hu B, Woo AA, Sinofsky A, Hernandez C, Majeska RJ, et al. Osteocyte apoptosis and control of bone resorption following ovariectomy in mice. *Bone.* mars 2010;46(3):577-83.
65. Saltel F, Chabadel A, Zhao Y, Lafage-Proust M-H, Clézardin P, Jurdic P, et al. Transmigration: a new property of mature multinucleated osteoclasts. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* déc 2006;21(12):1913-23.
66. Muto A, Mizoguchi T, Udagawa N, Ito S, Kawahara I, Abiko Y, et al. Lineage-committed osteoclast precursors circulate in blood and settle down into bone. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* déc 2011;26(12):2978-90.
67. Yu X, Huang Y, Collin-Osdoby P, Osdoby P. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) recruits osteoclast precursors by inducing chemotaxis, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity, and collagen transmigration. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* août 2003;18(8):1404-18.
68. Yu X, Huang Y, Collin-Osdoby P, Osdoby P. CCR1 chemokines promote the chemotactic recruitment, RANKL development, and motility of osteoclasts and are induced by inflammatory cytokines in osteoblasts. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* déc 2004;19(12):2065-77.
69. Ishii M, Egen JG, Klauschen F, Meier-Schellersheim M, Saeki Y, Vacher J, et al. Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis. *Nature.* 2 août 2009;458(7237):524-8.
70. Ishii M, Kikuta J, Shimazu Y, Meier-Schellersheim M, Germain RN. Chemorepulsion by blood S1P regulates osteoclast precursor mobilization and bone remodeling in vivo. *J Exp Med.* 20 déc 2010;207(13):2793-8.
71. Ishii M, Kikuta J. Sphingosine-1-phosphate signaling controlling osteoclasts and bone homeostasis. *Biochim Biophys Acta.* janv 2013;1831(1):223-7.
72. Tang Y, Wu X, Lei W, Pang L, Wan C, Shi Z, et al. TGF-beta1-induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation. *Nat Med.* juill 2009;15(7):757-65.
73. Roelofsen T, Akkers R, Beumer W, Apotheker M, Steeghs I, van de Ven J, et al. Sphingosine-1-phosphate acts as a developmental stage specific inhibitor of platelet-derived growth factor-induced chemotaxis of osteoblasts. *J Cell Biochem.* 1 nov 2008;105(4):1128-38.
74. Pederson L, Ruan M, Westendorf JJ, Khosla S, Oursler MJ. Regulation of bone formation by osteoclasts involves Wnt/BMP signaling and the chemokine sphingosine-1-phosphate. *Proc Natl Acad Sci.* 30 déc 2008;105(52):20764-9.
75. Quint P, Ruan M, Pederson L, Kassem M, Westendorf JJ, Khosla S, et al. Sphingosine 1-phosphate (S1P) receptors 1 and 2 coordinately induce mesenchymal cell migration through S1P activation of complementary kinase pathways. *J Biol Chem.* 22 févr 2013;288(8):5398-406.

76. Price ST, Beckham TH, Cheng JC, Lu P, Liu X, Norris JS. Sphingosine 1-Phosphate Receptor 2 Regulates the Migration, Proliferation, and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Int J Stem Cell Res Ther.* 2015;2(2).
77. Zou W, Teitelbaum SL. Integrins, growth factors, and the osteoclast cytoskeleton. *Ann N Y Acad Sci.* mars 2010;1192:27-31.
78. Dejaeger M, Böhm A-M, Dirckx N, Devriese J, Nefyodova E, Cardoen R, et al. Integrin-Linked Kinase Regulates Bone Formation by Controlling Cytoskeletal Organization and Modulating BMP and Wnt Signaling in Osteoprogenitors. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* 2 juin 2017;
79. Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev.* juin 1999;20(3):345-57.
80. Takahashi N, Akatsu T, Udagawa N, Sasaki T, Yamaguchi A, Moseley JM, et al. Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. *Endocrinology.* nov 1988;123(5):2600-2.
81. Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-Hora M, Feng JQ, et al. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med.* 11 sept 2011;17(10):1231-4.
82. Kennedy OD, Herman BC, Laudier DM, Majeska RJ, Sun HB, Schaffler MB. Activation of resorption in fatigue-loaded bone involves both apoptosis and active pro-osteoclastogenic signaling by distinct osteocyte populations. *Bone.* mai 2012;50(5):1115-22.
83. Heino TJ, Kurata K, Higaki H, Väänänen HK. Evidence for the role of osteocytes in the initiation of targeted remodeling. *Technol Health Care Off J Eur Soc Eng Med.* 2009;17(1):49-56.
84. Robling AG, Niziolek PJ, Baldrige LA, Condon KW, Allen MR, Alam I, et al. Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin. *J Biol Chem.* 29 févr 2008;283(9):5866-75.
85. Martin TJ, Sims NA. Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption. *Trends Mol Med.* févr 2005;11(2):76-81.
86. Ryu J, Kim HJ, Chang E-J, Huang H, Banno Y, Kim H-H. Sphingosine 1-phosphate as a regulator of osteoclast differentiation and osteoclast-osteoblast coupling. *EMBO J.* 13 déc 2006;25(24):5840-51.
87. Pederson L, Ruan M, Westendorf JJ, Khosla S, Oursler MJ. Regulation of bone formation by osteoclasts involves Wnt/BMP signaling and the chemokine sphingosine-1-phosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 30 déc 2008;105(52):20764-9.
88. Takeshita S, Fumoto T, Matsuoka K, Park K, Aburatani H, Kato S, et al. Osteoclast-secreted CTHRC1 in the coupling of bone resorption to formation. *J Clin Invest.* sept 2013;123(9):3914-24.
89. Matsuoka K, Park K-A, Ito M, Ikeda K, Takeshita S. Osteoclast-derived complement component 3a stimulates osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* juill 2014;29(7):1522-30.

