



**HAL**  
open science

# Synthèse des travaux en vue d'obtenir l'habilitation à diriger des recherches

Odile Broux

► **To cite this version:**

Odile Broux. Synthèse des travaux en vue d'obtenir l'habilitation à diriger des recherches. Sciences du Vivant [q-bio]. Université du Littoral Côte d'Opale, 2010. tel-04453278

**HAL Id: tel-04453278**

**<https://ulco.hal.science/tel-04453278v1>**

Submitted on 12 Feb 2024

**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.

# SOMMAIRE

CURRICULUM VITAE.....	p.2
PUBLICATIONS.....	p.5
SYNTHESE DES TRAVAUX DE RECHERCHE.....	p.10
AVANT PROPOS	p.11
TRAVAUX ANTERIEURS A 1999	p.13
TRAVAUX REALISES DE 1999 à 2008	p.15
TRAVAUX ACTUELS	p.19
I-Introduction	p.19
II-Contexte	p.20
III-Résultats expérimentaux	p.26
PROJETS DE RECHERCHE.....	p.38
I-Optimisation et caractérisation du modèle de coculture	p.39
II-Confirmation de l'association ALP/phénotype adipocytaire	p.40
III-Recherche des mécanismes impliqués dans les modifications phénotypiques induites par la coculture	p.41
IV-Conclusions	p.43
CONCLUSION.....	p.45
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	p.47
TRAVAUX SELECTIONNES.....	p.55

# CURRICULUM VITAE

## **BROUX Odile**

Née le 7 Octobre 1962 à Roubaix (59)

Mariée, 2 enfants

Situation professionnelle : Ingénieur de recherche - Université du Littoral Côte d'Opale – Laboratoire Physiopathologie des Maladies Osseuses Inflammatoires. EA 4490. IFR114. Boulogne-sur-mer.

## **FORMATION**

- 1997            Doctorat en Sciences Biologiques Fondamentales et Appliquées, option Biologie Moléculaire. Mention très honorable avec les félicitations du jury. Université du Littoral Côte d'Opale (ULCO).
- 1989            D.E.A. de Biologie Moléculaire des Organismes Eucaryotes. Université PARIS VII. Mention bien.
- 1985            Diplôme d'ingénieur en Génie Biologique de l'U.T.C. (Université Technologique de Compiègne).  
Filière Produits Biologiques et Alimentaires.
- 1980            Baccalauréat C. Lille.

## **ACTIVITES PROFESSIONNELLES**

**Depuis octobre 1999** : Ingénieur de recherche à l'ULCO, dans le Laboratoire Physiologie des Maladies Osseuses Inflammatoires (PMOI) (ex LR2B/LBCM) dirigé par le Pr. Pierre Hardouin. Participation au développement de modèles de recherche pour l'étude de la différenciation ostéoblastique.

**Oct. 98 / Sept. 99** : Attachée Temporaire d'Enseignement et de Recherche, section 64. ULCO, LR2B/LBCM. Qualifiée dans la section CNU 64 en 1999.

**Mai 90 / Sept. 98** : Ingénieur de recherche au Généthon à Evry (91), dans l'équipe « Dystrophie des Ceintures » dirigée par le Pr. Jacques Beckman. Participation à l'identification de 2 gènes responsables d'une maladie génétique, la Dystrophie des Ceintures.

**Mars 88 / Dec. 89** : - Ingénieur de recherche dans le service biologie moléculaire de la Société Chemunex à Maisons-Alfort (94). Développement de techniques de biologie moléculaire pour l'identification de microorganismes d'intérêt industriel pour l'agro-alimentaire.

- Stage de DEA sous la direction du Dr Brigitte Bertin : Mise au point d'une méthode de détection de levure par hybridation *in situ* avec une sonde fluorescente.

**Fev. 85 / Juil. 85** : Etudiante en stage au CEA à Fontenay-aux-roses (92) dans le service de Pathologie Expérimentale sous la direction du Dr. Gérard Frelat. Fixation d'anticorps sur chromosomes en suspension préparés pour l'analyse cytométrique en phase liquide.

## **RESPONSABILITES SCIENTIFIQUES**

### **ENCADREMENT :**

**Depuis Sept. 10 :** Encadrement de Sara Zgheib, doctorante, PMOI. ULCO.

**Depuis Nov. 08 :** Encadrement d'Aline Claubaut, A.T.E.R, PMOI. ULCO

**Oct. 07 / Juil. 10 :** Participation à l'encadrement de la thèse d'Olfa Ghali. PMOI. ULCO.

**Oct. 07 / Juil. 08 :** Participation à l'encadrement du stage M2 de Fayza Bouri. LR2B. ULCO.

**Avr. 07 / Sept. 07 :** Encadrement du stage M1 de Romain Salomez. LBCM. ULCO.

**Sept. 05 / Dec. 05 :** Encadrement du stage de Tao Hairong, chirurgien orthopédiste de l'Université de Shanghai. LBCM. ULCO.

**Oct. 01 / Juil. 05 :** Participation à l'encadrement de la thèse de Karine Bertaux. LBCM. ULCO.

**Oct. 03 / Sept. 04 :** Participation à l'encadrement du DEA de Cécilie Dufour. LBCM. ULCO.

**Année 2004 :** Encadrement technique et scientifique en Biologie Moléculaire de François Cornet, étudiant en thèse. LBCM. ULCO.

**2000 :** Encadrement du stage de Maîtrise de Laetitia Vandeweghe. LBCM. ULCO.

### **OBTENTION DE FINANCEMENTS DE PROJETS DE RECHERCHE :**

**2000 et 2003 :** Deux subventions auprès de la Société Française de Rhumatologie (SFR) pour les travaux portant sur les ossifications hétérotopiques.

**2009 :** Financement obtenu auprès de Merck &Co, Inc. pour les travaux portant sur l'étude des effets des adipokines sur la différenciation ostéoblastique.

### **VALORISATION :**

U.S. Application N° 08/547, 182 : «  $\beta$ -sarcoglycan nucleic acid sequence, mutations and applications. » Duclos, F., **Broux, O.**, Lim, L.E., Sunada, Y., Jackson, C.E., Campbell, K.P. and Beckmann, J.S. 1995.

### **FONCTIONS DIVERSES :**

Reviewer pour: Clinical Orthopaedics and Related Research  
Calcified Tissue International

Membre de la Société Française de Biologie des Tissus Minéralisés (SFBTM). Participation à l'organisation du 10<sup>ème</sup> congrès de la SFBTM, Saint-Valéry sur Somme, 24-26 mai 2007.

## ACTIVITES PEDAGOGIQUES

**Oct. 98 / Oct. 99** : Attachée Temporaire d'Enseignement et de Recherche. LBCM. Université du Littoral Côte d'Opale. Enseignements dispensés en section 64 : Génétique niveau DEUG SV1 (TD), biologie cellulaire DEUG SV1 (TD), biologie moléculaire L3 (TP).

**Depuis 2008** : Participation à la co-organisation d'une journée thématique dans le cadre du Master Biologie Santé de Lille 2.

# PUBLICATIONS

## Publications dans des journaux à comité de lecture

1. Clabaut, A., Delplace, S., Chauveau, C., Hardouin, P., and **Broux, O.** 2010. Human osteoblasts derived from mesenchymal stem cells express adipogenic markers upon coculture with bone marrow adipocytes. *Differentiation* 80:40-45.
2. Ghali, O., Chauveau, C., Hardouin, P., **Broux, O.**, and Devedjian, J.C. 2010. TNF-alpha's effects on proliferation and apoptosis in human mesenchymal stem cells depend on RUNX2 expression. *J Bone Miner Res* 25:1616-1626.
3. Ghali, O., Chauveau, C., Lencel, P., Salomez, R., Hani, K., Hardouin, P., **Broux, O.**, and Devedjian, J.C. 2010. Runx2 regulates the effects of TNF alpha on proliferation and apoptosis in SaOS-2 cells. *Bone* 41:901-910.
4. Ding, J., Ghali, O., Lencel, P., **Broux, O.**, Chauveau, C., Devedjian, J.C., Hardouin, P., and Magne, D. 2009. TNF-alpha and IL-1beta inhibit RUNX2 and collagen expression but increase alkaline phosphatase activity and mineralization in human mesenchymal stem cells. *Life Sci* 84:499-504.
5. Chauveau, C., **Broux, O.**, Delecourt, C., Hardouin, P., Jeanfils, J., and Devedjian, J.C. 2008. Gene expression in normotopic and heterotopic human bone: increased level of SP7 mRNA in pathological tissue. *Mol Cell Biochem* 318:81-87.
6. Chauveau, C., Devedjian, J.C., Delecourt, C., Jeanfils, J., Hardouin, P., and **Broux, O.** 2008. Leptin receptors and beta2-adrenergic receptor mRNA expression in brain injury-related heterotopic ossification. *J Recept Signal Transduct Res* 28:347-359.
7. Chauveau, C., Devedjian, J.C., Hardouin, P., and **Broux, O.** 2006. Comments on the publication "A comparative analysis of phenotype expression in human osteoblasts

- from heterotopic ossification and normal bone". *Langenbecks Arch Surg* 391:439; author reply 440.
8. Bertaux, K., **Broux, O.**, Chauveau, C., Hardouin, P., Jeanfils, J., and Devedjian, J.C. 2006. Runx2 regulates the expression of GNAS on SaOs-2 cells. *Bone* 38:943-950.
  9. Bertaux, K., **Broux, O.**, Chauveau, C., Jeanfils, J., and Devedjian, J.C. 2005. Identification of CBFA1-regulated genes on SaOs-2 cells. *J Bone Miner Metab* 23:114-122.
  10. Chauveau, C., Devedjian, J.C., Blary, M.C., Delecourt, C., Hardouin, P., Jeanfils, J., and **Broux, O.** 2004. Gene expression in human osteoblastic cells from normal and heterotopic ossification. *Exp Mol Pathol* 76:37-43.
  11. Cornet, F., **Broux, O.**, Anselme, K., Hardouin, P., and Jeanfils, J. 2004. Effect of dexamethasone on moesin gene expression in rabbit bone marrow stromal cells. *Mol Cell Biochem* 265:79-83.
  12. Anselme, K., **Broux, O.**, Noel, B., Bouxin, B., Bascoulergue, G., Dudermeil, A.F., Bianchi, F., Jeanfils, J., and Hardouin, P. 2002. In vitro control of human bone marrow stromal cells for bone tissue engineering. *Tissue Eng* 8:941-953.
  13. **Broux, O.**, Duclos, F., Bourg, N., Straub, V., Feldman, G.L., Sunada, Y., Lim, L.E., Piccolo, F., Cutshall, S., Gary, F., et al. 1998. Beta-sarcoglycan: genomic analysis and identification of a novel missense mutation in the LGMD2E Amish isolate. *Neuromuscul Disord* 8:30-38.
  14. Dincer, P., Leturcq, F., Richard, I., Piccolo, F., Yalnizoglu, D., de Toma, C., Akcoren, Z., **Broux, O.**, Deburgrave, N., Brenguier, L., et al. 1997. A biochemical, genetic, and clinical survey of autosomal recessive limb girdle muscular dystrophies in Turkey. *Ann Neurol* 42:222-229.
  15. Beckmann, J.S., Richard, I., **Broux, O.**, Fougrouse, F., Allamand, V., Chiannikulchai, N., Lim, L.E., Duclos, F., Bourg, N., Brenguier, L., et al. 1996.

- Identification of muscle-specific calpain and beta-sarcoglycan genes in progressive autosomal recessive muscular dystrophies. *Neuromuscul Disord* 6:455-462.
16. Beckmann, J.S., Richard, I., **Broux, O.**, Fougrousse, F., Allamand, V., Chiannikulchai, N., Lim, L.E., Duclos, F., Bourg, N., Brenguier, L., et al. 1996. Identification of muscle-specific calpain and beta-sarcoglycan genes in progressive muscular dystrophies. *Cellular Pharmacology* 3:189-194.
  17. Allamand, V., **Broux, O.**, Bourg, N., Richard, I., Tischfield, J.A., Hodes, M.E., Conneally, P.M., Fardeau, M., Jackson, C.E., and Beckmann, J.S. 1995. Genetic heterogeneity of autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy in a genetic isolate (Amish) and evidence for a new locus. *Hum Mol Genet* 4:459-463.
  18. Allamand, V., **Broux, O.**, Richard, I., Fougrousse, F., Chiannikulchai, N., Bourg, N., Brenguier, L., Devaud, C., Pasturaud, P., Pereira de Souza, A., et al. 1995. Preferential localization of the limb-girdle muscular dystrophy type 2A gene in the proximal part of a 1-cM 15q15.1-q15.3 interval. *Am J Hum Genet* 56:1417-1430.
  19. **Broux, O.**, Lim, L.E., Duclos, F., Bourg, N., Sunada, Y., Allamand, V., Meyer, J., Richard, I., Moomaw, C., Slaughter, C., et al. 1995. Beta-sarcoglycan: characterization and role in limb-girdle muscular dystrophy linked to 4q12. *Nat Genet* 11:257-265.
  20. Richard, I., **Broux, O.**, Allamand, V., Fougrousse, F., Chiannikulchai, N., Bourg, N., Brenguier, L., Devaud, C., Pasturaud, P., Roudaut, C., et al. 1995. Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Cell* 81:27-40.
  21. Abbadi, N., Philippe, C., Chery, M., Gilgenkrantz, H., Tome, F., Collin, H., Theau, D., Recan, D., **Broux, O.**, Fardeau, M., et al. 1994. Additional case of female monozygotic twins discordant for the clinical manifestations of Duchenne muscular dystrophy due to opposite X-chromosome inactivation. *Am J Med Genet* 52:198-206.
  22. Fougrousse, F., **Broux, O.**, Richard, I., Allamand, V., de Souza, A.P., Bourg, N., Brenguier, L., Devaud, C., Pasturaud, P., Roudaut, C., et al. 1994. Mapping of a



- chromosome 15 region involved in limb girdle muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 3:285-293.
23. Joyce, C., Fanning, L., Malcolm, S., Richard, I., **Broux, O.**, Beckmann, J.S., Flint, T., Kruse, T.A., Vergnaud, G., Cox, S.A., et al. 1994. The EUROGEN map of human chromosome 15. *Eur J Hum Genet* 2:232-233.
  24. Richard, I., **Broux, O.**, Chiannikulchai, N., Fougèrouse, F., Allamand, V., Bourg, N., Brenguier, L., Devaud, C., Pasturaud, P., Roudaut, C., et al. 1994. Regional localization of human chromosome 15 loci. *Genomics* 23:619-627.
  25. Beckmann, J.S., Tomfohrde, J., Barnes, R.I., Williams, M., **Broux, O.**, Richard, I., Weissenbach, J., and Bowcock, A.M. 1993. A linkage map of human chromosome 15 with an average resolution of 2 cM and containing 55 polymorphic microsatellites. *Hum Mol Genet* 2:2019-2030.
  26. Passos-Bueno, M.R., Richard, I., Vainzof, M., Fougèrouse, F., Weissenbach, J., **Broux, O.**, Cohen, D., Akiyama, J., Marie, S.K., Carvalho, A.A., et al. 1993. Evidence of genetic heterogeneity in the autosomal recessive adult forms of limb-girdle muscular dystrophy following linkage analysis with 15q probes in Brazilian families. *J Med Genet* 30:385-387.
  27. Fougèrouse, F., Richard, I., **Broux, O.**, Cohen, D., and Beckmann, J.S. 1992. Mapping of two chromosome 15 microsatellites. *Genomics* 13:903-904.
  28. Richard, I., **Broux, O.**, Hillaire, D., Cherif, D., Fougèrouse, F., Cohen, D., and Beckmann, J.S. 1992. Mapping of the formin gene and exclusion as a candidate gene for the autosomal recessive form of limb-girdle muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 1:621-624.
  29. Beckmann, J.S., Richard, I., Hillaire, D., **Broux, O.**, Antignac, C., Bois, E., Cann, H., Cottingham, R.W., Jr., Feingold, N., Feingold, J., et al. 1991. A gene for limb-girdle muscular dystrophy maps to chromosome 15 by linkage. *C R Acad Sci III* 312:141-148.

