



XVIème Journée scientifique du **GRIO** - PARIS 17 janvier 2003

**Des souris et des hommes :
Apport des souris génétiquement modifiées
à la compréhension de la physiologie osseuse.**

MH Lafage Proust, EP-INSERM 6603, Saint-Etienne.

L'utilisation de souris génétiquement modifiées a permis au cours de ces dernières années de faire largement progresser la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires de la biologie osseuse. Ainsi, la matrice osseuse n'est plus considérée comme un simple support passif pour les cellules osseuses, mais comme un agent important dans le contrôle du recrutement, de la prolifération, et de la différenciation cellulaire. L'ostéocalcine est une protéine non collagénique de l'os, synthétisée par les ostéoblastes, dont une des caractéristiques principales est son affinité pour l'hydroxyapatite du fait de la présence d'acide gamma-carboxy-glutamique (Gla), mais dont le rôle exact reste mal connu. En pratique courante, son taux sérique reflète la formation ostéoblastique. En 1996, l'équipe de G Karsenty a publié les résultats concernant le phénotype osseux des souris chez qui le gène de l'ostéocalcine (Oc) a été invalidé (knock-out : KO). De façon inattendue, le KO de l'ostéocalcine conduit chez ces souris à une masse osseuse plus importante avec une résistance mécanique accrue à la fracture, comparées à celles des souris sauvages. L'étude histomorphométrique a montré que les ostéoblastes avaient une activité augmentée. La délétion du gène d'une autre protéine, OF-45, récemment décrite, exprimée par les ostéoblastes matures, entraîne, elle aussi, un phénotype proche de celui du KO de l'ostéocalcine. Par ailleurs, des modèles de souris ont permis de découvrir le rôle fondamental des facteurs de transcription tels que Cbfa1, c-fos ou c-src dans la différenciation respective des ostéoblastes à partir de cellules progénitrices de la moelle osseuse. L'équipe de G. Karsenty a montré que les transcripts du gène Cbfa1 (ou runx2), étaient exprimés à 12.5 jours de vie fœtale dans les noyaux de condensation des cellules mésenchymateuses à partir desquels se développent les éléments du squelette. Cbfa1 est un facteur de transcription qui contrôle l'expression de l'ostéocalcine, gène hautement spécifique de l'ostéoblaste. De plus, la transfection de Cbfa1 dans des cellules non osseuses induit l'expression de protéines ostéoblastiques. Dans le même temps, deux autres équipes publièrent le KO de Cbfa1. Leurs résultats ont confirmé de manière très démonstrative le rôle majeur de Cbfa1 dans la différenciation ostéoblastique. En effet, les souris Cbfa1^{-/-} ont un squelette purement cartilagineux sans aucun foyer d'ossification et meurent à la naissance des difficultés respiratoires que cela entraîne. Il a également été montré que les souris Cbfa1^{-/-} présentaient des anomalies dans la différenciation chondrocytaire avec un blocage du développement des chondrocytes hypertrophiques, ce qui pourrait donc contribuer également à l'absence d'ossification enchondrale chez ces souris mutantes. Un autre facteur de transcription, appelé ostéix, a été montré comme étant lui aussi indispensable à la différenciation de l'ostéoblaste dans le squelette. Il est situé en aval de cbfa1. Le rôle de cbfa-1 ne se cantonne pas au développement. A l'âge adulte, l'expression d'un facteur cbfa1 inactif par les ostéoblastes matures diminue la masse osseuse en déprimant l'activité ostéoblastique. En revanche, la sur-expression de cbfa1 dans des ostéoblastes induit une perte osseuse et des fractures. L'importance d'une autre voie de transmission du signal dans la biologie osseuse vient d'être mise à jour. Différentes mutations décrites chez l'homme d'un co-récepteur appelé LRP5, entraînent soit une masse osseuse élevée par augmentation de la formation osseuse, soit une ostéoporose associée à une cécité. Ce co-récepteur participe à la voie de signalisation du système Wnt qui agit comme un interrupteur de la différenciation cellulaire. Des souris transgéniques sur-exprimant la mutation activatrice du co-récepteur LRP5 ont une masse osseuse deux fois supérieure à celle des souris sauvages. Les ostéoblastes de ces souris transgéniques présentent une apoptose (mort cellulaire programmée) moins fréquente que les souris sauvages. Les ostéoclastes se différencient à partir de précurseurs hématopoïétiques de la lignée macrophage-monocyte et acquièrent la capacité unique de résorber la matrice calcifiée de l'os et un grand nombre de facteurs de croissance, de cytokines, et d'hormones modulent le développement et l'activité de ces cellules. Nombre d'altérations génétiques induites chez des souris conduisent à une ostéopétrose secondaire à un effondrement de la résorption osseuse dépendant d'un défaut de développement et/ou d'activité des ostéoclastes. Des travaux récents ont enfin permis de mettre en évidence la voie principale de communication entre ostéoblastes et ostéoclastes, avec pour médiateurs l'ostéoprotégérine ainsi que RANK (pour Receptor Activating NFkB) et son ligand RANKL dont