90. Walker EC, McGregor NE, Poulton IJ, Pompolo S, Allan EH, Quinn JMW, et al. Cardiotrophin-1 is an osteoclast-derived stimulus of bone formation required for normal bone remodeling. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* déc 2008;23(12):2025-32.
91. Del Fattore A, Fornari R, Van Wesenbeeck L, de Freitas F, Timmermans J-P, Peruzzi B, et al. A new heterozygous mutation (R714C) of the osteopetrosis gene, pleckstrin homolog domain containing family M (with run domain) member 1 (PLEKHM1), impairs vesicular acidification and increases TRACP secretion in osteoclasts. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* mars 2008;23(3):380-91.
92. Zhao C, Irie N, Takada Y, Shimoda K, Miyamoto T, Nishiwaki T, et al. Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis. *Cell Metab.* août 2006;4(2):111-21.
93. Consensus Development Conference on Osteoporosis. Hong Kong, April 1-2, 1993. *Am J Med.* 30 nov 1993;95(5A):1S-78S.
94. NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *JAMA.* 14 févr 2001;285(6):785-95.
95. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. *World Health Organ Tech Rep Ser.* 1994;843:1-129.
96. Kanis JA, Glüer CC. An update on the diagnosis and assessment of osteoporosis with densitometry. Committee of Scientific Advisors, International Osteoporosis Foundation. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA.* 2000;11(3):192-202.
97. Kanis JA. Diagnosis of osteoporosis and assessment of fracture risk. *Lancet Lond Engl.* 1 juin 2002;359(9321):1929-36.
98. Schousboe JT, Shepherd JA, Bilezikian JP, Baim S. Executive summary of the 2013 International Society for Clinical Densitometry Position Development Conference on bone densitometry. *J Clin Densitom Off J Int Soc Clin Densitom.* déc 2013;16(4):455-66.
99. Cosman F, de Beur SJ, LeBoff MS, Lewiecki EM, Tanner B, Randall S, et al. Clinician's Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis. *Osteoporos Int.* 2014;25(10):2359-81.
100. Kanis JA, McCloskey EV, Johansson H, Cooper C, Rizzoli R, Reginster J-Y. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporos Int.* 2013;24(1):23-57.
101. Wright NC, Looker AC, Saag KG, Curtis JR, Delzell ES, Randall S, et al. The Recent Prevalence of Osteoporosis and Low Bone Mass in the United States Based on Bone Mineral Density at the Femoral Neck or Lumbar Spine. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* nov 2014;29(11):2520-6.
102. Svedbom A, Hernlund E, Ivergård M, Compston J, Cooper C, Stenmark J, et al. Osteoporosis in the European Union: a compendium of country-specific reports. *Arch Osteoporos [Internet].* 2013 [cité 21 sept 2017];8(1-2). Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3880492/>

103. Klop C, Welsing PMJ, Cooper C, Harvey NC, Elders PJM, Bijlsma JWJ, et al. Mortality in British hip fracture patients, 2000-2010: a population-based retrospective cohort study. *Bone*. sept 2014;66:171-7.
104. Rizzoli R, Bianchi ML, Garabédian M, McKay HA, Moreno LA. Maximizing bone mineral mass gain during growth for the prevention of fractures in the adolescents and the elderly. *Bone*. 1 févr 2010;46(2):294-305.
105. Hernandez CJ, Beaupré GS, Carter DR. A theoretical analysis of the relative influences of peak BMD, age-related bone loss and menopause on the development of osteoporosis. *Osteoporos Int*. 1 oct 2003;14(10):843-7.
106. Farr JN, Khosla S. Skeletal changes through the lifespan—from growth to senescence. *Nat Rev Endocrinol*. sept 2015;11(9):513.
107. Looker AC, Melton LJ, Harris TB, Borrud LG, Shepherd JA. Prevalence and trends in low femur bone density among older US adults: NHANES 2005-2006 compared with NHANES III. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. janv 2010;25(1):64-71.
108. Looker AC, Orwoll ES, Johnston CC, Lindsay RL, Wahner HW, Dunn WL, et al. Prevalence of low femoral bone density in older U.S. adults from NHANES III. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. nov 1997;12(11):1761-8.
109. Barrett-Connor E, Siris ES, Wehren LE, Miller PD, Abbott TA, Berger ML, et al. Osteoporosis and fracture risk in women of different ethnic groups. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. févr 2005;20(2):185-94.
110. Vico L, van Rietbergen B, Vilayphiou N, Linossier M-T, Locrelle H, Normand M, et al. Cortical and Trabecular Bone Microstructure Did Not Recover at Weight-Bearing Skeletal Sites and Progressively Deteriorated at Non-Weight-Bearing Sites During the Year Following International Space Station Missions. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2 juin 2017;
111. Kanis JA, Johnell O, Oden A, Johansson H, De Laet C, Eisman JA, et al. Smoking and fracture risk: a meta-analysis. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA*. févr 2005;16(2):155-62.
112. Silva BC, Costa AG, Cusano NE, Kousteni S, Bilezikian JP. Catabolic and anabolic actions of parathyroid hormone on the skeleton. *J Endocrinol Invest*. nov 2011;34(10):801-10.
113. Walker MD, Silverberg SJ. Primary hyperparathyroidism. *Nat Rev Endocrinol*. 8 sept 2017;
114. McNerny EMB, Nickolas TL. Bone Quality in Chronic Kidney Disease: Definitions and Diagnostics. *Curr Osteoporos Rep*. juin 2017;15(3):207-13.
115. Williams GR, Bassett JHD. Thyroid diseases and bone health. *J Endocrinol Invest*. 29 août 2017;
116. Nieman LK, Biller BMK, Findling JW, Newell-Price J, Savage MO, Stewart PM, et al. The diagnosis of Cushing's syndrome: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. mai 2008;93(5):1526-40.

117. Belaya ZE, Hans D, Rozhinskaya LY, Dragunova NV, Sasonova NI, Solodovnikov AG, et al. The risk factors for fractures and trabecular bone-score value in patients with endogenous Cushing's syndrome. *Arch Osteoporos*. 2015;10:44.
118. Canalis E, Mazziotti G, Giustina A, Bilezikian JP. Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathophysiology and therapy. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA*. oct 2007;18(10):1319-28.
119. Ito S, Suzuki N, Kato S, Takahashi T, Takagi M. Glucocorticoids induce the differentiation of a mesenchymal progenitor cell line, ROB-C26 into adipocytes and osteoblasts, but fail to induce terminal osteoblast differentiation. *Bone*. janv 2007;40(1):84-92.
120. Ohnaka K, Tanabe M, Kawate H, Nawata H, Takayanagi R. Glucocorticoid suppresses the canonical Wnt signal in cultured human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 1 avr 2005;329(1):177-81.
121. Jensen PR, Andersen TL, S e K, Hauge EM, Bollerslev J, Amling M, et al. Premature loss of bone remodeling compartment canopies is associated with deficient bone formation: a study of healthy individuals and patients with Cushing's syndrome. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. avr 2012;27(4):770-80.
122. Steinbuch M, Youket TE, Cohen S. Oral glucocorticoid use is associated with an increased risk of fracture. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA*. avr 2004;15(4):323-8.
123. Meczekalski B, Podfigurna-Stopa A, Genazzani AR. Hypoestrogenism in young women and its influence on bone mass density. *Gynecol Endocrinol Off J Int Soc Gynecol Endocrinol*. sept 2010;26(9):652-7.
124. Uygur D, Seng l O, Bayar D, Erdin  S, Batiođlu S, Mollamahmutoglu L. Bone loss in young women with premature ovarian failure. *Arch Gynecol Obstet*. nov 2005;273(1):17-9.
125. Golds G, Houdek D, Arnason T. Male Hypogonadism and Osteoporosis: The Effects, Clinical Consequences, and Treatment of Testosterone Deficiency in Bone Health. *Int J Endocrinol*. 2017;2017:4602129.
126. Mazziotti G, Canalis E, Giustina A. Drug-induced osteoporosis: mechanisms and clinical implications. *Am J Med*. oct 2010;123(10):877-84.
127. Misra M, Klibanski A. Bone health in anorexia nervosa. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. d c 2011;18(6):376-82.
128. Ponka P, Beaumont C, Richardson DR. Function and regulation of transferrin and ferritin. *Semin Hematol*. janv 1998;35(1):35-54.
129. Wang J, Pantopoulos K. Regulation of cellular iron metabolism. *Biochem J*. 15 mars 2011;434(3):365-81.
130. Brissot P, Lor al O. Iron metabolism and related genetic diseases: A cleared land, keeping mysteries. *J Hepatol*. f vr 2016;64(2):505-15.