30. Bertin, B., **Broux, O.**, and Van Hoegaerden, M. 1990. Flow cytometric detection of yeast by in situ hybridization with a fluorescent ribosomal RNA probe. *Journal of Microbiological Methods* 12:1-12.

#### **Publications de revues dans des journaux à comité de lecture**

**Broux, O.**, Chauveau, C., Magne, D., and Hardouin, P. 2009. Dialogue entre adipocytes et ostéoblastes. *Réflexions rhumatologiques* 119 :217-220.

Duclos, F., Lim, L.E., Sunada, Y., Meyer, J., Campbell, K.P., **Broux, O.**, Bourg, N., Allamand, V., Richard, I., Beckmann, J.S., et al. 1995. Beta-sarcoglycane: une protéine du complexe dystrophine-glycoprotéines est responsable d'une forme récessive de dystrophie musculaire. *Médecine/sciences* 11:1732-1738.

# **SYNTHESE DES TRAVAUX DE RECHERCHE**

## AVANT PROPOS

Avant de présenter plus en détails mes activités de recherche, il me semblait utile de retracer brièvement l'ensemble de mon parcours et d'en expliquer les étapes, ce qui fait l'objet de cet avant-propos.

J'ai eu la chance d'être intégrée en tant qu'ingénieur de recherche dans une des toutes premières équipes de Généthon, organisme de recherche créé en 1990 par l'Association Française contre les Myopathies. Cette équipe de génétique moléculaire, initialement dirigée par le Pr. Daniel Cohen puis par le Pr. Jacques Beckmann, travaillait sur les dystrophies des ceintures, un groupe de maladies musculaires transmises de façon héréditaire. Au sein de cette équipe, j'ai participé à la localisation primaire du gène responsable d'une forme récessive de la maladie, à l'établissement de cartes génétiques et physiques de la région contenant le locus morbide puis à l'identification du gène. C'est au cours de ces études génétiques que l'existence d'un autre locus a été démontrée et j'ai alors été chargée de sa localisation puis de la démarche de clonage positionnel nécessaire à son identification. L'identification de ce gène ainsi que la détermination et l'analyse de sa séquence génomique ont ainsi constitué le sujet de ma thèse de doctorat. C'est pour raison familiale que j'ai quitté Généthon et je qualifierais les dix années que j'y ai passées, qu'il faut replacer dans le contexte scientifique du programme « génome humain », d'exceptionnelles. Plus concrètement, elles constituent une première expérience réussie de la recherche, associée à un important enrichissement personnel scientifique et technique.

En octobre 1998, j'ai intégré, en tant qu'ATER, le Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire (LBCM, EA 2603) de l'Université du Littoral Côte d'Opale, dirigé par le Pr. J. Jeanfils. Mon recrutement fut principalement motivé par mes apports et compétences en biologie moléculaire. Au cours de cette année d'ATER, je me suis inscrite sur la liste de qualification aux fonctions de maître de conférences dans la section du Conseil National des universités n° 64 dans le but de concourir sur un poste octroyé au laboratoire. Peu de temps avant le concours, un poste d'ingénieur de recherche (IR) a également été attribué au laboratoire. Hasard, chance ou destin ? Quoiqu'il en soit, j'ai choisi de devenir IR afin de pouvoir me consacrer entièrement à la recherche. Après ma prise de fonctions, le LBCM a fusionné avec l'Institut de Recherche sur les Maladies de Squelette (IRMS) de Berck-sur-mer

pour devenir le Laboratoire de Recherche sur les Biomatériaux et les Biotechnologies (LR2B, EA 2603). Dans ce contexte, une réorganisation a eu lieu au sein du laboratoire afin de recentrer ses activités. Nous avons alors formé, avec les Dr Christophe Chauveau et Jean-Christophe Devedjian, une nouvelle équipe (équipe EDO, Etude de la Différenciation Ostéoblastique) dont les voies de recherche se sont orientées vers l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans le contrôle et la régulation de la différenciation ostéoblastique. L'équipe a développé deux approches complémentaires basées sur l'étude de lignées humaines génétiquement modifiées et d'une forme d'ossification hétérotopique.

En 2006, le laboratoire a intégré l'IFR114 et a fait évoluer sa thématique en concertation avec cet institut. L'équipe EDO s'est alors focalisée sur l'influence de cytokines inflammatoires sur la différenciation ostéoblastique.

Enfin, dans le cadre de la dernière contractualisation, notre laboratoire a fusionné avec l'EA 4032 de Lille 2 dans le but de constituer une équipe unique consacrée à la recherche sur le tissu osseux, le PMOI (Physiopathologie des Maladies Osseuses Inflammatoires, EA 4490), dirigée par le Pr. P. Hardouin. Le projet de recherche de l'équipe repose depuis lors sur l'hypothèse que des altérations intra-osseuses, liées à l'adiposité médullaire, jouent un rôle important dans la physiopathologie de l'ostéoporose. Ces altérations locales, correspondant à une modification de la répartition des différents constituants du tissu osseux, impliqueraient des interactions entre ostéogenèse et adipogenèse. Ma participation actuelle à ce projet porte sur l'étude de l'influence des adipocytes de la moelle osseuse sur la différenciation des ostéoblastes.

Ce sont ces travaux les plus récents, ainsi que leurs perspectives, que j'ai choisi de développer plus en détails dans ce mémoire. Ma participation aux travaux effectués à Généthon ainsi qu'aux thèmes de recherche abordés depuis ma prise de fonction à l'ULCO sera au préalable résumée de façon plus succincte.

## TRAVAUX ANTERIEURS A 1999

Les dystrophies musculaires des ceintures représentent un groupe de myopathies héréditaires, se caractérisant principalement par une faiblesse et une atrophie des muscles proximaux des membres chez l'enfant et le jeune adulte. Durant mes premières années à Généthon, j'ai participé à la localisation primaire du locus d'une forme transmise selon le mode récessif, appelé LGMD2A (1). L'établissement de cartes génétiques et physiques de la région a permis de mieux cerner l'intervalle génétique contenant le locus morbide puis la recherche des transcrits de cet intervalle a mené à l'identification du gène responsable codant pour une protéase spécifique du muscle, la calpaine 3 (2-10). C'est au cours des études génétiques que l'existence d'un nouveau locus impliqué dans l'étiologie des formes récessives de la maladie a été démontrée (11). Conformément à la nomenclature en usage, ce locus a été appelé LGMD2E. Une démarche de clonage positionnel a été adoptée en vue de l'identification du gène, conduisant à la localisation primaire du locus morbide dans la région péri-centromérique du chromosome 4. L'analyse génétique a permis la définition d'un intervalle, estimé à 3cM et contenant le locus LGMD2E, sur lequel a été entreprise la construction d'une carte physique sous forme d'un continuum de clones de YACS.

Parallèlement à cette étude, le groupe du Dr Campbell (Université d'Iowa, Etats-Unis) a cloné et caractérisé le gène de la  $\beta$ -sarcoglycane, une glycoprotéine de 43 kDa du complexe associé à la dystrophine. Ce gène, localisé en 4q 12, représentait un excellent candidat positionnel et fonctionnel pour cette myopathie. Des travaux communs ont permis d'identifier une mutation ségrégeant à l'état homozygote dans le gène de la  $\beta$ -sarcoglycane chez tous les patients étudiés et de révéler une réduction concomitante de la protéine au niveau du sarcolemme, confirmant son implication dans la dystrophie des ceintures de forme LGMD2E (12-14).

La détermination de la séquence complète du gène de la  $\beta$ -sarcoglycane a par la suite été entreprise, un cosmide contenant le gène a été entièrement séquencé de façon aléatoire. L'assemblage des séquences a conduit à l'établissement d'un continuum unique de 36159 pb. L'organisation génomique du gène de la  $\beta$ -sarcoglycane a été déduite de cette séquence consensus, six exons ont été mis en évidence, représentant une séquence codante de 954 paires de bases. L'étude de la structure du gène a été complétée par des analyses *in silico* en utilisant de manière comparative des programmes de différents packages informatiques (15).

L'identification du gène responsable de la forme LGMD2A s'est faite au terme de cinq années d'efforts en utilisant l'approche conventionnelle du clonage positionnel. L'ensemble de l'équipe, composée de deux ingénieurs (dont moi-même) et six techniciennes, s'est investi dans ce travail qui a également constitué le travail de thèse de trois étudiantes. Lorsque l'existence d'un autre locus a été démontrée, j'ai été chargée, avec l'aide d'une technicienne, de sa localisation puis de la démarche de clonage positionnel nécessaire à son identification. L'identification de ce gène ainsi que la détermination et l'analyse de sa séquence génomique ont ainsi constitué le sujet de ma thèse de doctorat. La combinaison des approches de clonage positionnel et fonctionnel a permis un gain de temps considérable dans l'identification du locus morbide. L'obtention des résultats a également été accélérée par la mise à disposition des marqueurs provenant de la carte génétique développée à Généthon et par l'existence des cartes physiques intégrées et des cartes de transcrits. Lorsque j'ai quitté Généthon, 15 articles relatifs à l'ensemble de ces travaux avaient été publiés.

## **TRAVAUX REALISES DE 1999 à 2008**

Depuis ma prise de fonction à l'ULCO, j'ai participé à plusieurs travaux de recherche. Chacun d'entre eux est résumé brièvement ci-dessous en suivant l'évolution chronologique de la thématique. J'ai personnellement initié la caractérisation des cellules de moelle osseuse lors de mon année d'ATER. Par la suite, nous avons formé, avec les Dr Christophe Chauveau et Jean-Christophe Devedjian, un petit groupe intitulé EDO pour Etude de la Différenciation Ostéoblastique et nous avons abordé cette problématique par l'intermédiaire des techniques de biologie moléculaire et de génétique que nous maîtrisons. C'est ainsi que nous avons développé au laboratoire les moyens d'établir et d'étudier des lignées cellulaires génétiquement modifiées ainsi que d'analyser le phénotype de biopsies osseuses. Précisons que je me suis plus particulièrement impliquée dans l'axe portant sur l'analyse du phénotype ostéoblastique des ossifications hétérotopiques, tout en participant de façon active à l'avancée des autres projets.

### **Caractérisation de cellules de moelle osseuse en culture**

Les cellules à l'origine des ostéoblastes sont des cellules souches mésenchymateuses multipotentes présentes dans la moelle osseuse. Ces cellules souches sont des cibles de choix pour des thérapies cellulaires visant à régénérer l'os. Pour envisager ce type d'application, il faut maîtriser les mécanismes contrôlant la prolifération et la différenciation ostéoblastique lors des étapes de culture cellulaire *in vitro*. Les techniques de synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) et d'amplification spécifique des ADNc par PCR (polymerase chain reaction) permettent d'analyser le phénotype cellulaire et de caractériser l'état de différenciation des cellules. C'est ainsi que j'ai eu en charge à mon arrivée le développement de ces techniques de biologie moléculaire. J'ai mis au point un ensemble de marqueurs caractéristiques de l'état de différenciation des cellules osseuses. Ces outils ont permis la caractérisation phénotypique des cellules de moelle osseuse avant leur mise en culture ainsi que l'évaluation du potentiel ostéogénique de différents sérums et effecteurs. Les profils d'expression génique obtenus nous ont renseignés sur l'état des cellules prélevées et sur les effets des traitements et nous ont permis d'orienter les conditions de culture en vue d'améliorer la différenciation des ostéoblastes (16). Dans le cadre de ces projets, j'ai également mis au



point la technique de « differential display » qui permet, dans des études comparatives, de cloner, identifier et caractériser les gènes codant pour des protéines exprimées différemment. Cette technique a été appliquée à des cellules de moelle osseuse de lapin, mises en culture en présence ou en absence de dexaméthasone, ce qui a permis d'identifier les gènes dont l'expression est influencée par ce traitement (17). J'ai personnellement encadré scientifiquement et techniquement ce travail, effectué dans le cadre de la thèse de Doctorat de François Cornet (Mai 2003).

### **Recherche de marqueurs sous la dépendance du facteur de transcription ostéoblastique Runx2**

La régulation transcriptionnelle des premières étapes de la différenciation ostéoblastique est orchestrée par Runx2 (runt-related transcription factor 2, précédemment dénommé Cbfa1), gène indispensable à la mise en place du squelette et primordial dans le maintien des fonctions ostéoblastiques chez l'adulte. Dans le but de mettre en évidence des gènes sous la dépendance de Runx2, la lignée d'ostéosarcome humain SaOs-2 a été transfectée de façon stable par des constructions plasmidiques permettant la sur-expression d'une forme mutante dominante négative ( $\Delta$ CBFA1) pouvant bloquer les effets transcriptionnels de Runx2. La sélection des clones s'est faite par Dot-Blot et PCR en temps réel afin d'isoler des clones présentant différents niveaux d'expression du transgène. La comparaison de leurs profils d'expression génique nous a permis d'identifier cinq gènes sous la dépendance de Runx2 (18) et de montrer son implication dans la régulation au niveau transcriptionnel de GNAS1, qui code pour la sous-unité  $\alpha$  des protéines Gs (19). Ces travaux ont été réalisés dans le cadre de la thèse de doctorat de Karine Bertaux soutenue au cours de l'année 2005.

### **Analyse du phénotype ostéoblastique des ossifications hétérotopiques**

L'ossification hétérotopique est un développement d'os mature dans des tissus où il n'est normalement pas présent. Il s'agit d'une complication pouvant survenir après un traumatisme crânien. Cette ossification, encore appelée ostéome, se développe à proximité des articulations, provoquant douleurs et perte de mobilité nécessitant parfois une exérèse chirurgicale. Grâce à une collaboration avec les hôpitaux du groupe Hopale de Berck-sur-mer, nous avons eu l'opportunité d'étudier cette ossification anormale. Les travaux ont été menés sur des prélèvements humains d'os sains et d'ossifications hétérotopiques. Ils ont permis de

comparer les profils d'expression génique de ces biopsies osseuses et d'étudier les voies de régulation potentiellement impliquées dans l'apparition de ces excroissances osseuses. Cette analyse nous a permis de démontrer l'existence d'une surexpression d'ostéocalcine dans les ostéocytes des ossifications hétérotopiques (20). Des analyses complémentaires ont montré une sur-expression significative du facteur de transcription Sp7 ainsi que du récepteur à la vitamine D, suggérant une action combinée de ces facteurs sur la sur-expression d'ostéocalcine (21). Par ailleurs, une recherche des autres voies de régulation potentiellement impliquées dans l'apparition de ces excroissances osseuses nous a permis de suggérer une implication de la leptine, via le système nerveux central et le système  $\beta$ 2 adrénergique (22). Ces travaux ont fait l'objet de deux financements obtenus en 2000 et 2003 auprès de la Société française de Rhumatologie (SFR).

### **Influence des cytokines inflammatoires sur la différenciation ostéoblastique**

Le TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ) est une cytokine pro-inflammatoire majeure. Il joue un rôle important dans la perte osseuse inflammatoire, en stimulant l'activité de la résorption osseuse par les ostéoclastes et en diminuant la formation osseuse par les ostéoblastes. De nombreuses études récentes montrent son implication dans le contrôle de la différenciation ostéoblastique. Or les régulations de la différenciation, de la prolifération et de l'apoptose sont étroitement coordonnées et, chez les ostéoblastes, le niveau d'expression de la protéine Runx2 semble jouer un rôle central dans cette régulation. En effet, l'expression de Runx2 augmente au cours de la différenciation ostéoblastique et il semble aussi que ce facteur soit impliqué dans l'arrêt de la prolifération cellulaire. L'analyse de la prolifération des clones de la lignée humaine SaOs-2 présentant différents niveaux d'expression de Runx2 a confirmé l'effet inhibiteur de ce facteur de transcription sur la croissance cellulaire, en suggérant que Runx2 agirait sur la vitesse de division et favoriserait la sortie du cycle prolifératif vers la voie de différenciation. Le même modèle a permis d'évaluer les effets du TNF- $\alpha$  sur la prolifération et l'apoptose des cellules osseuse, en fonction du niveau de Runx2. Les résultats obtenus ont montré que les clones exprimant la forme dominante négative de Runx2 semblent devenus insensibles à l'action antiproliférative et apoptotiques du TNF- $\alpha$ , soulignant le rôle de Runx2 dans la sensibilité au TNF $\alpha$  et notamment dans la voie de signalisation de l'apoptose (23). Par la suite, nous avons confirmé ces résultats dans un modèle plus physiologique, en montrant

que l'inhibition de Runx2 par de petits ARN interférents (siRNA) protège des cellules souches mésenchymateuses humaines des effets anti-prolifératifs et apoptotiques du TNF $\alpha$ 's, suggérant que Runx2 pourrait contrôler la croissance cellulaire en régulant l'expression d'éléments impliqués dans la sensibilité aux hormones et aux cytokines (24). Ce travail a en partie été réalisé dans le cadre du stage de Master 1 de Romain Salomez que j'ai encadré en 2007 et de la thèse de doctorat d'Olfa Ghali soutenue en juillet 2010.