l'équilibre détermine la différenciation et l'activité des ostéoclastes. L'ostéoprotégérine (OPG) ou osteoclast inhibiting factor (OCIF) est une glycoprotéine membre de la superfamille des récepteurs du TNF produite en particulier par les ostéoblastes. A l'inverse des autres membres de cette famille, OPG ne possède pas de domaine transmembranaire et agit donc comme un récepteur soluble dans le milieu extracellulaire. In vivo, Simonet et coll. ont montré que des souris transgéniques surexprimant OPG développaient une ostéopétrose s'accompagnant d'une diminution des ostéoclastes différenciés. Les mêmes effets étaient observés chez des souris normales après administration parentérale d'OPG recombinante. A l'opposé, les souris KO pour OPG développent une ostéoporose sévère à la fois corticale et trabéculaire accompagnée d'une incidence élevée de fractures. De manière unique parmi les facteurs impliqués dans la régulation du métabolisme osseux, les seules modifications géniques de l'expression d'OPG conduisent dans un sens à une ostéopétrose, et dans le sens inverse à une ostéoporose. Poursuivant la dissection des voies de discussion ostéoblastes-ostéoclastes, les deux mêmes équipes, et dans le même ordre chronologique, ont identifié le ligand d'OPG, RANKL ou osteoclast differentiating factor (ODF). Spécifiquement reconnue par OPG, qui joue un rôle dans la croissance des lymphocytes T et l'activité des cellules dendritiques. RANKL, porté par les cellules stromales ou préostéoblastiques, se lie électivement sur des cellules progénitrices hématopoïétiques déjà engagées dans la différenciation ostéoclastique sous l'influence de M-CSF. Pour la première fois, l'association de M-CSF et de RANKL est apparue nécessaire et suffisante pour obtenir des ostéoclastes matures in vitro, en l'absence de co-culture avec des ostéoblastes ou des cellules stromales jusque là indispensables. De plus, RANKL stimule in vitro l'activité de résorption d'ostéoclastes matures, alors que OPG est capable de l'inhiber directement. Les stimulateurs de la résorption osseuse (1,25OH₂D₃, PTH, prostaglandines, IL6) ont montré leur capacité à stimuler la transcription de RANKL. Plus précisément, c'est le ratio entre le niveau d'expression de RANKL et de son récepteur " piège " OPG qui semble contrôler la résorption ostéoclastique au niveau tissulaire. Enfin, le récepteur membranaire de RANKL, RANK, pour Receptor Activating NF- κ B1, a été isolé sur les cellules pré-ostéoclastiques expliquant a posteriori la nécessité du contact cellule-cellule pour le développement d'ostéoclastes in vitro en présence d'ostéoblastes. Les souris KO pour RANK ou RANKL présentent une ostéopétrose sévère par absence d'ostéoclastes différenciés. Le KO des molécules impliquées dans la transmission du signal du récepteur RANK, comme NF κ B ou TRAF6, entraîne, elle aussi, une ostéopétrose par absence d'ostéoclastes. Ainsi, pendant ces dernières années les manipulations géniques de souris ont permis d'améliorer de façon considérable nos connaissances sur la physiologie osseuse. La possibilité de réaliser maintenant une manipulation des gènes inductibles à la demande et de façon tissu spécifique permet

d'apporter de nouvelles données.