131. Gkouvatsos K, Papanikolaou G, Pantopoulos K. Regulation of iron transport and the role of transferrin. *Biochim Biophys Acta*. mars 2012;1820(3):188-202.
132. Knutson MD. Iron-sensing proteins that regulate hepcidin and enteric iron absorption. *Annu Rev Nutr*. 21 août 2010;30:149-71.
133. Han O. Molecular mechanism of intestinal iron absorption. *Met Integr Biometal Sci*. févr 2011;3(2):103-9.
134. McKie AT, Barrow D, Latunde-Dada GO, Rolfs A, Sager G, Mudaly E, et al. An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science*. 2 mars 2001;291(5509):1755-9.
135. Andrews NC. The iron transporter DMT1. *Int J Biochem Cell Biol*. oct 1999;31(10):991-4.
136. Hershko C, Graham G, Bates GW, Rachmilewitz EA. Non-specific serum iron in thalassaemia: an abnormal serum iron fraction of potential toxicity. *Br J Haematol*. oct 1978;40(2):255-63.
137. Brissot P, Wright TL, Ma WL, Weisiger RA. Efficient clearance of non-transferrin-bound iron by rat liver. Implications for hepatic iron loading in iron overload states. *J Clin Invest*. oct 1985;76(4):1463-70.
138. Craven CM, Alexander J, Eldridge M, Kushner JP, Bernstein S, Kaplan J. Tissue distribution and clearance kinetics of non-transferrin-bound iron in the hypotransferrinemic mouse: a rodent model for hemochromatosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. mai 1987;84(10):3457-61.
139. Aisen P. Transferrin receptor 1. *Int J Biochem Cell Biol*. nov 2004;36(11):2137-43.
140. Kakhlon O, Cabantchik ZI. The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes(1). *Free Radic Biol Med*. 15 oct 2002;33(8):1037-46.
141. Shaw GC, Cope JJ, Li L, Corson K, Hersey C, Ackermann GE, et al. Mitoferrin is essential for erythroid iron assimilation. *Nature*. 2 mars 2006;440(7080):96-100.
142. Paradkar PN, Zumbrennen KB, Paw BH, Ward DM, Kaplan J. Regulation of mitochondrial iron import through differential turnover of mitoferrin 1 and mitoferrin 2. *Mol Cell Biol*. févr 2009;29(4):1007-16.
143. Arosio P, Ingrassia R, Cavadini P. Ferritins: a family of molecules for iron storage, antioxidation and more. *Biochim Biophys Acta*. juill 2009;1790(7):589-99.
144. Rouault TA. The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. *Nat Chem Biol*. août 2006;2(8):406-14.
145. Evstatiev R, Gasche C. Iron sensing and signalling. *Gut*. juin 2012;61(6):933-52.
146. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, et al. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*. 17 déc 2004;306(5704):2090-3.
147. Donovan A, Lima CA, Pinkus JL, Pinkus GS, Zon LI, Robine S, et al. The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metab*. mars 2005;1(3):191-200.

148. Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, et al. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem*. 16 mars 2001;276(11):7811-9.
149. Casanovas G, Mleczko-Sanecka K, Altamura S, Hentze MW, Muckenthaler MU. Bone morphogenetic protein (BMP)-responsive elements located in the proximal and distal hepcidin promoter are critical for its response to HJV/BMP/SMAD. *J Mol Med Berl Ger*. mai 2009;87(5):471-80.
150. Truksa J, Lee P, Beutler E. Two BMP responsive elements, STAT, and bZIP/HNF4/COUP motifs of the hepcidin promoter are critical for BMP, SMAD1, and HJV responsiveness. *Blood*. 15 janv 2009;113(3):688-95.
151. Camaschella C. BMP6 orchestrates iron metabolism. *Nat Genet*. 2009;41(4):386-8.
152. Schmidt PJ, Toran PT, Giannetti AM, Bjorkman PJ, Andrews NC. The transferrin receptor modulates Hfe-dependent regulation of hepcidin expression. *Cell Metab*. mars 2008;7(3):205-14.
153. Kautz L, Jung G, Valore EV, Rivella S, Nemeth E, Ganz T. Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism. *Nat Genet*. juill 2014;46(7):678-84.
154. Chalès G, Guggenbuhl P, Jouanolle A-M, Loréal O. Les gènes des hémochromatoses. *Rev Rhum Monogr*. 1 août 2010;77(4):335-40.
155. Brissot P, Bardou-Jacquet E, Jouanolle A-M, Loréal O. Iron disorders of genetic origin: a changing world. *Trends Mol Med*. déc 2011;17(12):707-13.
156. Allali S, de Montalembert M, Brousse V, Chalumeau M, Karim Z. Management of iron overload in hemoglobinopathies. *Transfus Clin Biol J Soc Francaise Transfus Sang*. sept 2017;24(3):223-6.
157. Camaschella C, Nai A. Ineffective erythropoiesis and regulation of iron status in iron loading anaemias. *Br J Haematol*. févr 2016;172(4):512-23.
158. Nemeth E. Hepcidin and β -thalassemia major. *Blood*. 4 juill 2013;122(1):3-4.
159. Gamberini MR, De Sanctis V, Gilli G. Hypogonadism, diabetes mellitus, hypothyroidism, hypoparathyroidism: incidence and prevalence related to iron overload and chelation therapy in patients with thalassaemia major followed from 1980 to 2007 in the Ferrara Centre. *Pediatr Endocrinol Rev PER*. oct 2008;6 Suppl 1:158-69.
160. Baldini M, Forti S, Marcon A, Ulivieri FM, Orsatti A, Tampieri B, et al. Endocrine and bone disease in appropriately treated adult patients with beta-thalassemia major. *Ann Hematol*. déc 2010;89(12):1207-13.
161. Vogiatzi MG, Macklin EA, Fung EB, Cheung AM, Vichinsky E, Olivieri N, et al. Bone disease in thalassemia: a frequent and still unresolved problem. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. mars 2009;24(3):543-57.