## **Conclusions**

Les Pr. Jeanfils et Hardouin m'ont tous deux encouragée à développer une activité correspondant davantage à celle d'un chercheur qu'à celle classiquement attribuée à un ingénieur. Ils m'ont ainsi confié l'animation de l'équipe EDO au sein de laquelle j'ai activement participé à la mise au point et au développement des projets de recherche, à l'encadrement des étudiants, à la recherche de financement ainsi qu'aux échanges collaboratifs, notamment avec les cliniciens dans le cadre du projet portant sur les ossifications hétérotopiques. L'ensemble de ces travaux a fait l'objet de 10 publications dont 3 en dernier auteur.

# INFLUENCE DES ADIPOCYTES DE LA MOELLE OSSEUSE SUR LA DIFFERENCIATION DES OSTEOBLASTES

## I-Introduction

Dans le cadre de la dernière contractualisation, notre laboratoire a fusionné avec l'EA 4032 de Lille 2 dans le but de constituer une équipe unique consacrée à la recherche sur le tissu osseux, le PMOI (Physiopathologie des Maladies Osseuses Inflammatoires, EA 4490). Cette équipe associe des rhumatologues, des odontologistes, des chirurgiens orthopédistes, des radiologues, des physico-chimistes, des physiologistes et des biologistes cellulaires et moléculaires. Le regroupement a conduit à l'élaboration d'un projet scientifique commun portant sur le rôle des facteurs locaux dans la pathogénie de l'ostéoporose et de l'ostéonécrose. L'objectif est d'étudier l'impact des modifications locales, liées à l'augmentation de l'adiposité médullaire, sur les pertes osseuses de l'ostéoporose et sur l'ostéonécrose fémorale ou maxillaire. Les compétences pluridisciplinaires apportées par l'équipe permettent d'aborder les relations os/graisse au niveau cellulaire mais également au niveau du tissu, les techniques de spectroscopie Raman et d'Imagerie à Résonance Magnétique permettant de caractériser l'os sur le plan minéral et adipeux. Deux sous-équipes ont été constituées, chacune travaillant sur l'une des pathologies. De fortes interactions existent entre les deux groupes étant donné que la problématique abordée relève de la même hypothèse et que certaines approches sont communes et utilisent les mêmes compétences (citons les aspects rhumatologiques, l'imagerie ou la physiologie de l'adipocyte). L'étude portant sur l'ostéoporose associe (1) une approche clinique explorant les pertes osseuses liées à l'anorexie mentale, (2) une approche expérimentale animale permettant d'obtenir une vision intégrée des relations os/graisse au cours de cette pathologie et (3) une approche *in vitro* afin d'étudier les interactions au niveau cellulaire, plus particulièrement centrée sur l'influence des adipocytes de la moelle osseuse sur la différenciation des ostéoblastes.

Outre l'évolution thématique, la création de l'équipe PMOI a considérablement modifié l'organisation du laboratoire. C'est-à-dire que le travail en équipe auquel nous étions habitués dans le cadre de l'équipe EDO a fait place à une répartition plus personnelle des approches utilisées. C'est ainsi qu'en étant chargée de développer l'approche *in vitro*, il m'a fallu acquérir une démarche plus autonome, de la réflexion initiale portant sur les hypothèses et la façon d'y apporter des éléments de réponse jusqu'à la mise au point du modèle.

Par la suite, grâce au recrutement d'Aline Clabaut, ATER, qui m'a secondée dans ce projet, les premiers résultats ont été obtenus rapidement et ont fait l'objet d'une publication.

Dans cette partie, seront présentés successivement le contexte de l'étude, ses objectifs, les résultats expérimentaux et leur discussion.

## **II-Contexte**

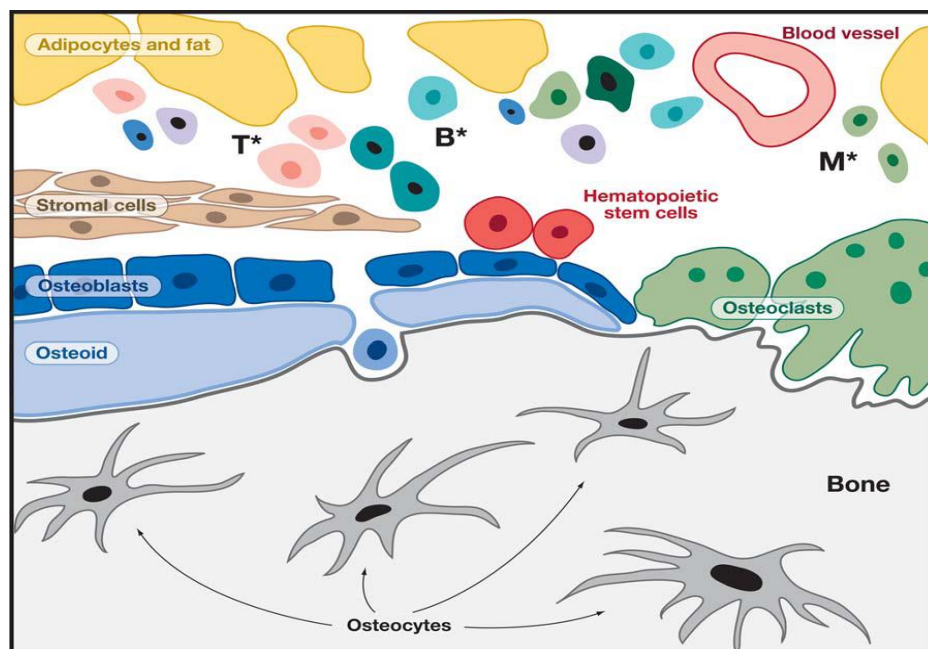
### **Tissu osseux, remodelage et ostéoporose**

Le tissu osseux est un tissu conjonctif spécialisé, caractérisé par une matrice extracellulaire solide. Il a un rôle primordial de soutien et de protection des autres tissus de l'organisme, de maintien de l'homéostasie minérale et représente également une source de cellules hématopoïétiques pour la régénération du système sanguin et immunitaire. Le tissu osseux a la particularité d'être en constant renouvellement, grâce à l'action séquentielle et opposée de deux cellules : les ostéoblastes qui assurent la formation de l'os et les ostéoclastes responsables de sa résorption. C'est du bon fonctionnement de ce processus, appelé remodelage, que dépend le maintien de la masse osseuse. Tout déséquilibre entre formation et résorption est associé à des pathologies osseuses, notamment l'ostéoporose. Cette affection est caractérisée par une diminution de la densité osseuse et une altération de la microarchitecture du tissu osseux, ce qui entraîne fragilité de l'os et risque de fracture. Chez l'homme, le capital osseux diminue lentement à partir de 40 ans environ. Cette perte osseuse liée à l'âge peut conduire à l'ostéoporose si le capital osseux en fin de croissance était insuffisant ou si l'activité de remodelage a un bilan très déficitaire. Chez la femme, la perte osseuse s'accélère nettement à la ménopause, du fait de la carence en oestrogènes, et augmente considérablement le risque de fractures. L'ostéoporose sénile et post-ménopausique constituent les deux types d'ostéoporose primaire. L'ostéoporose peut également être secondaire à certains traitements, à une immobilisation prolongée, ou à une autre pathologie.

C'est ainsi qu'elle représente une complication sérieuse de l'anorexie mentale, les adaptations physiologiques à la privation énergétique affectant le métabolisme osseux (25-27). Une caractéristique particulière retrouvée à la fois dans l'ostéoporose liée à l'âge, l'ostéoporose post-ménopausique et l'ostéoporose de l'anorexie mentale est l'augmentation de l'adiposité au sein de la moelle osseuse (28).

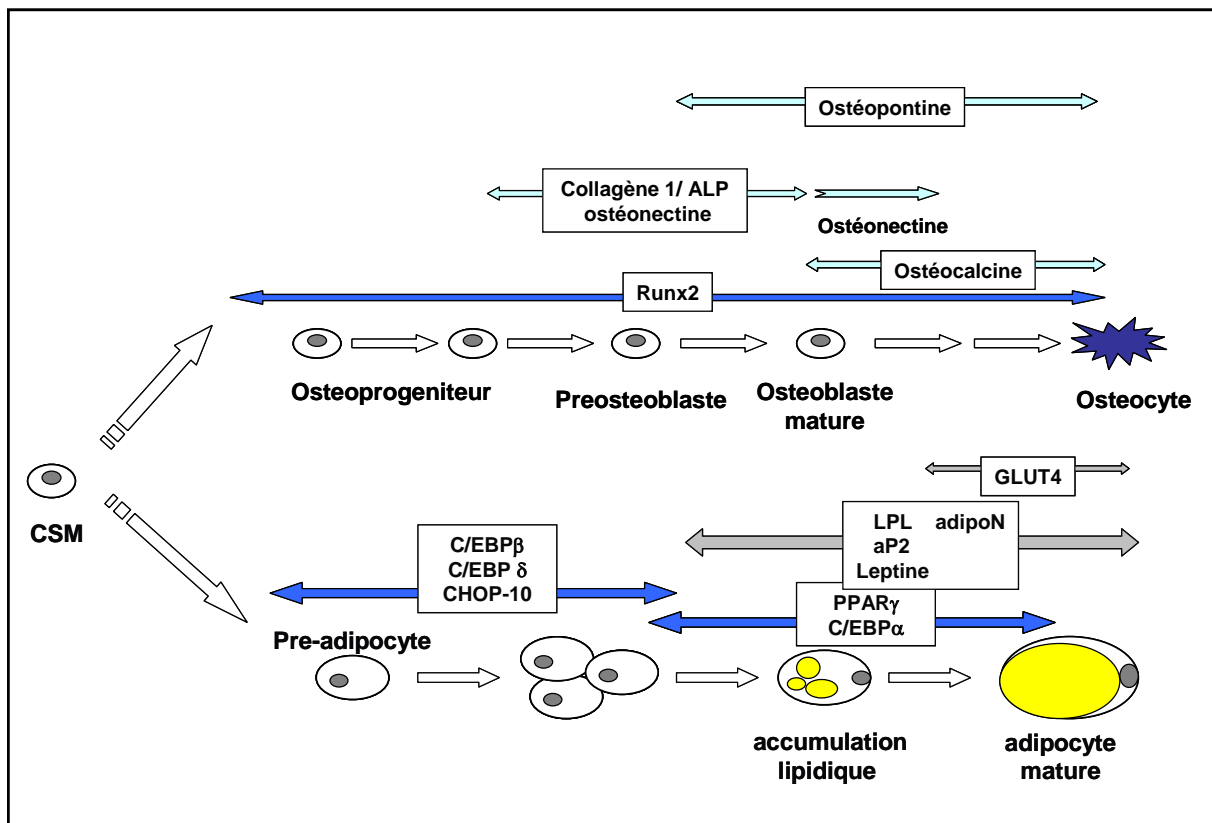
### **Le milieu de la moelle osseuse, les cellules souches mésenchymateuses et leur différenciation.**

La moelle osseuse est présente chez l'adulte dans les cavités des os plats et des extrémités proximales des épiphyses des os longs. Elle comprend le tissu myéloïde et le stroma médullaire. La cellule souche hématopoïétique du tissu myéloïde va se différencier pour donner les différentes cellules des lignées hématopoïétiques. Dans le stroma, se trouvent les cellules souches mésenchymateuse (CSMs), les fibroblastes, les ostéoblastes et les adipocytes.



**Figure 1 : Environnement de la moelle osseuse. D'après Walsh et al. 2006 (29).**

Les ostéoblastes, cellules ostéoformatrices, dérivent des cellules souches mésenchymateuses alors que les ostéoclastes, cellules ostéorésorbantes, proviennent de la lignée hématopoïétique monocytaire. Les CSMs sont des cellules multipotentes capables de se différencier en divers types cellulaires tels que l'ostéoblaste, le chondroblaste ou l'adipocyte (30-32).

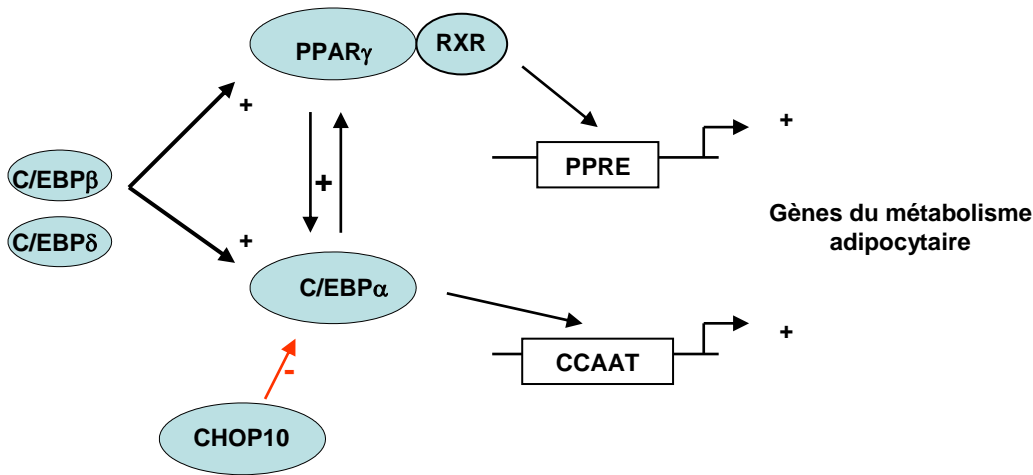


**Figure 2 : Expression génique au cours de la différenciation des CSMs en ostéoblaste ou en adipocyte.**

La différenciation des CSMs en ostéoblastes est caractérisée par l'engagement et la prolifération des cellules ostéoprogénitrices qui, après arrêt de la multiplication cellulaire, se différencient en pré-ostéoblastes puis en ostéoblastes matures fonctionnels chargés de la synthèse et de la minéralisation de la matrice osseuse. Les différentes séquences de la différenciation nécessitent l'expression du facteur de transcription majeur Runx2 et d'autres facteurs régulateurs tels que Msx-2, Dlx-5, ostérix et Twist, qui contrôlent l'expression de gènes spécifiques. La phosphatase alcaline (ALP) est exprimée dans les premiers stades de l'ostéogénèse, l'ostéonectine (ON), l'ostéopontine (OP) et l'ostéocalcine (OC) sont exprimées par les ostéoblastes matures (Figure 2). L'ostéogénèse est sous le contrôle de nombreux facteurs locaux tels que les protéines morphogéniques osseuses (BMP), le TGFβ (Transforming growth factor β), les FGF (Fibroblast growth factor) et systémiques, l'hormone parathyroïdienne, les hormones sexuelles, la vitamine D, les glucocorticoïdes (33).

D'une manière similaire, l'induction de l'adipogénèse des CSMs est régulée par une balance entre signaux pro et anti-adipocytaires. Parmi les facteurs pro-adipogéniques, citons l'hormone de croissance, l'IGF (Insulin-like growth factor), les glucocorticoïdes et les prostaglandines, tandis que les protéines wnt, TGF $\beta$  et Sonic Hedgehog ont un effet inhibiteurs. La compréhension du rôle exact de ces signaux et de leur hiérarchisation reste incomplète, une complexité supplémentaire venant de certains agents qui peuvent à la fois être activateurs ou inhibiteurs. Il est à l'heure actuelle admis que ces voies de signalisation coordonnent l'action de facteurs de transcription, principalement PPAR $\gamma$  (peroxysome proliferator-activated receptor gamma) et la famille des CAAT/enhancer binding family (C/EBP), qui jouent un rôle séquentiel et coopératif dans le déroulement de la différenciation. Dans les premiers stades de la différenciation, les protéines C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$  sont synthétisées de façon précoce et transitoire. Elles agissent directement au niveau du promoteur de PPAR $\gamma$  pour augmenter l'expression de ce gène. Par la suite, l'induction de la protéine C/EBP $\alpha$  permet de maintenir l'expression de PPAR $\gamma$ , ces deux protéines nécessaires à l'adipogénèse se régulant mutuellement de façon positive (Figure 3). L'action régulatrice de ces facteurs transactive de nombreux gènes spécifiques de l'adipocyte par l'intermédiaire de sites présents dans leurs régions régulatrices: Séquence CCAAT pour C/EBP $\alpha$  et PPRE (Peroxysome Proliferator Response Element) pour PPAR $\gamma$ . Ils dirigent entre autre l'expression de la lipoprotéine lipase, d'une protéine vectrice des acides gras (FABP4 ou aP2) et du transporteur au glucose GLUT4 (Figure 2). Une autre protéine de la famille des C/EBP, CHOP-10 (C/EBP homologous protein-10), entraîne une séquestration des C/EBP et empêche leur action activatrice en s'hétérodimérisant avec eux. Enfin, ADD1/SREBP1 (adipocyte determination- and differentiation-dependent factor 1/sterol regulatory element binding protein 1) est un facteur transcriptionnel à motif hélice-boucle-hélice (HLH) qui participe également, de façon plus limitée, à l'induction de l'adipogénèse [pour revue (35, 36)].





**Figure 3 : Interactions entre les facteurs transcriptionnels de l'adipogénèse PPAR $\gamma$  et CEB/P.**

Le processus de différenciation peut schématiquement être divisé entre événements précoces et tardifs. Les étapes précoces sont caractérisées par des remodelages du cytosquelette et l'émergence de marqueurs tels la lipoprotéine lipase. Au cours de la différenciation terminale, les adipocytes présentent un accroissement de leur activité métabolique, en rapport avec l'induction d'enzymes spécifiques, qui se traduit par l'accumulation dans le cytoplasme de gouttelettes lipidiques qui augmentent de volume puis fusionnent. L'augmentation de l'expression de GLUT4 et de aP2 participe à cette lipogénèse. L'adipocyte produit alors de nombreux facteurs sécrétés qui participent à la régulation du métabolisme du tissu adipeux et des tissus voisins ainsi qu'au contrôle de l'homéostasie énergétique de l'organisme.

Il a été proposé que les CSMs se différencieraient par défaut en adipocytes et que la différenciation en ostéoblastes ne se ferait que sous certaines conditions : nombre de CSMs et état de confluence, vascularisation, niveaux de facteurs de croissance dans le milieu (37, 38). Dans l'ostéoporose, ces conditions ne seraient plus présentes, et il a été suggéré que la différenciation prédominante des CSMs en adipocytes serait à l'origine de l'infiltration progressive de la moelle osseuse par le tissu adipeux médullaire, au détriment des ostéoblastes et donc de la formation osseuse. La biologie et la fonction de l'adipocyte médullaire sont encore mal connues. Le tissu adipeux médullaire a longtemps été considérée comme un composant de l'os jouant un rôle passif de remplissage de l'espace laissé vacant par la perte osseuse (39). Par la suite, l'existence de fonctions endocrines a été suggérée. Ainsi, un des rôles les mieux caractérisés des adipocytes médullaires est de supporter l'hématopoïèse en produisant les cytokines nécessaires au développement cellulaire. Il semble qu'ils pourraient

également participer au métabolisme lipidique de la moelle et représenter un réservoir d'énergie locale pour l'ostéogenèse par exemple (40). L'adipocyte de la moelle produit un certain nombre de facteurs solubles, pouvant avoir un effet sur la formation osseuse ; parmi eux, des adipokines, dont la leptine et l'adiponectine actuellement très étudiées pour leur implication dans la régulation de la masse osseuse, des cytokines inflammatoires capables de promouvoir la résorption osseuse et des acides gras suspectés de toxicité (41). Certains de ces facteurs, telle la leptine, sont impliqués dans la régulation conjointe de l'ostéoblastogénèse et de l'adipogénèse, ce qui laisse supposer des mécanismes d'interactions complexes entre les deux types cellulaires.

### **Interactions entre l'ostéoblaste et l'adipocyte au sein de la moelle osseuse**

L'hypothèse de l'existence d'une relation inverse entre l'adipocyte médullaire et l'ostéoblaste est soutenue par de nombreuses études. L'augmentation de l'adiposité médullaire au détriment de la masse osseuse dans l'ostéoporose a été rapportée dès 1971 (42). Les résultats d'études menées *in vitro* dans des systèmes de culture de CSMs ont conduit à suggérer que la régulation de l'ostéogénèse et de l'adipogénèse pourrait se faire au niveau du précurseur cellulaire commun (43). Par la suite, dans le modèle de sénescence chez la souris SAMP6, il a été montré que la perte osseuse liée à l'âge résulterait d'une diminution de la capacité des CSMs à se différencier en ostéoblastes accompagnée d'une augmentation de la différenciation adipocytaire (44-46). Une autre théorie propose que cette relation inverse existe de par l'inter-conversion possible des cellules déjà engagées dans une voie de différenciation, ostéoblastique ou adipocytaire. L'idée de plasticité entre les deux types cellulaires a été suggérée pour la première fois dans une étude portant sur la différenciation adipocytaire de cellules primaires osseuses sous certaines conditions de culture (47). Ce concept, soutenu par d'autres études menées *in vitro* (48, 49) reste cependant controversé.

Le paradigme de la relation inverse a récemment été remis en question par l'hypothèse de l'existence dans la moelle osseuse de cellules progénitrices pré-osteoblastiques ou pré-adipocytaires répondant à des mécanismes de régulation distincts (50). Il a également été observé dans quelques modèles de souris génétiquement modifiées des variations indépendantes des tissus osseux et adipeux (51). L'équipe de Lecka-Czernik, en montrant que les activités pro-adipocytaires et anti-ostéogéniques de PPAR- $\gamma$  peuvent être modulées de façon simultanée ou indépendante selon la nature du ligand utilisé, suggère une complémentarité des deux hypothèses (40, 52). Des mécanismes multiples, évoluant avec

l'âge et l'environnement, pourraient ainsi, selon ces auteurs, être mis en œuvre dans les relations entre ostéoblastes et adipocytes.

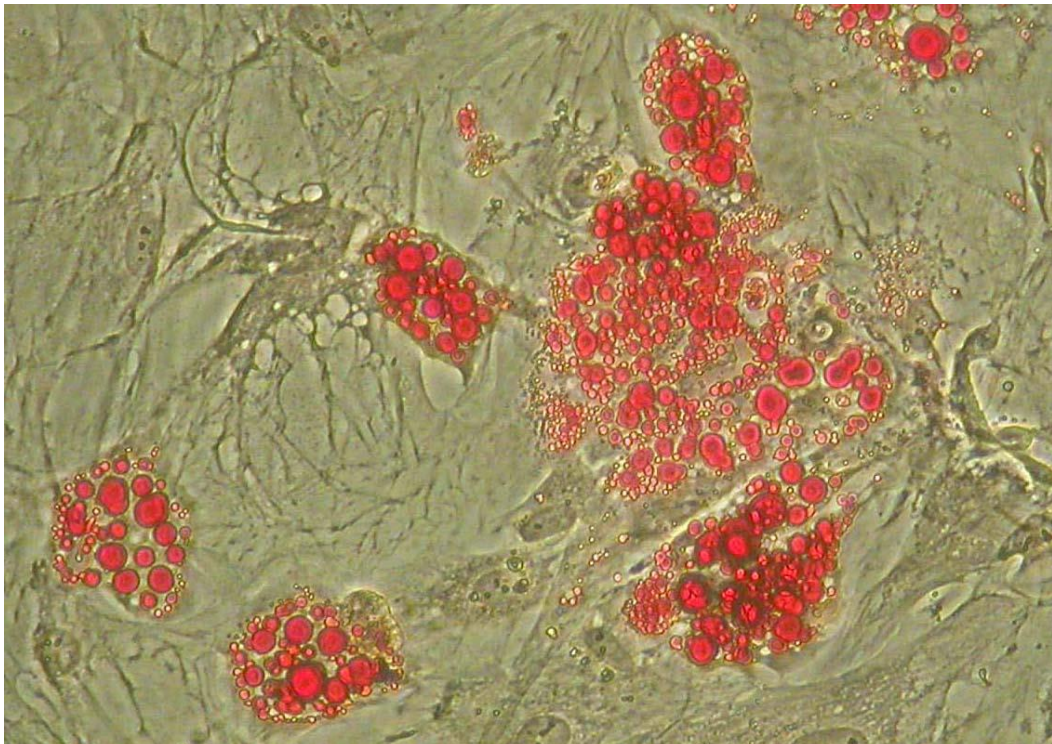
## **Objectifs**

Même si de nombreux travaux ont été publiés sur le sujet ces toutes dernières années, il reste de multiples interrogations concernant le rôle des adipocytes au sein de la moelle osseuse, leur éventuelle implication dans la survenue de l'ostéoporose mais aussi la nature des interactions entre adipocytes et ostéoblastes dans le stroma médullaire. Le lien entre augmentation de la graisse médullaire et diminution osseuse ne fait cependant plus aucun doute et, avec la possibilité d'une régulation commune des deux voies de différenciation, il est fort probable que l'adipocyte joue un rôle dans le développement de l'ostéoporose. Dans ce contexte, notre hypothèse est que l'adipocyte médullaire, par une action paracrine, pourrait intervenir sur la régulation de la différenciation des CSMs voire des ostéoblastes. Dans le but d'y apporter des éléments de réponse, nous avons développé un modèle de coculture utilisant des CSMs commerciales humaines non différenciées ou cultivées en milieu ostéogénique, placées en coculture avec des CSMs préalablement cultivées en milieu adipogénique.

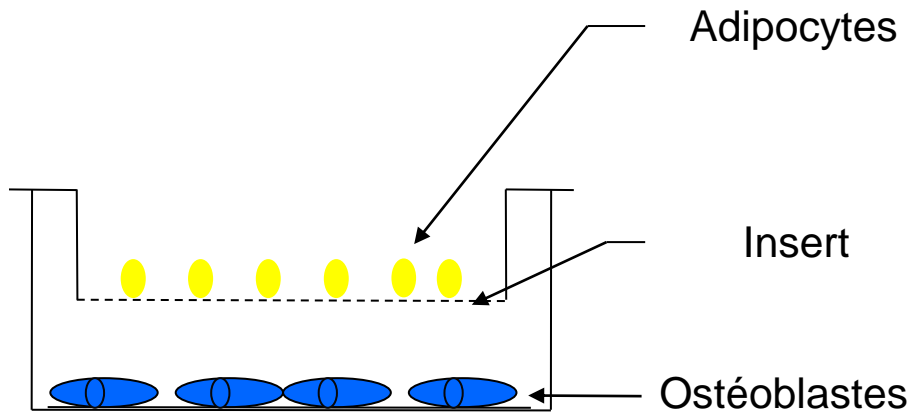
## **III-Resultats Experimentaux**

### **La différenciation adipocytaire s'installe au laboratoire**

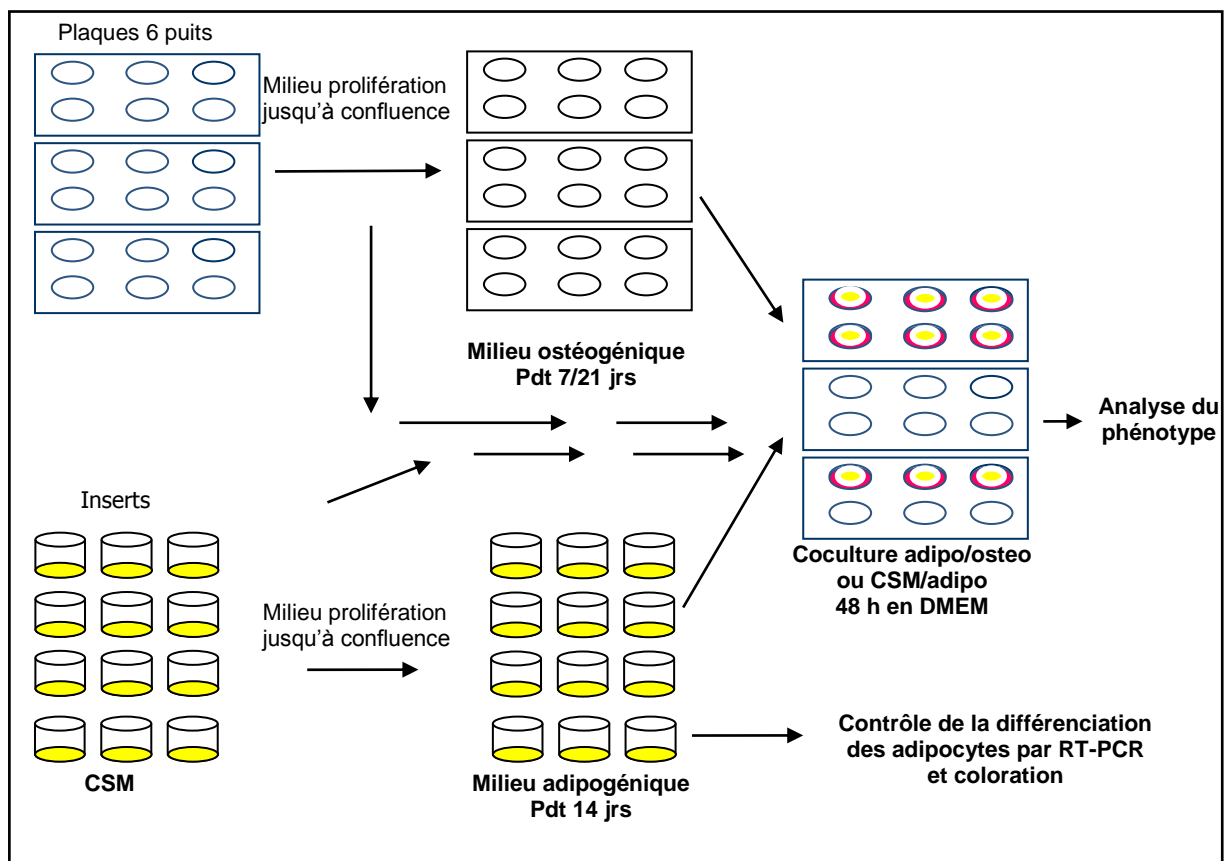
En raison des thématiques de recherche jusqu'alors développées, les techniques de culture cellulaire touchant à l'expansion des CSMs et à leur différenciation ostéoblastique étaient bien maîtrisées au laboratoire. Il a par contre fallu mettre au point l'ensemble des protocoles relatifs à la différenciation adipocytaire et à son évaluation : milieux de culture, coloration spécifique, gènes cibles et gènes de référence pour l'analyse de l'expression génique. Une cinétique conduite avec 4 milieux de culture différents nous a permis de déterminer les conditions nous permettant d'obtenir en 14 jours de culture de 20% à 40% de cellules différenciées (Figure 4).