162. Vichinsky E, Butensky E, Fung E, Hudes M, Theil E, Ferrell L, et al. Comparison of organ dysfunction in transfused patients with SCD or beta thalassemia. *Am J Hematol.* sept 2005;80(1):70-4.
163. Sadat-Ali M, Sultan O, Al-Turki H, Alelq A. Does high serum iron level induce low bone mass in sickle cell anemia ? *Biometals Int J Role Met Ions Biol Biochem Med.* févr 2011;24(1):19-22.
164. Sarrai M, Duroseau H, D'Augustine J, Moktan S, Bellevue R. Bone mass density in adults with sickle cell disease. *Br J Haematol.* févr 2007;136(4):666-72.
165. Delbarre F. [Osteoporosis in hemochromatosis]. *Sem Hôp Organe Fondé Par Assoc Enseign Méd Hôp Paris.* 20 déc 1960;36:3279-94.
166. Conte D, Caraceni MP, Duriez J, Mandelli C, Corghi E, Cesana M, et al. Bone involvement in primary hemochromatosis and alcoholic cirrhosis. *Am J Gastroenterol.* oct 1989;84(10):1231-4.
167. Diamond T, Stiel D, Posen S. Osteoporosis in Hemochromatosis: Iron Excess, Gonadal Deficiency, or Other Factors? *Ann Intern Med.* 15 mars 1989;110(6):430-6.
168. Stocks AE, Powell LW. Pituitary function in idiopathic haemochromatosis and cirrhosis of the liver. *Lancet Lond Engl.* 12 août 1972;2(7772):298-300.
169. Bergeron C, Kovacs K. Pituitary siderosis. A histologic, immunocytologic, and ultrastructural study. *Am J Pathol.* nov 1978;93(2):295-309.
170. Stremmel W, Niederau C, Berger M, Kley HK, Krüskemper HL, Strohmeyer G. Abnormalities in estrogen, androgen, and insulin metabolism in idiopathic hemochromatosis. *Ann N Y Acad Sci.* 1988;526:209-23.
171. McDermott JH, Walsh CH. Hypogonadism in hereditary hemochromatosis. *J Clin Endocrinol Metab.* avr 2005;90(4):2451-5.
172. Sinigaglia L, Fargion S, Fracanzani AL, Binelli L, Battafarano N, Varenna M, et al. Bone and joint involvement in genetic hemochromatosis: role of cirrhosis and iron overload. *J Rheumatol.* sept 1997;24(9):1809-13.
173. Guggenbuhl P, Deugnier Y, Boisdet JF, Rolland Y, Perdriger A, Pawlotsky Y, et al. Bone mineral density in men with genetic hemochromatosis and HFE gene mutation. *Osteoporos Int.* 1 déc 2005;16(12):1809-14.
174. Valenti L, Varenna M, Fracanzani AL, Rossi V, Fargion S, Sinigaglia L. Association between iron overload and osteoporosis in patients with hereditary hemochromatosis. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA.* avr 2009;20(4):549-55.
175. Michelson J, Cohen A. Incidence and treatment of fractures in thalassemia. *J Orthop Trauma.* 1988;2(1):29-32.
176. Johanson NA. Musculoskeletal problems in hemoglobinopathy. *Orthop Clin North Am.* janv 1990;21(1):191-8.

177. Orvieto R, Leichter I, Rachmilewitz EA, Margulies JY. Bone density, mineral content, and cortical index in patients with thalassemia major and the correlation to their bone fractures, blood transfusions, and treatment with desferrioxamine. *Calcif Tissue Int.* mai 1992;50(5):397-9.
178. Jensen CE, Tuck SM, Agnew JE, Koneru S, Morris RW, Yardumian A, et al. High prevalence of low bone mass in thalassaemia major. *Br J Haematol.* déc 1998;103(4):911-5.
179. Mahachoklertwattana P, Chuansumrit A, Sirisriro R, Choubtum L, Sriphrapadang A, Rajatanavin R. Bone mineral density, biochemical and hormonal profiles in suboptimally treated children and adolescents with beta-thalassaemia disease. *Clin Endocrinol (Oxf).* mars 2003;58(3):273-9.
180. Baldini M, Marcon A, Ulivieri FM, Seghezzi S, Cassin R, Messina C, et al. Bone quality in beta-thalassemia intermedia: relationships with bone quantity and endocrine and hematologic variables. *Ann Hematol.* juin 2017;96(6):995-1003.
181. Brinker MR, Thomas KA, Meyers SJ, Texada T, Humbert JR, Cook SD, et al. Bone mineral density of the lumbar spine and proximal femur is decreased in children with sickle cell anemia. *Am J Orthop Belle Mead NJ.* janv 1998;27(1):43-9.
182. Soliman AT, Bererhi H, Darwish A, Alzalabani MM, Wali Y, Ansari B. Decreased bone mineral density in prepubertal children with sickle cell disease: correlation with growth parameters, degree of siderosis and secretion of growth factors. *J Trop Pediatr.* août 1998;44(4):194-8.
183. VanderJagt DJ, Bonnett C, Okolo SN, Glew RH. Assessment of the bone status of Nigerian children and adolescents with sickle cell disease using calcaneal ultrasound and serum markers of bone metabolism. *Calcif Tissue Int.* août 2002;71(2):133-40.
184. Miller RG, Segal JB, Ashar BH, Leung S, Ahmed S, Siddique S, et al. High prevalence and correlates of low bone mineral density in young adults with sickle cell disease. *Am J Hematol.* avr 2006;81(4):236-41.
185. Lal A, Fung EB, Pakbaz Z, Hackney-Stephens E, Vichinsky EP. Bone mineral density in children with sickle cell anemia. *Pediatr Blood Cancer.* déc 2006;47(7):901-6.
186. Voskaridou E, Stoupa E, Antoniadou L, Premetis E, Konstantopoulos K, Papassotiriou I, et al. Osteoporosis and osteosclerosis in sickle cell/beta-thalassemia: the role of the RANKL/osteoprotegerin axis. *Haematologica.* juin 2006;91(6):813-6.
187. Zacharski LR, Ornstein DL, Woloshin S, Schwartz LM. Association of age, sex, and race with body iron stores in adults: analysis of NHANES III data. *Am Heart J.* juill 2000;140(1):98-104.
188. Jian J, Pelle E, Huang X. Iron and menopause: does increased iron affect the health of postmenopausal women? *Antioxid Redox Signal.* déc 2009;11(12):2939-43.
189. Kim B-J, Ahn SH, Bae SJ, Kim EH, Lee S-H, Kim H-K, et al. Iron overload accelerates bone loss in healthy postmenopausal women and middle-aged men: a 3-year retrospective longitudinal study. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* nov 2012;27(11):2279-90.
190. Ahn SH, Lee S, Kim H, Lee SH, Kim B-J, Koh J-M. Higher serum ferritin level and lower femur neck strength in women at the stage of bone loss (\geq 45 years of age): The Fourth Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES IV). *Endocr Res.* nov 2016;41(4):334-42.