**Figure 4 : Coloration Oil Red O effectuée sur des CSMs cultivées en milieu adipogénique. L'oil Red O marque spécifiquement les gouttelettes lipidiques et permet la visualisation et le comptage des adipocytes.**



**Figure 5 : Principe de la coculture**



**Figure 6 : Schématisation du protocole expérimental de coculture**

## Mise au point des cocultures

Nous avons mis au point un système de coculture utilisant des inserts à membrane poreuse (figure 5). Dans ce système, les CSMs commerciales humaines d'un même donneur sont soit :

- ensemencées sur insert de culture et cultivées après confluence en milieu adipogénique durant 14 jours (A14)
- ensemencées en plaque 6 puits et cultivées en milieu de prolifération jusqu'à confluence (CSM)
- ensemencées en plaque 6 puits et cultivées après confluence en milieu ostéogénique durant 7 (O7) ou 21 jours (O21)

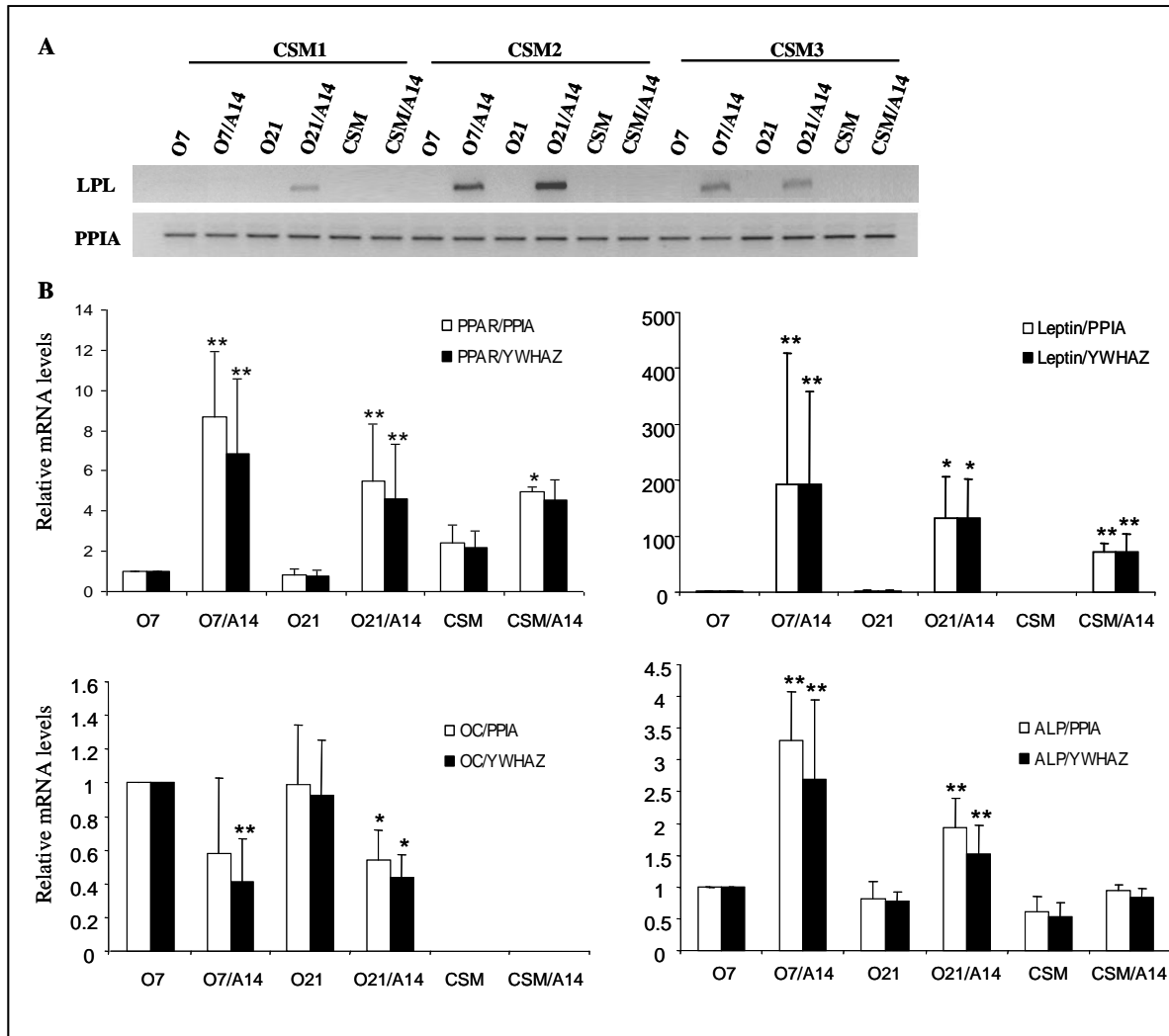
Les inserts sont ensuite transférés dans les puits et la coculture se fait en milieu de base sans sérum durant 48h (O7/A14, O21/A14, CSM/A14). Les cellules cultivées dans les mêmes conditions mais sans insert sont considérées comme contrôle (O7, O21, CSM). Un autre contrôle consiste en une coculture dans laquelle des CSMs cultivées en milieu de prolifération durant 21 jours remplacent les adipocytes sur l'insert (O21/CSM21). Après coculture, les cellules des plaques six puits sont récupérées, leur phénotype est analysé par PCR en temps réel et détermination de l'activité phosphatase alcaline. La différenciation adipocytaire sur les inserts a été vérifiée par coloration à l'Oil Red'O et par recherche de marqueur spécifique par RT-PCR. Le protocole expérimental est représenté dans la Figure 6.

## Modifications phénotypiques observées après coculture

La réalisation d'expériences de coculture sur des CSMs obtenues à partir de trois donneurs différents nous a permis de mettre en évidence une altération de la différenciation au sein de la population ostéoblastique (34). Les cellules présentent ainsi après coculture (Figure 7) :

- Une diminution du niveau d'expression de l'ostéocalcine (OC), marqueur tardif de la différenciation ostéoblastique tandis que les niveaux d'expression de Runx2 et du collagène de type 1 (COL1) ne varient pas.
- Une augmentation du niveau d'expression du facteur de transcription PPAR $\gamma$ , régulateur essentiel de la différenciation adipocytaire.
- L'apparition de l'expression des marqueurs adipocytaires leptine et lipoprotéine lipase (34) tandis que l'expression du marqueur tardif GLUT4 n'est pas détectée.

Après coculture des CSMs avec les adipocytes, seule l'apparition de l'expression de la leptine est observée (Figure 7) (34).

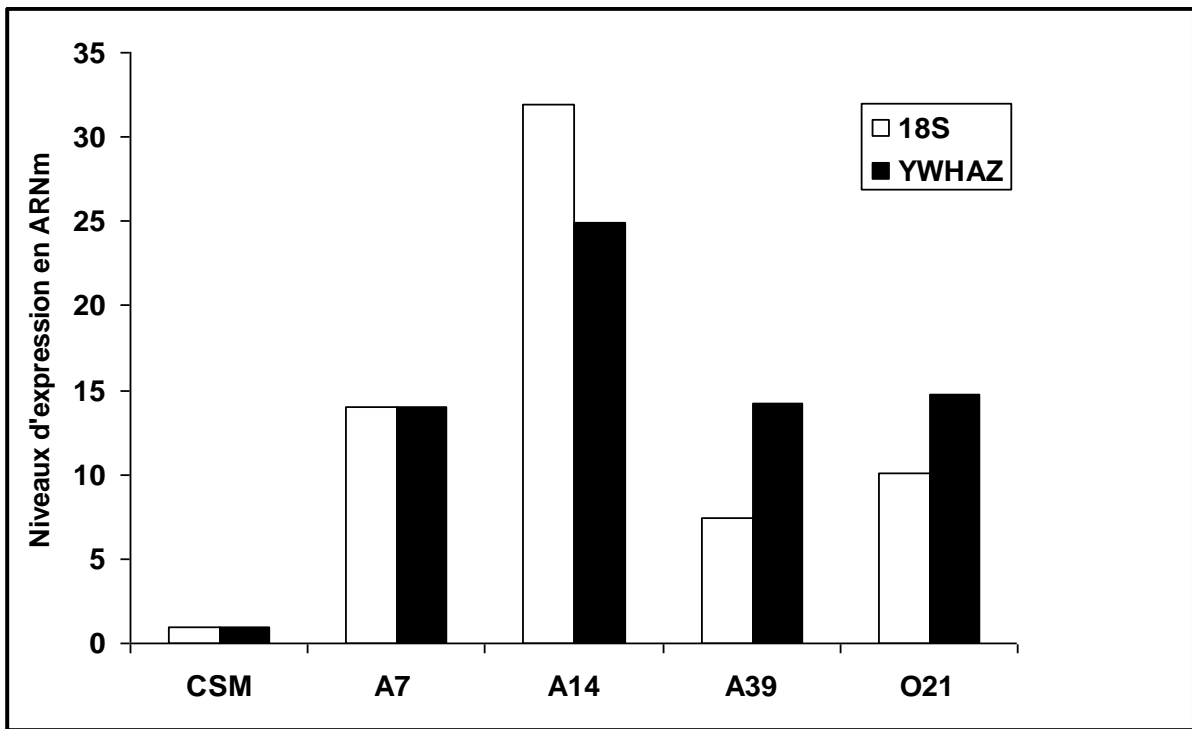


**Figure 7 : Effets de la coculture sur le phénotype des CSMs et des ostéoblastes issus des CSMs.**

A. Analyse du gène LPL (lipoprotéine lipase) par RT-PCR à partir de 3 donneurs différents (CSM1, CSM2 et CSM3). En référence, le gène PPIA : Peptidylpropyl isomerase A.

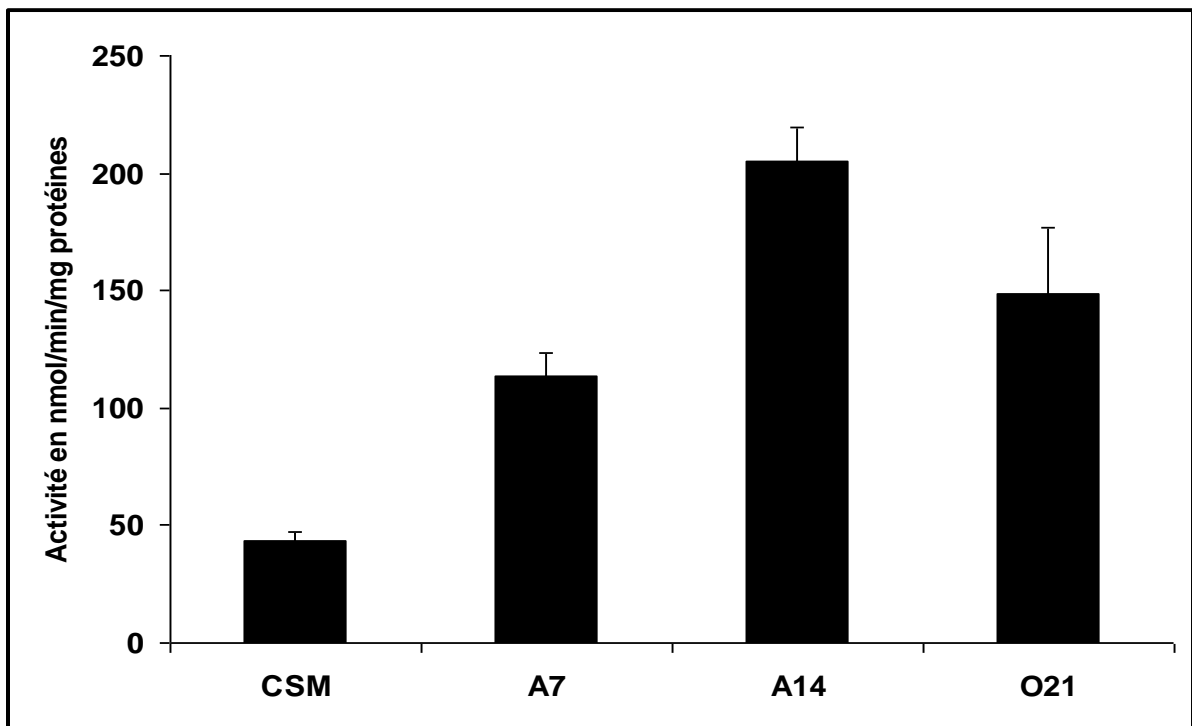
O7, O21 : Cellules cultivées après confluence en milieu de différenciation ostéogénique pendant 7 ou 21 jours. CSM : Cellules cultivées en milieu de prolifération jusqu'à confluence. A14 : Cellules cultivées après confluence en milieu de différenciation adipocytaire pendant 14 jours. O7/A14, O21/A14, CSM/A14 : Coculture O7, O21 et CSM avec A14 pendant 48 heures.

B. Analyse des marqueurs adipocytaires (PPAR $\gamma$  et leptine) et ostéoblastiques (OC : Ostéocalcine et ALP : Phosphatase alcaline) par PCR en temps réel. Les niveaux d'expression en ARNm sont normalisés par rapport à l'expression de deux gènes de référence, PPIA: Peptidylpropyl isomerase A et YWHAZ: tyrosine 3-monooxygénase/tryptophan 5-monooxygénase-activation protein. \*P<0.05, P\*\*<0.01, pour les cellules cocultivées par rapport aux cellules cultivées seules.



**Figure 8A : Analyse par PCR en temps réel de l'expression de l'ALP.**

Les niveaux d'expression sont normalisés par rapport à deux gènes de référence, 18S et tyrosine 3-monoxygénase/tryptophane 5-monoxygénase activation protein (YWHAZ). CSM : Cellules souches mésenchymateuses cultivées en milieu de prolifération jusqu'à confluence. A7, A14 et A39 : CSMs cultivées après confluence en milieu adipogénique pendant 7, 14 et 39 jours. O21 : CSMs cultivées en milieu ostéogénique pendant 21 jours.



**Figure 8B : Détermination de l'activité ALP.**

CSM : Cellules souches mésenchymateuses cultivées en milieu de prolifération jusqu'à confluence. A7, A14 et A39 : CSMs cultivées après confluence en milieu adipogénique pendant 7, 14 et 39 jours. O21 : CSMs cultivées en milieu ostéogénique pendant 21 jours.

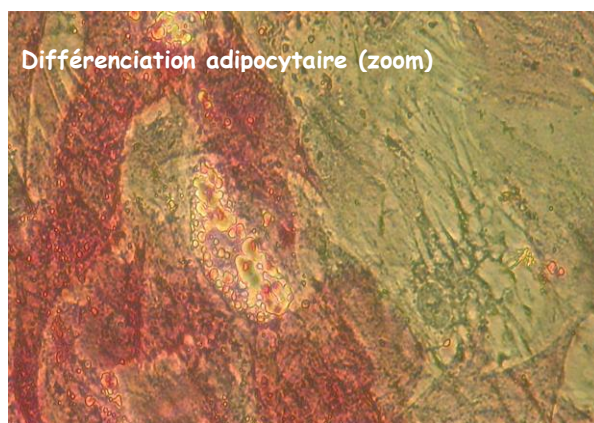
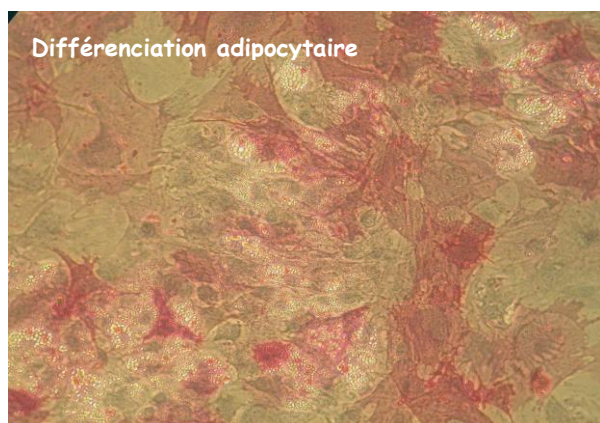
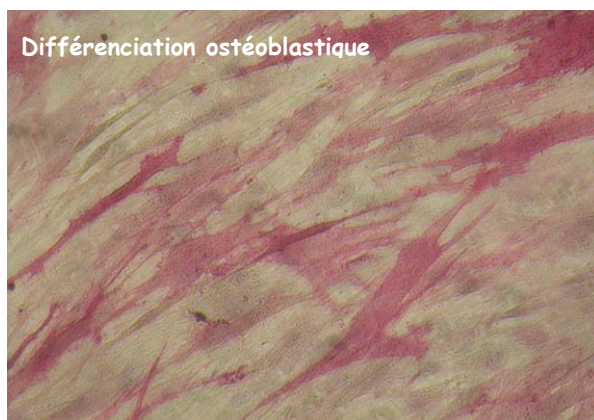
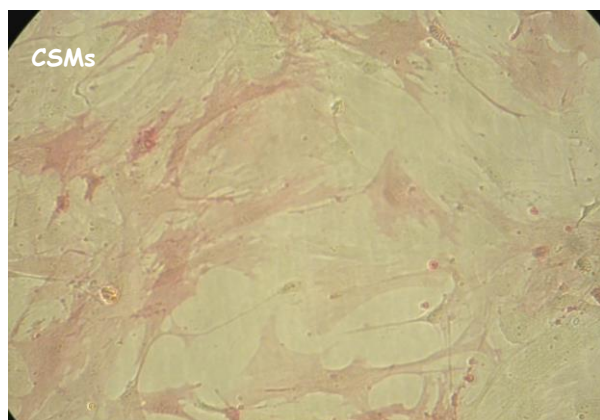


## **La phosphatase alcaline, un marqueur adipocytaire ?**

La coculture induit ainsi dans la population ostéoblastique l'augmentation voire l'apparition de l'expression de marqueurs adipocytaires tandis que le niveau d'expression des marqueurs ostéoblastiques reste stable ou diminue. Curieusement, nous avons observé une augmentation du niveau d'expression de l'alcaline phosphatase (ALP) après coculture de la population ostéoblastique, accompagnée, pour les cellules cultivées 21 jours avant coculture (O21/A14), d'une augmentation de l'activité enzymatique (34). La phosphatase alcaline est un marqueur ostéoblastique bien connu mais il a été également montré la présence de l'expression et de l'activité de cette enzyme dans différents modèles de cultures adipocytaires (53-55). C'est pourquoi nous avons analysé et comparé les niveaux d'expression et d'activité de l'ALP de cultures de CSMs placées ou non en milieux de différenciation ostéoblastique ou adipocytaire. Les résultats préliminaires confirment bien la présence d'expression et d'activité de l'ALP dans des CSMs cultivées durant 14 jours en milieu d'induction adipogénique. De façon encore plus surprenante, les niveaux d'expression et d'activité obtenus dans ces conditions sont plus élevés que ceux observés pour les CSMs cultivées en milieu ostéogénique (Figure 8). Par ailleurs, la réalisation de colorations *in situ* a permis de corroborer la présence d'une activité ALP au niveau des cellules de type adipocytes (Figure 9).

**Figure 9 : Coloration ALP *in situ*.**

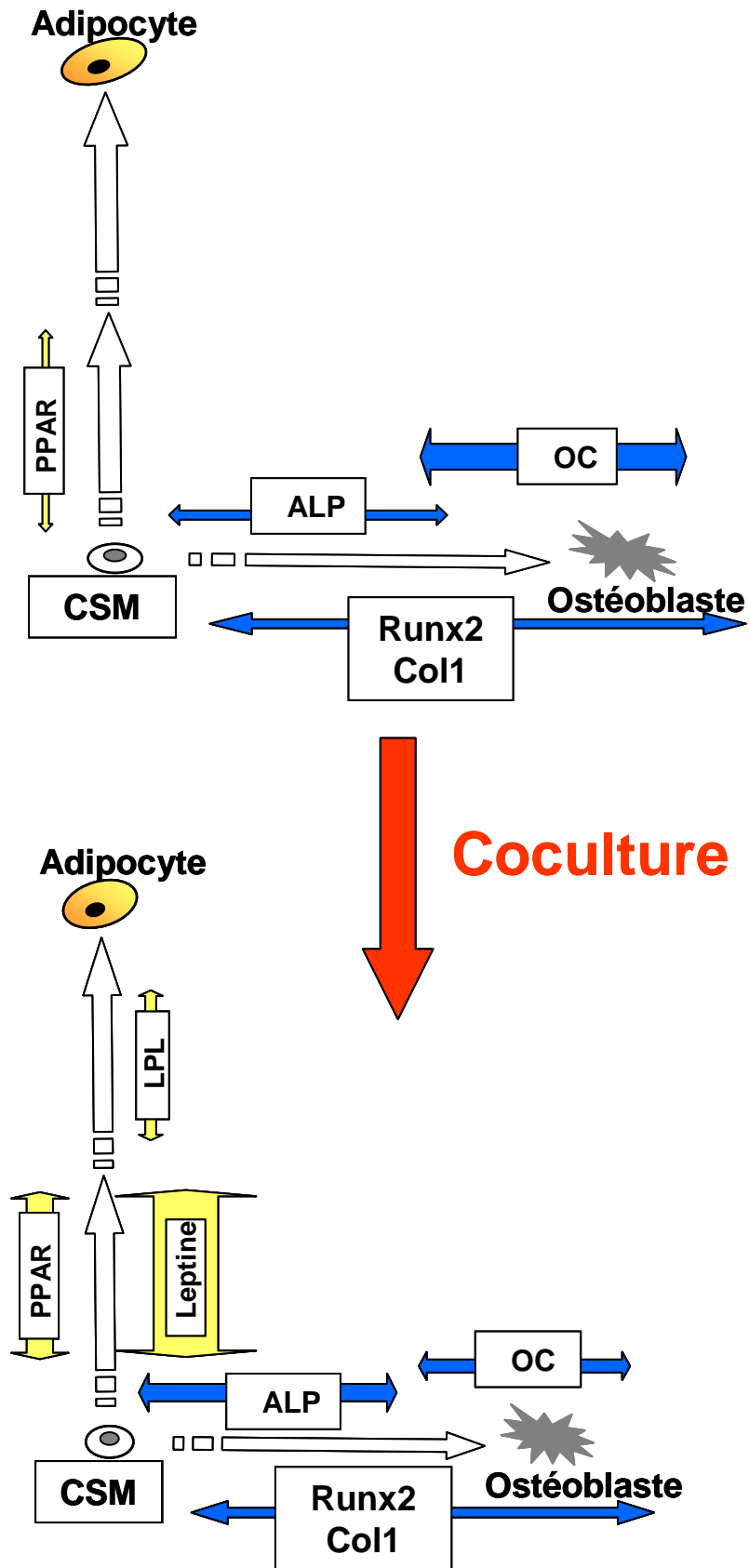
CSMs cultivées 14 jours en milieu de prolifération, en milieu de différenciation ostéoblastique ou adipocytaire.



## Quelques réflexions sur les résultats obtenus

Dans le système que nous avons développé, la coculture induit dans la population ostéoblastique dérivée des CSMs des modifications phénotypiques importantes, certaines d'entre elles sont également retrouvées dans les CSMs non différenciées mais de façon atténuée. Les cellules souches mésenchymateuses représentent une population cellulaire hétérogène. L'analyse *in vitro* de CSMs de diverses espèces a révélé que seulement 20 à 40% de la population cellulaire serait multipotente, le phénotype des autres cellules étant mal défini (56). Dans ces conditions, on peut se demander si les effets observés après coculture ne seraient pas le fait d'une modification phénotypique, non pas des CSMs différenciées en ostéoblastes, mais des cellules « contaminantes » présentes dans la population de départ. Cependant, l'absence d'expression d'ostéocalcine et de LPL dans les CSMs non différenciées, cocultivées ou non, écarte la possibilité d'une contribution significative des cellules non différenciées ou bien des cellules « contaminantes » dans le phénotype observé. Quant à la variation d'amplitude observée dans les modifications phénotypiques entre les CSMs différenciées ou non, elle provient certainement de l'état de différenciation des cellules. On peut en effet supposer que les voies de signalisation empruntées diffèrent selon l'état de différenciation cellulaire, de la même façon que le niveau d'expression de nombreux récepteurs.

Peu de travaux consacrés à l'étude *in vitro* des relations adipocytes/ostéoblastes ont été publiés et, à notre connaissance, aucun n'utilisant des CSMs humaines. Il a été montré une action néfaste d'adipocytes matures extramédullaires sur la prolifération d'ostéoblastes primaires, due aux acides gras polyinsaturés sécrétés par les adipocytes (57, 58). Dans une autre étude utilisant les mêmes types cellulaires, ce sont des acides gras saturés, les acides palmitique et stéarique, qui affectent la prolifération, la fonction et la survie des ostéoblastes (59). Un papier publié à la même période que le nôtre rapporte une diminution des niveaux d'expression de Runx2, du collagène de type 1, de l'ostéocalcine et d'ostérix ainsi qu'une augmentation du niveau d'expression de PPAR $\gamma$  pour des cellules des lignées murines ostéoblastiques MC3T3-L1 et BMS2 suite à la coculture avec des adipocytes différenciés de la lignée 3T3-L1 (60). Par contre, la coculture induit une diminution de l'expression et de l'activité de l'ALP. Il existe de nombreuses disparités entre les deux études, citons l'espèce, le temps de coculture et plus encore les types cellulaires et leur état de différenciation qui peuvent cependant expliquer ces différences de résultats. Les relations adipocytes/ostéoblastes



**Figure 10 : Conversion phénotypique de la population ostéoblastique**

Les niveaux d'expression sont symbolisés par l'épaisseur des flèches, bleues pour les marqueurs ostéoblastiques et jaunes pour les marqueurs adipocytaires.

ont également été étudiées par le biais des milieux conditionnés (MC). C'est ainsi que la mise en présence de CSMs murines différenciées en ostéoblastes avec un MC adipocytaire a entraîné une augmentation de l'activité ALP. Les auteurs suggèrent une action positive du TNF $\alpha$ , sécrété par les adipocytes et présent dans le MC, sur la fonction ostéoblastique (61). Une autre hypothèse, en relation avec nos observations, serait que cet accroissement de l'activité ALP corresponde à l'acquisition de caractères adipocytaires, mais l'absence d'analyse d'expression génique ne permet pas de l'approfondir.

La diminution du niveau d'expression de l'ostéocalcine associée à l'apparition de l'expression de marqueurs adipocytaires dans la population ostéoblastique nous conduit à suggérer l'existence d'une conversion phénotypique de la population ostéoblastique vers la voie adipocytaire. Notre hypothèse est celle d'une dé-différenciation des cellules de type ostéoblastique, accompagnée d'une réorientation vers la voie de différenciation adipocytaire (Figure 10). Selon cette supposition, l'absence de modification dans les niveaux d'expression de Runx2 et du collagène de type 1 n'est pas surprenante car ces marqueurs sont exprimés tout au long du processus de différenciation ostéoblastique. Quant à l'augmentation du niveau d'expression de l'ALP, elle peut s'expliquer par un retour à un stade moins différencié (si l'on considère ce marqueur comme ostéoblastique) ou à l'acquisition d'un phénotype adipocytaire (si l'on considère que l'ALP est associée à l'adipogénèse). Ce phénomène de commutation entre adipocytes et ostéoblastes a déjà été décrit dans divers systèmes de culture cellulaire, les cellules différenciées étant capables de modifier leur programme de différenciation en réponse à un changement de milieu inducteur (48, 49, 62, 63). Dans notre étude, ce sont les adipocytes eux-mêmes qui entraînent une altération du phénotype des ostéoblastes, et même s'il faut rester prudent face à des résultats obtenus *in vitro*, il est tentant de les extrapoler à un possible mécanisme qui impliquerait les adipocytes médullaires dans la survenue de l'ostéoporose.

L'absence de contact physique entre les cellules cocultivées suggère que la population ostéoblastique réponde à un ou plusieurs facteurs solubles sécrétés par les adipocytes. Les acides gras, incriminés dans les études précédemment décrites pour leur impact négatif sur la prolifération, la fonction et l'apoptose des ostéoblastes (58, 59), apparaissent comme de bons candidats. Parmi les processus potentiellement provoqués, ils pourraient activer le facteur de transcription PPAR $\gamma$ . En effet, les acides gras et leurs dérivés ont été décrits comme des ligands endogènes de PPAR $\gamma$  (64, 65). De plus, il a été montré qu'ils sont capables d'induire

la différenciation adipocytaire de lignées ostéoblastiques humaines et murines, et ceci en transactivant PPAR $\gamma$  (62). Dans le modèle de coculture développé, il est possible que les adipocytes libèrent une quantité d'acides gras suffisante pour provoquer les effets observés. Or, les CSMs non différenciées ou différenciées en ostéoblastes expriment dans ce même modèle un niveau basal de PPAR $\gamma$ . Il est donc envisageable que les modifications phénotypiques induites par la coculture soient dues à l'activation de PPAR $\gamma$  dans les CSMs et la population ostéoblastique, activation qui pourrait être induite par les acides gras sécrétés par les adipocytes. C'est sur la base de cette hypothèse que j'ai choisi d'orienter la suite des travaux, selon une approche développée dans la partie suivante.

# PROJETS DE RECHERCHE

Les projets de recherche que j'envisage de développer découlent des résultats obtenus au cours de l'étude précédemment décrite et consistent à :

1. Caractériser de façon plus approfondie les phénomènes observés suite à la coculture et optimiser le modèle.
2. Etayer l'association phénotype adipocytaire/ALP.
3. Comprendre les mécanismes impliqués dans les modifications phénotypiques induites par la coculture.

Il est certain qu'il ne s'agit pas d'un travail d'ermite et j'espère qu'Aline Clabaut pourra poursuivre cette « aventure » avec moi. Par ailleurs, je compte beaucoup sur l'aide de Séverine Delplace, pour ses savoirs et compétences en biologie cellulaire, et de Stéphanie Lucas, Maître de conférences nouvellement recrutée dans l'équipe pour ses compétences en physiologie de l'adipocyte.

## **I-Optimisation et caractérisation du modèle de coculture**

De nombreuses questions se posent suite aux modifications observées après coculture. Dans la mesure où il nous semble possible d'obtenir assez rapidement réponse à certaines d'entre elles, la mise en œuvre des expériences nécessaires constitue un objectif à court terme. Ci-dessous sont ainsi listées ces quelques questions ainsi que la méthodologie que nous comptons employer pour y répondre :

La coculture induit dans la population ostéoblastique dérivée des CSMs l'apparition d'un phénotype « hybride » caractérisé par la détection concomitante de l'expression de marqueurs ostéoblastiques et adipocytaires. Cette détection peut découler de la modification phénotypique de toutes les cellules de type ostéoblastique ou bien signifier la présence d'un mélange hétérogène de cellules, certaines ayant acquis un phénotype adipocytaire tandis que d'autres conserveraient le phénotype ostéoblastique. Dans le but de mieux cerner le phénomène engendré par la coculture, nous envisageons d'analyser par immunofluorescence la possible co-localisation de protéines adipocytaires et ostéoblastiques (la lipoprotéine lipase et l'ostéocalcine par exemple) au sein d'une même cellule.

L'émergence d'un marqueur tel que la lipoprotéine lipase indique un engagement dans le processus de différenciation adipocytaire, engagement non abouti comme le dénotent à la fois l'absence d'expression de GLUT4 et l'absence de gouttelettes lipidiques. Nous nous



interrogeons sur la possibilité d'exacerber l'acquisition des caractéristiques adipocytaires jusqu'à l'apparition dans le cytoplasme de ces gouttelettes. Pour cela, nous projetons d'augmenter le temps de coculture jusqu'aux limites de tolérance cellulaire, en renouvelant éventuellement les inserts adipocytaires. Il faudra alors peut-être compléter le milieu d'un minimum de sérum pour fournir les acides gras nécessaire à la lipogénèse.

Nos résultats portent essentiellement, si l'on excepte la mesure de l'activité phosphatase, sur des variations d'expression génique et nous souhaitons y ajouter une analyse fonctionnelle en étudiant l'influence de la coculture sur les capacités de minéralisation des cellules.

Enfin, il serait intéressant d'étudier l'influence des ostéoblastes cocultivés sur le phénotype des adipocytes, en effet il est fort probable qu'il existe un « dialogue » entre ces deux cellules voisines et que la présence des ostéoblastes puisse modifier la physiologie de l'adipocyte.