191. Cheng Q, Zhang X, Jiang J, Zhao G, Wang Y, Xu Y, et al. Postmenopausal Iron Overload Exacerbated Bone Loss by Promoting the Degradation of Type I Collagen. *BioMed Res Int.* 2017;2017:1345193.
192. Shen GS, Yang Q, Jian JL, Zhao GY, Liu LL, Wang X, et al. Heparin1 knockout mice display defects in bone microarchitecture and changes of bone formation markers. *Calcif Tissue Int.* juin 2014;94(6):632-9.
193. Doyard M, Chappard D, Leroyer P, Roth M-P, Loréal O, Guggenbuhl P. Decreased Bone Formation Explains Osteoporosis in a Genetic Mouse Model of Hemochromatosis. *Pantopoulos K, éditeur. PLOS ONE.* 1 févr 2016;11(2):e0148292.
194. Guggenbuhl P, Fergelot P, Doyard M, Libouban H, Roth M-P, Gallois Y, et al. Bone status in a mouse model of genetic hemochromatosis. *Osteoporos Int.* 1 août 2011;22(8):2313-9.
195. Tsay J, Yang Z, Ross FP, Cunningham-Rundles S, Lin H, Coleman R, et al. Bone loss caused by iron overload in a murine model: importance of oxidative stress. *Blood.* 7 oct 2010;116(14):2582-9.
196. Jia P, Xu YJ, Zhang ZL, Li K, Li B, Zhang W, et al. Ferric ion could facilitate osteoclast differentiation and bone resorption through the production of reactive oxygen species. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc.* nov 2012;30(11):1843-52.
197. Xiao W, Beibei F, Guangsi S, Yu J, Wen Z, Xi H, et al. Iron overload increases osteoclastogenesis and aggravates the effects of ovariectomy on bone mass. *J Endocrinol.* sept 2015;226(3):121-34.
198. Ishii K, Fumoto T, Iwai K, Takeshita S, Ito M, Shimohata N, et al. Coordination of PGC-1beta and iron uptake in mitochondrial biogenesis and osteoclast activation. *Nat Med.* mars 2009;15(3):259-66.
199. Matsushima S, Hoshimoto M, Torii M, Ozaki K, Narama I. Iron lactate-induced osteopenia in male Sprague-Dawley rats. *Toxicol Pathol.* déc 2001;29(6):623-9.
200. Liu G, Men P, Kenner GH, Miller SC. Age-associated iron accumulation in bone: implications for postmenopausal osteoporosis and a new target for prevention and treatment by chelation. *Biomaterials Int J Role Met Ions Biol Biochem Med.* juin 2006;19(3):245-51.
201. Jiang Y, Yan Y, Wang X, Zhu G, Xu Y-J. Heparin inhibition on the effect of osteogenesis in zebrafish. *Biochem Biophys Res Commun.* 15 juill 2016;476(1):1-6.
202. Chen B, Yan Y-L, Liu C, Bo L, Li G-F, Wang H, et al. Therapeutic effect of deferoxamine on iron overload-induced inhibition of osteogenesis in a zebrafish model. *Calcif Tissue Int.* mars 2014;94(3):353-60.
203. de Vernejoul MC, Pointillart A, Golenzer CC, Morieux C, Bielakoff J, Modrowski D, et al. Effects of iron overload on bone remodeling in pigs. *Am J Pathol.* sept 1984;116(3):377-84.
204. Xie W, Lorenz S, Dolder S, Hofstetter W. Extracellular Iron is a Modulator of the Differentiation of Osteoclast Lineage Cells. *Calcif Tissue Int.* mars 2016;98(3):275-83.

205. Xiao W, Beibei F, Guangsi S, Yu J, Wen Z, Xi H, et al. Iron overload increases osteoclastogenesis and aggravates the effects of ovariectomy on bone mass. *J Endocrinol.* sept 2015;226(3):121-34.
206. Sato K, Suematsu A, Nakashima T, Takemoto-Kimura S, Aoki K, Morishita Y, et al. Regulation of osteoclast differentiation and function by the CaMK-CREB pathway. *Nat Med.* déc 2006;12(12):1410-6.
207. Messer JG, Kilbarger AK, Erikson KM, Kipp DE. Iron overload alters iron-regulatory genes and proteins, down-regulates osteoblastic phenotype, and is associated with apoptosis in fetal rat calvaria cultures. *Bone.* nov 2009;45(5):972-9.
208. Yamasaki K, Hagiwara H. Excess iron inhibits osteoblast metabolism. *Toxicol Lett.* 15 déc 2009;191(2-3):211-5.
209. Zarjou A, Jeney V, Arosio P, Poli M, Zavaczki E, Balla G, et al. Ferritin ferroxidase activity: a potent inhibitor of osteogenesis. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* janv 2010;25(1):164-72.
210. Yang Q, Jian J, Abramson SB, Huang X. Inhibitory effects of iron on bone morphogenetic protein 2-induced osteoblastogenesis. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* juin 2011;26(6):1188-96.
211. Baschant U, Rauner M, Balaian E, Weidner H, Roetto A, Platzbecker U, et al. Wnt5a is a key target for the pro-osteogenic effects of iron chelation on osteoblast progenitors. *Haematologica.* déc 2016;101(12):1499-507.
212. Tian Q, Wu S, Dai Z, Yang J, Zheng J, Zheng Q, et al. Iron overload induced death of osteoblasts in vitro: involvement of the mitochondrial apoptotic pathway. *PeerJ.* 2016;4:e2611.
213. Doyard M, Fatih N, Monnier A, Island ML, Aubry M, Leroyer P, et al. Iron excess limits HHIPL-2 gene expression and decreases osteoblastic activity in human MG-63 cells. *Osteoporos Int.* 1 oct 2012;23(10):2435-45.
214. Liu F, Zhang W-L, Meng H-Z, Cai Z-Y, Yang M-W. Regulation of DMT1 on autophagy and apoptosis in osteoblast. *Int J Med Sci.* 2017;14(3):275-83.
215. Lee Y-J, Huang X, Kropat J, Henras A, Merchant SS, Dickson RC, et al. Sphingolipid signaling mediates iron toxicity. *Cell Metab.* 3 juill 2012;16(1):90-6.
216. Fahy E, Subramaniam S, Brown HA, Glass CK, Merrill AH, Murphy RC, et al. A comprehensive classification system for lipids. *J Lipid Res.* mai 2005;46(5):839-61.
217. LIPID MAPS Lipidomics Gateway: Lipidomics Resources [Internet]. [cité 18 oct 2017]. Disponible sur: http://www.lipidmaps.org/data/classification/LM_classification_exp.php
218. Chen Y, Liu Y, Sullards MC, Merrill AH. An introduction to sphingolipid metabolism and analysis by new technologies. *Neuromolecular Med.* déc 2010;12(4):306-19.
219. Fyrst H, Saba JD. An update on sphingosine-1-phosphate and other sphingolipid mediators. *Nat Chem Biol.* 2010;6(7):489-97.