## **II-Confirmation de l'association ALP/phénotype adipocytaire**

La présence surprenante d'une activité ALP dans des CSMs cultivées en milieu d'induction adipogénique nous incite par curiosité à quelques expériences supplémentaires. Une cinétique de culture sur 30 jours est actuellement menée afin de comparer au cours du temps les niveaux d'expression et d'activité de l'ALP pour des CSMs cultivées en milieu adipocytaire ou ostéogénique. Par ailleurs, nous avons vérifié que les CSMs différenciées en adipocytes exprime le collagène de type 1 et nous souhaitons tester la possibilité d'une minéralisation de ces cellules en les cultivant en présence d'une source de phosphate. Il a été montré que l'ALP de cellules 3T3-L1 ne serait pas localisée à la membrane plasmique mais plutôt à la membrane entourant les gouttelettes lipidiques (54). Nous souhaitons vérifier cette donnée dans notre système cellulaire en recherchant parmi les protéines associées à cette membrane la présence d'une activité phosphatase alcaline. Toujours dans le même papier, il a été suggéré que l'ALP serait impliquée dans le processus de l'adipogénèse et agirait sur le stockage des lipides (54). C'est pourquoi il est tentant de reproduire une coculture en supprimant l'activité ALP des CSMs différenciés en ostéoblastes par l'emploi d'un inhibiteur tel que le levamisole. Nous espérons que ces quelques manipulations nous permettront de mieux cerner le rôle de l'ALP dans les adipocytes. Le sujet ne sera à priori pas développé davantage à la fois par manque de temps et pour ne pas trop s'éloigner du projet en cours.

### **III-Recherche des mécanismes impliqués dans les modifications phénotypiques induites par la coculture**

Parmi les facteurs sécrétés par les adipocytes, nous pensons que les acides gras sont susceptibles d'altérer le phénotype des ostéoblastes dérivés des CSMs. En effet, en tant que ligands potentiels, ils pourraient activer le facteur de transcription PPAR $\gamma$ . Or il est attribué à PPAR $\gamma$  un rôle anti-ostéoblastique critique dans la perte osseuse. Il a ainsi été montré que l'activation de PPAR $\gamma$  favorise l'adipogénèse et inhibe l'ostéoblastogénèse de cellules primaires de moelle osseuse (66-68). Inversement, l'inactivation de PPAR $\gamma$  entraîne *in vitro* une diminution de la différenciation adipocytaire au profit de la différenciation ostéoblastique et produit *in vivo* une augmentation du volume osseux trabéculaire (69). Chez l'homme, une augmentation de la perte osseuse et du taux de fractures a été rapportée chez les patients diabétiques traités par des thiazolidinedione (TZD), ligands synthétiques de PPAR $\gamma$  (70). PPAR $\gamma$  présente quatre isoformes : PPAR $\gamma$ 1 et PPAR $\gamma$ 2, les deux isoformes majeures, ne diffèrent que par 30 résidus acides aminés dans leur extrémité N-terminale. PPAR $\gamma$ 1 est exprimé par divers types cellulaires et représente l'isoforme exprimée à 99% dans l'os tandis que PPAR $\gamma$ 2 n'est exprimé que par les adipocytes (71, 72). Il est maintenant connu que les variants PPAR $\gamma$ 3 et PPAR $\gamma$ 4 produisent des protéines identiques à PPAR $\gamma$ 1; PPAR $\gamma$ 3 a été localisé dans le tissu adipeux, les macrophages et l'intestin tandis que la distribution tissulaire de PPAR $\gamma$ 4 reste à déterminer (73). Il existe une controverse sur la capacité de PPAR $\gamma$ 1 à induire l'adipogénèse. Pour certains auteurs, PPAR $\gamma$ 1 serait capable d'induire l'adipogénèse quoique que moins efficacement que PPAR $\gamma$ 2 (74, 75) tandis que pour d'autres, en absence de ligand exogène, l'isoforme 1 ne présente pas de fonction régulatrice de l'adipogénèse (76). En fait, il semblerait que les 30 acides aminés supplémentaires dans l'extrémité N terminale de l'isoforme 2 lui confère un domaine activateur indépendant du ligand (75).

Nous avons vérifié l'expression des deux isoformes dans notre système de culture. PPAR $\gamma$ 1 est exprimé quoique assez faiblement dans les CSMs, les CSMs différenciées en ostéoblastes ou en adipocytes. PPAR $\gamma$ 2 est uniquement exprimé dans les CSMs différenciées en adipocytes. Par contre, son expression est détectée après coculture dans les CSMs différenciées en ostéoblastes, ce qui est déterminant et prometteur pour la suite envisagée. Pour valider notre hypothèse, deux approches seront suivies qui consisteront à vérifier que (1) les acides gras libérés par les adipocytes constituent bien un facteur déterminant dans les

effets observés et que (2) PPAR $\gamma$  est bien impliqué dans les modifications phénotypiques de la population ostéoblastique.

Le premier volet de ce projet sera assuré par Stéphanie Lucas. Afin de définir si les adipocytes provoquent les effets d'altérations phénotypiques des ostéoblastes par l'intermédiaire d'une libération d'acides gras, elle propose en premier lieu :

- de stimuler la lipolyse et de s'assurer que cette stimulation provoque une exacerbation de la régression du phénotype ostéoblastique et une augmentation de l'expression des marqueurs adipocytaires
- d'incuber les CSMs différenciés en ostéoblastes avec des acides gras présentant différents degrés de saturation puis de vérifier l'impact de ces molécules sur la différenciation ostéoblastique.

En ce qui concerne la seconde approche, la méthodologie consistera à activer ou inhiber PPAR $\gamma$  dans les CSMs et la population ostéoblastique avant la coculture. L'activation de PPAR $\gamma$  se fera en utilisant un ligand synthétique de la classe des TZDs, la rosiglitazone. L'expression de PPAR $\gamma$  sera inhibée par l'emploi de la méthode d'extinction des ARN (RNA silencing). L'analyse de l'expression génique permettra de déterminer si l'activation ou l'inhibition de PPAR $\gamma$  entraînent respectivement une exacerbation ou au contraire une diminution des effets induits par la coculture sur le phénotype ostéoblastique. Si c'est bien le cas, il serait alors très intéressant d'analyser *in vivo* les effets d'une invalidation du gène PPAR $\gamma$ 2 sur les populations ostéoblastiques et adipocytaires de la moelle osseuse. Divers modèles ont déjà été développés et analysés. C'est ainsi que les souris invalidées de façon hétérozygote pour le gène PPAR $\gamma$  (PPAR $\gamma$  +/-) présentent une augmentation de la formation osseuse due à une stimulation de l'ostéoblastogénèse des progéniteurs de la moelle (69). Chez les souris lipodystrophiques PPAR $\gamma$  <sup>hyp/hyp</sup>, l'absence complète de PPAR $\gamma$ 2 accompagnée d'une diminution importante de PPAR $\gamma$ 1 dans le tissu adipeux blanc conduit également à l'augmentation de la masse osseuse grâce à une différenciation ostéoblastique favorisée (77). Dans ces modèles, il est clair que la déficience en PPAR $\gamma$  ou en l'une ou l'autre de ses isoformes affecte l'ensemble des tissus, ce qui ne permet pas de s'affranchir de variations endocrines importantes. C'est le cas des taux circulants d'adipokines impliquées à la fois dans le métabolisme des cellules osseuses et des cellules adipocytaires, telles que la leptine et l'adiponectine par exemple. Pour analyser les interactions entre ostéoblastes et adipocytes au sein de la moelle osseuse, une invalidation conditionnelle permettrait de se focaliser sur les effets locaux. Dans l'idéal, il s'agirait d'invalider PPAR $\gamma$ 2 uniquement dans la lignée

ostéoblastique et d'en évaluer les conséquences par des analyses histologiques et fonctionnelles.

Au terme de la rédaction de ce mémoire est paru un article décrivant des travaux similaires aux nôtres mais poussés plus avant et intégrant une partie de nos perspectives. C'est ainsi que la coculture de lignées murines ostéoblastiques MC3T3-L1 et BMS2 avec des adipocytes différenciés de la lignée 3T3-L1 entraîne une diminution des niveaux d'expression de Runx2, du collagène de type 1, de l'ostéocalcine et d'ostéix ainsi qu'une augmentation du niveau d'expression de PPAR $\gamma$ . Se focalisant sur un possible rôle de PPAR $\gamma$ , les auteurs montrent que son extinction à l'aide de siRNA prévient les modifications phénotypiques observées, concluant à son implication dans l'inhibition de la différenciation ostéoblastique suite à la sécrétion de ligands par les adipocytes (60). La lecture de ce papier m'a confortée dans les hypothèses que nous avons émises ainsi que dans la démarche que nous avons choisie et nous incite à poursuivre dans cette voie.

## **IV- Conclusions**

Les idées ne manquent pas pour développer et approfondir les résultats que nous avons récemment obtenus et si je ne les ai pas toutes exposées c'est dans un souci de cohérence avec la taille de l'équipe et les moyens dont nous disposons. Les projets présentés évolueront de toute façon vraisemblablement en fonction des résultats obtenus, de l'apport bibliographique mais aussi des personnes qui s'y impliqueront.

Les résultats que nous avons obtenus dans cette étude menée *in vitro* suggèrent que l'adipocyte médullaire puisse, par une action paracrine, intervenir sur la différenciation des CSMs et des ostéoblastes. Comment les extrapoler à un mécanisme physiologique impliqué dans le développement de l'ostéoporose au sein de la moelle osseuse ? On pourrait supposer que la co-existence des cellules du stroma soit perturbée par une modification de l'environnement cellulaire ou bien que leur dialogue soit altéré suite au dysfonctionnement d'un mécanisme compensateur. Localement, la diminution du niveau de molécules ostéo-anaboliques pourrait intervenir dans la mise en place d'un processus pathologique. C'est ainsi qu'il a été montré une baisse des taux circulants d'IGF-1 lors de la perte osseuse liée à l'âge mais aussi chez les anorexiques (78, 79). Plus globalement, on peut supposer que des facteurs

systemiques soient également à l'origine du dérèglement local, citons l'implication de l'insuffisance en vitamine D ou en estrogènes ainsi que l'incidence du système nerveux central. L'équilibre de la balance adipogénèse/ostéogénèse est vraisemblablement régulé à plusieurs niveaux de manière complexe et subtile, sa compréhension offrira certainement de nouvelles perspectives dans le traitement de l'ostéoporose.

# CONCLUSION

Dans l'engrenage des urgences de la vie quotidienne d'un laboratoire, il est rare de décider volontairement de prendre du temps pour « faire le point ». La rédaction de ce mémoire a constitué l'occasion d'une prise de distance bénéfique par rapport aux travaux de recherche en cours et aux projets en découlant. Par ailleurs, la possibilité de soumettre cette réflexion à l'analyse des membres du jury me semble tout aussi bénéfique et enrichissante. Ce sont les principales raisons qui m'ont incitée à m'inscrire en HDR, si l'on excepte bien sûr la possibilité d'encadrement d'étudiants en thèse.

Depuis septembre 2010, j'encadre Sara Zgheib, étudiante en première année de doctorat, dont le travail porte sur le modèle animal d'anorexie mentale développé par Christophe Chauveau qui co-encadre cette thèse. Nous souhaitons obtenir par le biais de ce travail une interaction et une convergence des résultats apportés par l'approche cellulaire et l'approche expérimentale animale qui permettront de mieux cerner l'impact de l'adipocyte médullaire dans la pathogénie de l'ostéoporose.

Grâce aux récents travaux qui placent désormais l'ostéoblaste au cœur de la régulation du métabolisme énergétique de l'organisme, il est clair que l'étude de la physiopathologie du tissu osseux ne peut se faire qu'en tenant compte des tissus et cellules environnants. Dans ce contexte, les travaux initiés par notre équipe lors de la dernière contractualisation me semblent particulièrement prometteurs et j'espère de tout cœur pouvoir continuer à y participer.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



1. Beckmann, J.S., Richard, I., Hillaire, D., Broux, O., Antignac, C., Bois, E., Cann, H., Cottingham, R.W., Jr., Feingold, N., Feingold, J., et al. 1991. A gene for limb-girdle muscular dystrophy maps to chromosome 15 by linkage. *C R Acad Sci III* 312:141-148.
2. Allamand, V., Broux, O., Richard, I., Fougerousse, F., Chiannikulchai, N., Bourg, N., Brenguier, L., Devaud, C., Pasturaud, P., Pereira de Souza, A., et al. 1995. Preferential localization of the limb-girdle muscular dystrophy type 2A gene in the proximal part of a 1-cM 15q15.1-q15.3 interval. *Am J Hum Genet* 56:1417-1430.
3. Beckmann, J.S., Tomfohrde, J., Barnes, R.I., Williams, M., Broux, O., Richard, I., Weissenbach, J., and Bowcock, A.M. 1993. A linkage map of human chromosome 15 with an average resolution of 2 cM and containing 55 polymorphic microsatellites. *Hum Mol Genet* 2:2019-2030.
4. Fougerousse, F., Broux, O., Richard, I., Allamand, V., de Souza, A.P., Bourg, N., Brenguier, L., Devaud, C., Pasturaud, P., Roudaut, C., et al. 1994. Mapping of a chromosome 15 region involved in limb girdle muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 3:285-293.
5. Fougerousse, F., Richard, I., Broux, O., Cohen, D., and Beckmann, J.S. 1992. Mapping of two chromosome 15 microsatellites. *Genomics* 13:903-904.
6. Joyce, C., Fanning, L., Malcolm, S., Richard, I., Broux, O., Beckmann, J.S., Flint, T., Kruse, T.A., Vergnaud, G., Cox, S.A., et al. 1994. The EUROGEN map of human chromosome 15. *Eur J Hum Genet* 2:232-233.
7. Passos-Bueno, M.R., Richard, I., Vainzof, M., Fougerousse, F., Weissenbach, J., Broux, O., Cohen, D., Akiyama, J., Marie, S.K., Carvalho, A.A., et al. 1993. Evidence of genetic heterogeneity in the autosomal recessive adult forms of limb-girdle muscular dystrophy following linkage analysis with 15q probes in Brazilian families. *J Med Genet* 30:385-387.
8. Richard, I., Broux, O., Allamand, V., Fougerousse, F., Chiannikulchai, N., Bourg, N., Brenguier, L., Devaud, C., Pasturaud, P., Roudaut, C., et al. 1995. Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Cell* 81:27-40.
9. Richard, I., Broux, O., Chiannikulchai, N., Fougerousse, F., Allamand, V., Bourg, N., Brenguier, L., Devaud, C., Pasturaud, P., Roudaut, C., et al. 1994. Regional localization of human chromosome 15 loci. *Genomics* 23:619-627.
10. Richard, I., Broux, O., Hillaire, D., Cherif, D., Fougerousse, F., Cohen, D., and Beckmann, J.S. 1992. Mapping of the formin gene and exclusion as a candidate gene for the autosomal recessive form of limb-girdle muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 1:621-624.
11. Allamand, V., Broux, O., Bourg, N., Richard, I., Tischfield, J.A., Hodes, M.E., Conneally, P.M., Fardeau, M., Jackson, C.E., and Beckmann, J.S. 1995. Genetic