220. Cuvillier O, Pirianov G, Kleuser B, Vanek PG, Coso OA, Gutkind S, et al. Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature*. 27 juin 1996;381(6585):800-3.
221. Olivera A, Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. *Nature*. 7 oct 1993;365(6446):557-60.
222. Maceyka M, Harikumar KB, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease. *Trends Cell Biol*. janv 2012;22(1):50-60.
223. Liu H, Chakravarty D, Maceyka M, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine kinases: a novel family of lipid kinases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 2002;71:493-511.
224. Shida D, Takabe K, Kapitonov D, Milstien S, Spiegel S. Targeting SphK1 as a new strategy against cancer. *Curr Drug Targets*. août 2008;9(8):662-73.
225. Spiegel S, Milstien S. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 5 janv 2003;4(5):397-407.
226. Le Stunff H, Peterson C, Liu H, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate and lipid phosphohydrolases. *Biochim Biophys Acta*. 23 mai 2002;1582(1-3):8-17.
227. Brindley DN, Pilquill C. Lipid phosphate phosphatases and signaling. *J Lipid Res*. avr 2009;50 Suppl:S225-230.
228. Serra M, Saba JD. Sphingosine 1-phosphate lyase, a key regulator of sphingosine 1-phosphate signaling and function. *Adv Enzyme Regul*. 2010;50(1):349-62.
229. Strub GM, Maceyka M, Hait NC, Milstien S, Spiegel S. Extracellular and Intracellular Actions of Sphingosine-1-Phosphate. *Adv Exp Med Biol*. 2010;688:141-55.
230. Takabe K, Paugh SW, Milstien S, Spiegel S. « Inside-out » signaling of sphingosine-1-phosphate: therapeutic targets. *Pharmacol Rev*. juin 2008;60(2):181-95.
231. Takabe K, Spiegel S. Export of sphingosine-1-phosphate and cancer progression. *J Lipid Res*. sept 2014;55(9):1839-46.
232. Kobayashi N, Nishi T, Hirata T, Kihara A, Sano T, Igarashi Y, et al. Sphingosine 1-phosphate is released from the cytosol of rat platelets in a carrier-mediated manner. *J Lipid Res*. mars 2006;47(3):614-21.
233. Kobayashi N, Kobayashi N, Yamaguchi A, Nishi T. Characterization of the ATP-dependent sphingosine 1-phosphate transporter in rat erythrocytes. *J Biol Chem*. 7 août 2009;284(32):21192-200.
234. Takabe K, Kim RH, Allegood JC, Mitra P, Ramachandran S, Nagahashi M, et al. Estradiol induces export of sphingosine 1-phosphate from breast cancer cells via ABCC1 and ABCG2. *J Biol Chem*. 2 avr 2010;285(14):10477-86.
235. Nieuwenhuis B, Lüth A, Chun J, Huwiler A, Pfeilschifter J, Schäfer-Korting M, et al. Involvement of the ABC-transporter ABCC1 and the sphingosine 1-phosphate receptor subtype

- S1P(3) in the cytoprotection of human fibroblasts by the glucocorticoid dexamethasone. *J Mol Med Berl Ger.* juin 2009;87(6):645-57.
236. Tanfin Z, Serrano-Sanchez M, Leiber D. ATP-binding cassette ABCC1 is involved in the release of sphingosine 1-phosphate from rat uterine leiomyoma ELT3 cells and late pregnant rat myometrium. *Cell Signal.* déc 2011;23(12):1997-2004.
237. Mitra P, Oskeritzian CA, Payne SG, Beaven MA, Milstien S, Spiegel S. Role of ABCC1 in export of sphingosine-1-phosphate from mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 31 oct 2006;103(44):16394-9.
238. Hisano Y, Kobayashi N, Kawahara A, Yamaguchi A, Nishi T. The Sphingosine 1-Phosphate Transporter, SPNS2, Functions as a Transporter of the Phosphorylated Form of the Immunomodulating Agent FTY720. *J Biol Chem.* 21 janv 2011;286(3):1758-66.
239. Lee Y-M, Venkataraman K, Hwang S-I, Han DK, Hla T. A novel method to quantify sphingosine 1-phosphate by immobilized metal affinity chromatography (IMAC). *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* nov 2007;84(3-4):154-62.
240. Kawahara A, Nishi T, Hisano Y, Fukui H, Yamaguchi A, Mochizuki N. The Sphingolipid Transporter Spns2 Functions in Migration of Zebrafish Myocardial Precursors. *Science.* 23 janv 2009;323(5913):524-7.
241. Nijnik A, Clare S, Hale C, Chen J, Raisen C, Mottram L, et al. The role of sphingosine-1-phosphate transporter Spns2 in immune system function. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 juill 2012;189(1):102-11.
242. Fukuhara S, Simmons S, Kawamura S, Inoue A, Orba Y, Tokudome T, et al. The sphingosine-1-phosphate transporter Spns2 expressed on endothelial cells regulates lymphocyte trafficking in mice. *J Clin Invest.* avr 2012;122(4):1416-26.
243. Hisano Y, Kobayashi N, Yamaguchi A, Nishi T. Mouse SPNS2 functions as a sphingosine-1-phosphate transporter in vascular endothelial cells. *PLoS One.* 2012;7(6):e38941.
244. Mendoza A, Bréart B, Ramos-Perez WD, Pitt LA, Gobert M, Sunkara M, et al. The transporter Spns2 is required for secretion of lymph but not plasma sphingosine-1-phosphate. *Cell Rep.* 29 nov 2012;2(5):1104-10.
245. Nagahashi M, Kim EY, Yamada A, Ramachandran S, Allegood JC, Hait NC, et al. Spns2, a transporter of phosphorylated sphingoid bases, regulates their blood and lymph levels, and the lymphatic network. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* mars 2013;27(3):1001-11.
246. Donoviel MS, Hait NC, Ramachandran S, Maceyka M, Takabe K, Milstien S, et al. Spinster 2, a sphingosine-1-phosphate transporter, plays a critical role in inflammatory and autoimmune diseases. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* déc 2015;29(12):5018-28.
247. Bradley E, Dasgupta S, Jiang X, Zhao X, Zhu G, He Q, et al. Critical Role of Spns2, a Sphingosine-1-Phosphate Transporter, in Lung Cancer Cell Survival and Migration. *PLoS ONE [Internet].* 2014 [cité 6 déc 2016];9(10). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pmc/articles/PMC4203763/>

248. Laurenzana A, Cencetti F, Serrati S, Bruno G, Japtok L, Bianchini F, et al. Endothelial sphingosine kinase/SPNS2 axis is critical for vessel-like formation by human mesoangioblasts. *J Mol Med Berl Ger.* oct 2015;93(10):1145-57.
249. Christoffersen C, Obinata H, Kumaraswamy SB, Galvani S, Ahnström J, Sevana M, et al. Endothelium-protective sphingosine-1-phosphate provided by HDL-associated apolipoprotein M. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 7 juin 2011;108(23):9613-8.
250. Thuy AV, Reimann C-M, Hemdan NYA, Gräler MH. Sphingosine 1-phosphate in blood: function, metabolism, and fate. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol.* 2014;34(1):158-71.
251. Schwab SR, Cyster JG. Finding a way out: lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nat Immunol.* déc 2007;8(12):1295-301.
252. Meshcheryakova A, Mechtcheriakova D, Pietschmann P. Sphingosine 1-phosphate signaling in bone remodeling: multifaceted roles and therapeutic potential. *Expert Opin Ther Targets.* juill 2017;21(7):725-37.
253. Kunkel GT, Maceyka M, Milstien S, Spiegel S. Targeting the sphingosine-1-phosphate axis in cancer, inflammation and beyond. *Nat Rev Drug Discov.* sept 2013;12(9):688-702.
254. Keller J, Catala-Lehnen P, Huebner AK, Jeschke A, Heckt T, Lueth A, et al. Calcitonin controls bone formation by inhibiting the release of sphingosine 1-phosphate from osteoclasts. *Nat Commun.* 21 oct 2014;5:5215.
255. Purdue PE, Crotti TN, Shen Z, Swantek J, Li J, Hill J, et al. Comprehensive profiling analysis of actively resorbing osteoclasts identifies critical signaling pathways regulated by bone substrate. *Sci Rep.* 23 déc 2014;4:7595.
256. Carpio LC, Stephan E, Kamer A, Dziak R. Sphingolipids stimulate cell growth via MAP kinase activation in osteoblastic cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* nov 1999;61(5):267-73.
257. Grey A, Xu X, Hill B, Watson M, Callon K, Reid IR, et al. Osteoblastic cells express phospholipid receptors and phosphatases and proliferate in response to sphingosine-1-phosphate. *Calcif Tissue Int.* juin 2004;74(6):542-50.
258. Dziak R, Yang BM, Leung BW, Li S, Marzec N, Margarone J, et al. Effects of sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid on human osteoblastic cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* mars 2003;68(3):239-49.
259. Bougault C, El Jamal A, Briolay A, Mebarek S, Boutet M-A, Garraud T, et al. Involvement of sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate metabolic pathway in spondyloarthritis. *Bone.* oct 2017;103:150-8.
260. Brizuela L, Martin C, Jeannot P, Ader I, Gstalder C, Andrieu G, et al. Osteoblast-derived sphingosine 1-phosphate to induce proliferation and confer resistance to therapeutics to bone metastasis-derived prostate cancer cells. *Mol Oncol.* oct 2014;8(7):1181-95.
261. Hashimoto Y, Matsuzaki E, Higashi K, Takahashi-Yanaga F, Takano A, Hirata M, et al. Sphingosine-1-phosphate inhibits differentiation of C3H10T1/2 cells into adipocyte. *Mol Cell Biochem.* mars 2015;401(1-2):39-47.

262. Sato C, Iwasaki T, Kitano S, Tsunemi S, Sano H. Sphingosine 1-phosphate receptor activation enhances BMP-2-induced osteoblast differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 22 juin 2012;423(1):200-5.
263. Matsuzaki E, Hiratsuka S, Hamachi T, Takahashi-Yanaga F, Hashimoto Y, Higashi K, et al. Sphingosine-1-phosphate promotes the nuclear translocation of β -catenin and thereby induces osteoprotegerin gene expression in osteoblast-like cell lines. *Bone.* août 2013;55(2):315-24.
264. Higashi K, Matsuzaki E, Hashimoto Y, Takahashi-Yanaga F, Takano A, Anan H, et al. Sphingosine-1-phosphate/S1PR2-mediated signaling triggers Smad1/5/8 phosphorylation and thereby induces Runx2 expression in osteoblasts. *Bone.* déc 2016;93:1-11.
265. Hashimoto Y, Kobayashi M, Matsuzaki E, Higashi K, Takahashi-Yanaga F, Takano A, et al. Sphingosine-1-phosphate-enhanced Wnt5a promotes osteogenic differentiation in C3H10T1/2 cells. *Cell Biol Int.* oct 2016;40(10):1129-36.
266. Zhang J-N, Zhao Y, Liu C, Han ES, Yu X, Lidington D, et al. The role of the sphingosine-1-phosphate signaling pathway in osteocyte mechanotransduction. *Bone.* oct 2015;79:71-8.
267. Dobrosak C, Gooi JH. Increased sphingosine-1-phosphate production in response to osteocyte mechanotransduction. *Bone Rep.* 1 déc 2017;7(Supplement C):114-20.
268. Jeney V. Clinical Impact and Cellular Mechanisms of Iron Overload-Associated Bone Loss. *Front Pharmacol.* 2017;8:77.
269. Lester RL, Withers BR, Schultz MA, Dickson RC. Iron, glucose and intrinsic factors alter sphingolipid composition as yeast cells enter stationary phase. *Biochim Biophys Acta.* avr 2013;1831(4):726-36.