- heterogeneity of autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy in a genetic isolate (Amish) and evidence for a new locus. *Hum Mol Genet* 4:459-463.
12. Beckmann, J.S., Richard, I., Broux, O., Fougerousse, F., Allamand, V., Chiannikulchai, N., Lim, L.E., Duclos, F., Bourg, N., Brenguier, L., et al. 1996. Identification of muscle-specific calpain and beta-sarcoglycan genes in progressive muscular dystrophies. *Cellular Pharmacology* 3:189-194.
  13. Beckmann, J.S., Richard, I., Broux, O., Fougerousse, F., Allamand, V., Chiannikulchai, N., Lim, L.E., Duclos, F., Bourg, N., Brenguier, L., et al. 1996. Identification of muscle-specific calpain and beta-sarcoglycan genes in progressive autosomal recessive muscular dystrophies. *Neuromuscul Disord* 6:455-462.
  14. Broux, O., Lim, L.E., Duclos, F., Bourg, N., Sunada, Y., Allamand, V., Meyer, J., Richard, I., Moomaw, C., Slaughter, C., et al. 1995. Beta-sarcoglycan: characterization and role in limb-girdle muscular dystrophy linked to 4q12. *Nat Genet* 11:257-265.
  15. Broux, O., Duclos, F., Bourg, N., Straub, V., Feldman, G.L., Sunada, Y., Lim, L.E., Piccolo, F., Cutshall, S., Gary, F., et al. 1998. Beta-sarcoglycan: genomic analysis and identification of a novel missense mutation in the LGMD2E Amish isolate. *Neuromuscul Disord* 8:30-38.
  16. Anselme, K., Broux, O., Noel, B., Bouxin, B., Bascoulergue, G., Dudermel, A.F., Bianchi, F., Jeanfils, J., and Hardouin, P. 2002. In vitro control of human bone marrow stromal cells for bone tissue engineering. *Tissue Eng* 8:941-953.
  17. Cornet, F., Broux, O., Anselme, K., Hardouin, P., and Jeanfils, J. 2004. Effect of dexamethasone on moesin gene expression in rabbit bone marrow stromal cells. *Mol Cell Biochem* 265:79-83.
  18. Bertaux, K., Broux, O., Chauveau, C., Jeanfils, J., and Devedjian, J.C. 2005. Identification of CBFA1-regulated genes on SaOs-2 cells. *J Bone Miner Metab* 23:114-122.
  19. Bertaux, K., Broux, O., Chauveau, C., Hardouin, P., Jeanfils, J., and Devedjian, J.C. 2006. Runx2 regulates the expression of GNAS on SaOs-2 cells. *Bone* 38:943-950.
  20. Chauveau, C., Devedjian, J.C., Blary, M.C., Delecourt, C., Hardouin, P., Jeanfils, J., and Broux, O. 2004. Gene expression in human osteoblastic cells from normal and heterotopic ossification. *Exp Mol Pathol* 76:37-43.
  21. Chauveau, C., Broux, O., Delecourt, C., Hardouin, P., Jeanfils, J., and Devedjian, J.C. 2008. Gene expression in normotopic and heterotopic human bone: increased level of SP7 mRNA in pathological tissue. *Mol Cell Biochem* 318:81-87.
  22. Chauveau, C., Devedjian, J.C., Delecourt, C., Jeanfils, J., Hardouin, P., and Broux, O. 2008. Leptin receptors and beta2-adrenergic receptor mRNA expression in brain injury-related heterotopic ossification. *J Recept Signal Transduct Res* 28:347-359.

23. Ghali, O., Chauveau, C., Lencel, P., Salomez, R., Hani, K., Hardouin, P., Broux, O., and Devedjian, J.C. 2010. RUNX2 regulates the effects of TNF $\alpha$  on proliferation and apoptosis in SaOS-2 cells. *Bone* 41:901-910.
24. Ghali, O., Chauveau, C., Hardouin, P., Broux, O., and Devedjian, J.C. 2010. TNF's effects on proliferation and apoptosis in human mesenchymal stem cells are dependent on RUNX2 expression. *JBMR* 25:1616-1626.
25. Ecklund, K., Vajapeyam, S., Feldman, H.A., Buzney, C.D., Mulkern, R.V., Kleinman, P.K., Rosen, C.J., and Gordon, C.M. 2010. Bone Marrow Changes in Adolescent Girls with Anorexia Nervosa. *JBMR* 25:298-304.
26. Legroux-Gerot, I., Vignau, J., Collier, F., and Cortet, B. 2005. Bone loss associated with anorexia nervosa. *Joint Bone Spine* 72:489-495.
27. Misra, M., and Klibanski, A. 2006. Anorexia nervosa and osteoporosis. *Rev Endocr Metab Disord* 7:91-99.
28. Rosen, C.J., and Klibanski, A. 2009. Bone, fat, and body composition: evolving concepts in the pathogenesis of osteoporosis. *Am J Med* 122:409-414.
29. Walsh, M.C., Kim, N., Kadono, Y., Rho, J., Lee, S.Y., Lorenzo, J., and Choi, Y. 2006. Osteoimmunology: interplay between the immune system and bone metabolism. *Annu Rev Immunol* 24:33-63.
30. Owen, M. 1988. Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci Suppl* 10:63-76.
31. Gimble, J.M. 1990. The function of adipocytes in the bone marrow stroma. *New Biol* 2:304-312.
32. Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., and Marshak, D.R. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-147.
33. Nishimura, R., Hata, K., Ikeda, F., Ichida, F., Shimoyama, A., Matsubara, T., Wada, M., Amano, K., and Yoneda, T. 2008. Signal transduction and transcriptional regulation during mesenchymal cell differentiation. *J Bone Miner Metab* 26:203-212.
34. Clabaut, A., Delplace, S., Chauveau, C., Hardouin, P., and Broux, O. 2010. Human osteoblasts derived from mesenchymal stem cells express adipogenic markers upon coculture with bone marrow adipocytes. *Differentiation* 80:40-45.
35. Gregoire, F.M., Smas, C.M., and Sul, H.S. 1998. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 78:783-809.
36. Otto, T.C., and Lane, M.D. 2005. Adipose development: from stem cell to adipocyte. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 40:229-242.

37. Duque, G. 2008. Bone and fat connection in aging bone. *Curr Opin Rheumatol* 20:429-434.
38. Kirkland, J.L., Tchkonina, T., Pirtskhalava, T., Han, J., and Karagiannides, I. 2002. Adipogenesis and aging: does aging make fat go MAD? *Exp Gerontol* 37:757-767.
39. Gimble, J.M. 1990. The function of adipocytes in the bone marrow stroma. *New Biol* 2:304-312.
40. Lecka-Czernik, B., and Suva, L.J. 2006. Resolving the Two "Bony" Faces of PPAR-gamma. *PPAR Res* 2006:27489.
41. Gasparrini, M., Rivas, D., Elbaz, A., and Duque, G. 2009. Differential expression of cytokines in subcutaneous and marrow fat of aging C57BL/6J mice. *Exp Gerontol* 44:613-618.
42. Meunier, P., Aaron, J., Edouard, C., and Vignon, G. 1971. Osteoporosis and the replacement of cell populations of the marrow by adipose tissue. A quantitative study of 84 iliac bone biopsies. *Clin Orthop Relat Res* 80:147-154.
43. Beresford, J.N., Bennett, J.H., Devlin, C., Leboy, P.S., and Owen, M.E. 1992. Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. *J Cell Sci* 102 ( Pt 2):341-351.
44. Jilka, R.L., Weinstein, R.S., Takahashi, K., Parfitt, A.M., and Manolagas, S.C. 1996. Linkage of decreased bone mass with impaired osteoblastogenesis in a murine model of accelerated senescence. *J Clin Invest* 97:1732-1740.
45. Kajkenova, O., Lecka-Czernik, B., Gubrij, I., Hauser, S.P., Takahashi, K., Parfitt, A.M., Jilka, R.L., Manolagas, S.C., and Lipschitz, D.A. 1997. Increased adipogenesis and myelopoiesis in the bone marrow of SAMP6, a murine model of defective osteoblastogenesis and low turnover osteopenia. *J Bone Miner Res* 12:1772-1779.
46. Takeda, T., Hosokawa, M., Takeshita, S., Irino, M., Higuchi, K., Matsushita, T., Tomita, Y., Yasuhira, K., Hamamoto, H., Shimizu, K., et al. 1981. A new murine model of accelerated senescence. *Mech Ageing Dev* 17:183-194.
47. Nuttall, M.E., Patton, A.J., Olivera, D.L., Nadeau, D.P., and Gowen, M. 1998. Human trabecular bone cells are able to express both osteoblastic and adipocytic phenotype: implications for osteopenic disorders. *J Bone Miner Res* 13:371-382.
48. Schilling, T., Noth, U., Klein-Hitpass, L., Jakob, F., and Schutze, N. 2007. Plasticity in adipogenesis and osteogenesis of human mesenchymal stem cells. *Mol Cell Endocrinol* 271:1-17.
49. Song, L., and Tuan, R.S. 2004. Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. *Faseb J* 18:980-982.

50. Post, S., Abdallah, B.M., Bentzon, J.F., and Kassem, M. 2008. Demonstration of the presence of independent pre-osteoblastic and pre-adipocytic cell populations in bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Bone* 43:32-39.
51. Gimble, J.M., Zvonic, S., Floyd, Z.E., Kassem, M., and Nuttall, M.E. 2006. Playing with bone and fat. *J Cell Biochem* 98:251-266.
52. Lecka-Czernik, B., Moerman, E.J., Grant, D.F., Lehmann, J.M., Manolagas, S.C., and Jilka, R.L. 2002. Divergent effects of selective peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2 ligands on adipocyte versus osteoblast differentiation. *Endocrinology* 143:2376-2384.
53. Ali, A.T., Penny, C.B., Paiker, J.E., Psaras, G., Ikram, F., and Crowther, N.J. 2006. The relationship between alkaline phosphatase activity and intracellular lipid accumulation in murine 3T3-L1 cells and human preadipocytes. *Anal Biochem* 354:247-254.
54. Ali, A.T., Penny, C.B., Paiker, J.E., van Niekerk, C., Smit, A., Ferris, W.F., and Crowther, N.J. 2005. Alkaline phosphatase is involved in the control of adipogenesis in the murine preadipocyte cell line, 3T3-L1. *Clin Chim Acta* 354:101-109.
55. Kodama, H., Koyama, H., Sudo, H., and Kasai, S. 1983. Adipose conversion of mouse bone marrow fibroblasts in vitro: their alkaline phosphatase activity. *Cell Struct Funct* 8:19-27.
56. Kuznetsov, S.A., Krebsbach, P.H., Satomura, K., Kerr, J., Riminucci, M., Benayahu, D., and Robey, P.G. 1997. Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo. *J Bone Miner Res* 12:1335-1347.
57. Maurin, A.C., Chavassieux, P.M., Frappart, L., Delmas, P.D., Serre, C.M., and Meunier, P.J. 2000. Influence of mature adipocytes on osteoblast proliferation in human primary cocultures. *Bone* 26:485-489.
58. Maurin, A.C., Chavassieux, P.M., Vericel, E., and Meunier, P.J. 2002. Role of polyunsaturated fatty acids in the inhibitory effect of human adipocytes on osteoblastic proliferation. *Bone* 31:260-266.
59. Elbaz, A., Wu, X., Rivas, D., Gimble, J.M., and Duque, G. 2010. Inhibition of fatty acid biosynthesis prevents adipocyte lipotoxicity on human osteoblasts in vitro. *J Cell Mol Med* 14:982-991.
60. Liu, L.F., Shen, W.J., Zhang, Z.H., Wang, L.J., and Kraemer, F.B. 2010. Adipocytes decrease Runx2 expression in osteoblastic cells: Roles of PPARgamma and adiponectin. *J Cell Physiol.* 225:837-845.
61. Maxson, S., and Burg, K.J. 2008. Conditioned media cause increases in select osteogenic and adipogenic differentiation markers in mesenchymal stem cell cultures. *J Tissue Eng Regen Med* 2:147-154.

62. Diascro, D.D., Jr., Vogel, R.L., Johnson, T.E., Witherup, K.M., Pitzenger, S.M., Rutledge, S.J., Prescott, D.J., Rodan, G.A., and Schmidt, A. 1998. High fatty acid content in rabbit serum is responsible for the differentiation of osteoblasts into adipocyte-like cells. *J Bone Miner Res* 13:96-106.
63. Schilling, T., Kuffner, R., Klein-Hitpass, L., Zimmer, R., Jakob, F., and Schutze, N. 2008. Microarray analyses of transdifferentiated mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 103:413-433.
64. Krey, G., Braissant, O., L'Horsset, F., Kalkhoven, E., Perroud, M., Parker, M.G., and Wahli, W. 1997. Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol Endocrinol* 11:779-791.
65. Marcus, S.L., Miyata, K.S., Rachubinski, R.A., and Capone, J.P. 1995. Transactivation by PPAR/RXR heterodimers in yeast is potentiated by exogenous fatty acid via a pathway requiring intact peroxisomes. *Gene Expr* 4:227-239.
66. Benvenuti, S., Cellai, I., Luciani, P., Deledda, C., Baglioni, S., Giuliani, C., Saccardi, R., Mazzanti, B., Dal Pozzo, S., Mannucci, E., et al. 2007. Rosiglitazone stimulates adipogenesis and decreases osteoblastogenesis in human mesenchymal stem cells. *J Endocrinol Invest* 30:RC26-30.
67. Gimble, J.M., Robinson, C.E., Wu, X., Kelly, K.A., Rodriguez, B.R., Kliwer, S.A., Lehmann, J.M., and Morris, D.C. 1996. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation by thiazolidinediones induces adipogenesis in bone marrow stromal cells. *Mol Pharmacol* 50:1087-1094.
68. Jeon, M.J., Kim, J.A., Kwon, S.H., Kim, S.W., Park, K.S., Park, S.W., Kim, S.Y., and Shin, C.S. 2003. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma inhibits the Runx2-mediated transcription of osteocalcin in osteoblasts. *J Biol Chem* 278:23270-23277.
69. Akune, T., Ohba, S., Kamekura, S., Yamaguchi, M., Chung, U.I., Kubota, N., Terauchi, Y., Harada, Y., Azuma, Y., Nakamura, K., et al. 2004. PPARgamma insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. *J Clin Invest* 113:846-855.
70. Grey, A. 2008. Skeletal consequences of thiazolidinedione therapy. *Osteoporos Int* 19:129-137.
71. Bruedigam, C., Eijken, M., Koedam, M., van de Peppel, J., Drabek, K., Chiba, H., and van Leeuwen, J.P. 2010. A new concept underlying stem cell lineage skewing that explains the detrimental effects of thiazolidinediones on bone. *Stem Cells* 28:916-927.
72. Bruedigam, C., Koedam, M., Chiba, H., Eijken, M., and van Leeuwen, J.P. 2008. Evidence for multiple peroxisome proliferator-activated receptor gamma transcripts in bone: fine-tuning by hormonal regulation and mRNA stability. *FEBS Lett* 582:1618-1624.

73. Gurnell, M. 2005. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the regulation of adipocyte function: lessons from human genetic studies. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 19:501-523.
74. Mueller, E., Drori, S., Aiyer, A., Yie, J., Sarraf, P., Chen, H., Hauser, S., Rosen, E.D., Ge, K., Roeder, R.G., et al. 2002. Genetic analysis of adipogenesis through peroxisome proliferator-activated receptor gamma isoforms. *J Biol Chem* 277:41925-41930.
75. Zhang, J., Fu, M., Cui, T., Xiong, C., Xu, K., Zhong, W., Xiao, Y., Floyd, D., Liang, J., Li, E., et al. 2004. Selective disruption of PPARgamma 2 impairs the development of adipose tissue and insulin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:10703-10708.
76. Ren, D., Collingwood, T.N., Rebar, E.J., Wolffe, A.P., and Camp, H.S. 2002. PPARgamma knockdown by engineered transcription factors: exogenous PPARgamma2 but not PPARgamma1 reactivates adipogenesis. *Genes Dev* 16:27-32.
77. Cock, T.A., Back, J., Eleftheriou, F., Karsenty, G., Kastner, P., Chan, S., and Auwerx, J. 2004. Enhanced bone formation in lipodystrophic PPARgamma(hyp/hyp) mice relocates haematopoiesis to the spleen. *EMBO Rep* 5:1007-1012.
78. Legroux-Gerot, I., Vignau, J., D'Herbomez, M., Collier, F., Marchandise, X., Duquesnoy, B., and Cortet, B. 2007. Evaluation of bone loss and its mechanisms in anorexia nervosa. *Calcif Tissue Int* 81:174-182.
79. Nicolas, V., Prewett, A., Bettica, P., Mohan, S., Finkelman, R.D., Baylink, D.J., and Farley, J.R. 1994. Age-related decreases in insulin-like growth factor-I and transforming growth factor-beta in femoral cortical bone from both men and women: implications for bone loss with aging. *J Clin Endocrinol Metab* 78:1011-1016.

# TRAVAUX SELECTIONNES