Liste des publications

L. Peltier, C. Bendavid, T. Cavey, ML. Island, M. Doyard, P. Leroyer, C. Allain, M. De Tayrac, M. Ropert, O. Loréal, P. Guggenbuhl « **Iron excess upregulates SPNS2 mRNA levels but reduces Sphingosine-1-Phosphate export in human osteoblastic MG-63 cells** »

Article soumis « Bone ; Oct. 2017 »

Liste des communications orales

1. **L. Peltier**, C. Bendavid, ML. Island, P. Leroyer, O. Loréal, P. Guggenbuhl.
« **L'exposition au fer induit une diminution de l'export cellulaire du Sphingosine-1-Phosphate dans la lignée ostéoblastique humaine MG-63** ». 30^{ème} Congrès français de la Société Française de Rhumatologie, Paris, France, 12 décembre 2017

Liste des communications par affiches

1. **L. Peltier**, ML. Island, M. Doyard, C. Allain, C. Massart, C. Bendavid, O. Loréal, P. Guggenbuhl. « **Iron increased SPNS2 gene expression, a Sphingosine-1-Phosphate transporter in human osteoblastic MG-63 cells** ». Annual meeting of the European Iron Club, Innsbruck, Autriche, 7 au 10 avril 2016

2. **L. Peltier**, ML. Island, M. Doyard, C. Allain, C. Massart, C. Bendavid, O. Loréal, P. Guggenbuhl. « **Le fer induit l'expression de l'ARNm du gène SPNS2 codant un transporteur du Sphingosine-1-Phosphate dans la lignée cellulaire ostéoblastique humaine MG63** ». 28^{ème} Congrès français de la Société Française de Rhumatologie, Paris, France, 13 au 15 décembre 2015

Liste des travaux d'encadrement

Mémoire de **DES de Biochimie** (Interne en biologie médicale)

Mise au point d'une méthode de dosage du sphingosine-1-phosphate sanguin et son application chez les patients atteints d'hémochromatose, A. Pontis (Avril 2017)

Laboratoire de Biochimie – Toxicologie du CHU de Rennes

Mémoire de **Master 1 Santé** (Etudiants en 5^{ème} année de médecine)

Impact des cytokines BMP6, IL1 β et IL6 sur le niveau d'ARNm du gène HHIPL-2 dans les cellules ostéoblastiques MG-63, M. Robert, F. Guillemot (Avril 2013)

INSERM 1241, INRA1341, Nutrition Metabolisms and Cancer, Equipe CIMIAD

RESUME

Les surcharges en fer, qu'elles soient d'origine génétique ou secondaire, favorisent la baisse de densité minérale osseuse et par conséquent l'apparition d'une ostéoporose. Des liens entre surcharge en fer et perte osseuse ont pu être établis *in vivo* et *in vitro*, néanmoins les mécanismes mis en jeu, notamment sur la cellule ostéoblastique, restent incomplètement caractérisés. Notre objectif a donc été de préciser les mécanismes cellulaires conduisant à l'altération du phénotype et de l'activité ostéoblastique observée en présence d'un excès de fer.

La réalisation préalable d'une étude transcriptomique sur la lignée ostéoblastique humaine MG-63 nous a permis d'identifier plusieurs gènes susceptibles de voir leur niveau d'ARNm régulé par le fer. Il a été fait l'hypothèse que ces différents gènes pouvaient être impliqués dans la survenue des pertes osseuses observées au cours des surcharges en fer. Ainsi l'expression du gène *SPNS2*, dont la protéine permet l'export de la Sphingosine-1-Phosphate (S1P), a été identifiée comme potentiellement induite par un excès de fer. Les relations entre l'expression du gène *SPNS2* et un excès de fer ont ainsi été investiguées et les résultats obtenus ont mis en évidence une augmentation fer-dépendante de l'ARNm du gène *SPNS2* dans la lignée MG-63, non retrouvée dans d'autres types cellulaires.

Cette caractérisation nous a ainsi conduits à déterminer, dans la lignée MG-63, l'impact fonctionnel d'une exposition au fer sur l'export cellulaire de la S1P. Nous avons donc pour cela mis au point une méthode d'étude basée sur une stratégie « fluxomique » nous permettant d'évaluer l'efflux de la S1P au moyen d'un outil de spectrométrie de masse. Nos résultats objectivent une diminution des capacités de synthèse et d'export de la S1P en présence de fer et ceci malgré la surexpression du gène *SPNS2*. La diminution concomitante de l'expression du récepteur *S1PR1* et du gène *COL1A1* codant pour la chaîne α du collagène de type I suggère un impact fonctionnel de la baisse de concentration en S1P extracellulaire sur la cellule MG-63.

La mise en évidence, dans un modèle ostéoblastique, d'une altération fer-dépendante de l'axe de signalisation S1P/S1PR ouvre de nouvelles perspectives quant à la compréhension des mécanismes mis en jeu lors des pertes osseuses associées aux surcharges en fer.

Mots-clés : ostéoblaste, ostéoporose, fer, hémochromatose, sphingosine-1-phosphate, *SPNS2*

ABSTRACT

Osteoporosis may complicate genetic or secondary iron overload as reported in clinical and animal studies. However, the mechanisms leading to disrupted bone homeostasis are still to be fully elucidated. *In vitro*, iron exposure of both osteoblast and osteoclast cell models induces phenotypic and functional impairment, but the molecular mechanisms of iron excess on bone cell physiology are not well characterized, particularly in osteoblast. Our objective was to study the impact of iron overload on osteoblast biology and characterize the molecular mechanisms involved.

Transcriptomic analysis previously performed by our group on MG-63 osteoblast-like cell-line to identify iron-modulated genes revealed that expression of *SPNS2* gene, which encodes a transporter for the signaling lipid sphingosine 1-phosphate (S1P), is potentially induced by iron. The purpose of this work was to characterize the *SPNS2* iron-related regulation and analyze its potential impact on S1P efflux and the S1P/S1PR signaling pathway in MG-63 cells.

Our findings showed that iron exposure induces a dose-dependent increase of *SPNS2* mRNA levels in MG-63 osteoblast-like cells that was not observed in hepatocyte and enterocyte cell models. We then performed a fluxomic assay on MG-63 cells to investigate iron potential impact on S1P efflux. Unexpectedly, our data showed that extracellular S1P levels were decreased in presence of iron excess and its associated *SPNS2* upregulation. Furthermore, based on the observed iron associated *S1PR1* and *COL1A1* decrease, the defect in S1P export system seems to have functional consequence on MG-63 cells. These results suggest that iron may affect osteoblast S1P/S1PR signaling and potentially alter a wide range of bone processes, thus participating in bone impairment in situations of chronic iron overload. These data open a new door for the understanding of mechanisms involved in iron-induced osteoporosis.

Key words: osteoblast, osteoporosis, iron, hemochromatosis, sphingosine-1-phosphate, *SPNS2*